

# **DIPLOMADOLGOZAT**

**Holló Viktória Bernadett**  
**Mezőgazdasági Biotechnológus MSc**

**Gödöllő**  
**2023**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**  
**Szent István Campus**  
**Mezőgazdasági Biotechnológus MSc**

**LINE-1 RETROTRANSZPOZON INSZERCIO HATÁSÁNAK**  
**VIZSGÁLATA F<sub>1</sub> ÉS F<sub>2</sub> C. ANNUM NEMZEDÉKEKBEN**

**Belső konzulens:** Dr. Veres Anikó  
Egyetemi docens  
  
Kovács Zsófia  
Egyetemi tanársegéd

**Készítette:** **Holló Viktória Bernadett**  
BKDECU  
Levelező

**Intézet/Tanszék:**

MATE, SZIC, Genetika és Biotechnológia Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

**Gödöllő**  
**2023**

## Tartalomjegyzék

<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b>	<b>3</b>
<b>1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>4</b>
2.1. A paprika, mint növény	4
2.2. A paprika színei, antociánok	4
2.3. Lila szín kialakulásának háttere	6
2.4. Antociánosodást okozó egyéb tényezők	8
2.5. Antocián hatásai	10
<b>2. A VIZSGÁLATOK MÓDSZEREI</b>	<b>12</b>
2.1. Növényanyag	12
2.2. Módszer	12
<b>3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>18</b>
<b>4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK</b>	<b>32</b>
<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>34</b>
<b>6. KÖSZÖNET NYILVÁNÍTÁS</b>	<b>35</b>
<b>7. IRODALOMJEGYZÉK</b>	<b>36</b>
<b>8. NYILATKOZAT</b>	<b>40</b>

# 1. Bevezetés és célkitűzés

Az elmúlt években az élelmiszerek az alapvető funkciójukon túl, egyre inkább a „funkcionális élelmiszerek” státuszát veszik fel. Az ilyen, úgynevezett „super food”-ok a táplálkozási szükségletek kielégítése mellett számos élettani előnnyel járhatnak, például hozzájárulhatnak bizonyos betegségek megelőzéséhez. Ilyen funkcionális élelmiszer lehet például a paprika (*Capsicum spp.*) is, melyet a világon mindenhol termesztnek. Hazánkban is nagyon fontos természetes élelmiszer-színezékként, fűszerként, valamint frissen fogyasztva is nagy népszerűségnek örvend. Magas tápértékkel rendelkeznek, és a C-vitamin, a karotinoidok, a fenolos vegyületek és más fitokemikáliák kiváló forrásaként tartják számon, amelyek antioxidáns tulajdonságaik révén megkötik a szabad gyököket. Ha ezeket az egyébként is kedvező adottságait a paprikának kiegészítjük az antociánok jótékony hatásaival is, akkor a paprika mindenképp „super food”-nak tekinthető. Így a dolgozatomban elvégzett vizsgálatok alapját két *Capsicum annuum* fajta keresztezése szolgálta, anyai partner a 'Kaldom' az apai partner pedig az extrém lila 'Black Pearl' fajta volt.

A 'Kaldom' egy fűszer típusú, nem liluló termésű paprika, míg a 'Black Pearl' a LINE-1 retrotranszpozon inszerció miatt, minden szövetében lilul.

Célunk, hogy:

- a keresztezéssel létrehozott F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> generációkban vizsgálhassuk az extrém mértékű antociánosodás egyik kiváltó okát, a LINE-1 retrotranszpozon inszerciót;
- egy hasadó populáció létrehozásával vizsgálhassuk a LINE-1 öröklésmenetét
- a fenotípusos felvételezésekből megállapítsuk, hogy az inszerció melyik szövetekben fejt ki hatását;
- génexpressziós és analitikai vizsgálatokkal vizsgáljuk, hogy a LINE-1 hogyan befolyásolja a beltartalmi mutatókat és a génexpressziós mintázatot.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. A paprika, mint növény

A paprika ismeretlen volt Európában, Ázsiában és Afrikában, amíg Kolumbusz fel nem fedezte az amerikai kontinentst. Az ő érdeme, hogy a 15. század végén behozták a paprikát Európába. Később a mediterrán országokba, majd Afrikába, Indiába és Kínába is nőtt a népszerűsége. Az étkezési szokásokba is gyorsan beépült (Boshland & Votava, 1999). A *C. annuum* volt a legsikeresebb ebben a hódításban, valószínűleg azért, mert ez érkezett Európába elsőként (Gonzalez-Perez et al., 2014). A paprika a (*Capsicum*) genushoz 20-27 faj tartozik, ezek közül domesztikáltak a következők: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, és a *C. pubescens* (Bargavi & Elumalai, 2010). A domesztikált paprikák közül a *Capsicum annuum* a legfontosabb termesztett faj az északi félgömbön, melynek a géncentruma Mexikóban található. Terméseik számos változatban előfordulnak, méretben, színben és formában sokfélék. A faj termésére jellemző, hogy a hossza 0,6-25,4 cm között mozog, szélessége pedig nagyon keskenytől akár 10,2 cm széles is lehet (Binod et al., 2011).

A paprika beltartalmát tekintve számos, az ember szervezetének működéséhez szükséges tápanyagot tartalmaz, mint például emészthető nyers fehérjék, karotinoidek, egyes szénhidrátok (fruktóz, glükóz) valamint csekély mennyiségű zsírt is (Lantos, 2018). A vízben és zsírban oldható vitaminok közül a C, E, A, B1, B2, B3, B4, B5, B6 és a B9 vitaminok, míg az ásványi anyagok és fémes elemek esetében a kálium, a foszfor, a magnézium, a kalcium, a nátrium, a vas, a cink, a mangán és a réz vannak jelen minden paprika termésében. Korábbi kutatások kimutatták, hogy különböző színű paprikák esetében hogyan változik ezek összetétele. Például a fekete, lila és fehér paprika alacsonyabb aszkorbinsav mennyiséget tartalmazott, mint a zöld, sárga, piros, barna vagy narancssárga paprika. Az A-provitamin szintje a sárga fajták kivételével a legtöbb fajta színeződésével nőtt, és a legmagasabb A-provitamin tartalommal a barna színű paprika rendelkezett (Simone et al., 1997).

### 2.2. A paprika színei, antociánok

A paprika színét számos pigment felhalmozódásának tulajdonítják, beleértve a klorofilokat, karotinoidekat, flavonoidokat és betalainokat. Ezek közül a flavonoidok tovább oszthatók kopigmentekre (színtelen) és antocianinokra (színes). A klorofilok a sejt citoplazmájában található kloroplasztiszokban, a karotinoidek a kromoplasztiszokban, míg a flavonoidok és a betalainok a sejtvakuólumokban találhatóak.

Az éretlen paprika színe a zöldtől az elefántcsont árnyalatig változik, és az ibolya különféle tónusaitól a majdnem feketéig. A zöldtől az elefántcsontig terjedő éretlen gyümölcs színét több lókuszt határozza meg. Az elefántcsont- vagy kénfehér gyümölcsszín a kénfehér, *SW1* lókuszt befolyásolja. A saláta vagy sárgás zöld szín az *SW2* lókusznak tulajdonítható, amely domináns az *SW1*-gyel szemben és recesszív az *SW3* által szabályozott sötétzöld vagy cédruszöld színnel szemben. Az *SW3* lókuszt domináns az *SW1*-hez képest (Stommel, & Griesbach 2008). Az ibolya-fekete pigmentáció a paprika szöveteiben az antocianin felhalmozódásának tulajdonítható, amit egy nem teljesen domináns gén, az antocianin (*A*) befolyásol. Egy második gén, az *A* módosítója (*MoA*), felerősíti a lila színt az *A* lókuszt jelenlétében (Lightbourn, et al., 2008; Peterson, 1959).

Az antocianinok a flavonoidok csoportjába tartoznak, amely végső soron fenilalaninból származik, így vízben oldódnak, a citoszolban szintetizálódnak, és vakuólumokban lokalizálódnak. A flavonoidok a fenilpropanoidok osztályába tartozó másodlagos metabolitok, színük nagyon széles skálán mozog, mely a halvány sárgától a kékig terjed. Különösen az antocianidinek felelősek a pirosas-lilás színekért, amelyek számos növény virágában, levelében, gyümölcsében, magvaiban és egyéb szöveteiben is megtalálhatók (Tanaka et al., 2008). Az antocianinok a pigmentek közül az egyik legfontosabbak és legelterjedtebbek a növényekben. Intenzív színnel rendelkeznek, felelősek a magasabb rendű növények szirmainak, leveleinek és gyümölcseinek szinte valamennyi rózsaszín, skarlát, piros, mályva, lila és kék színéért. Az antocianinok kémiaiailag egyetlen aromás szerkezeten, a cianidinon alapulnak, és mindegyik ebből a pigmentből származik hidroxilcsoportok hozzáadásával vagy kivonásával, illetve metilezéssel vagy glikozilezéssel (Harborne, 1998).

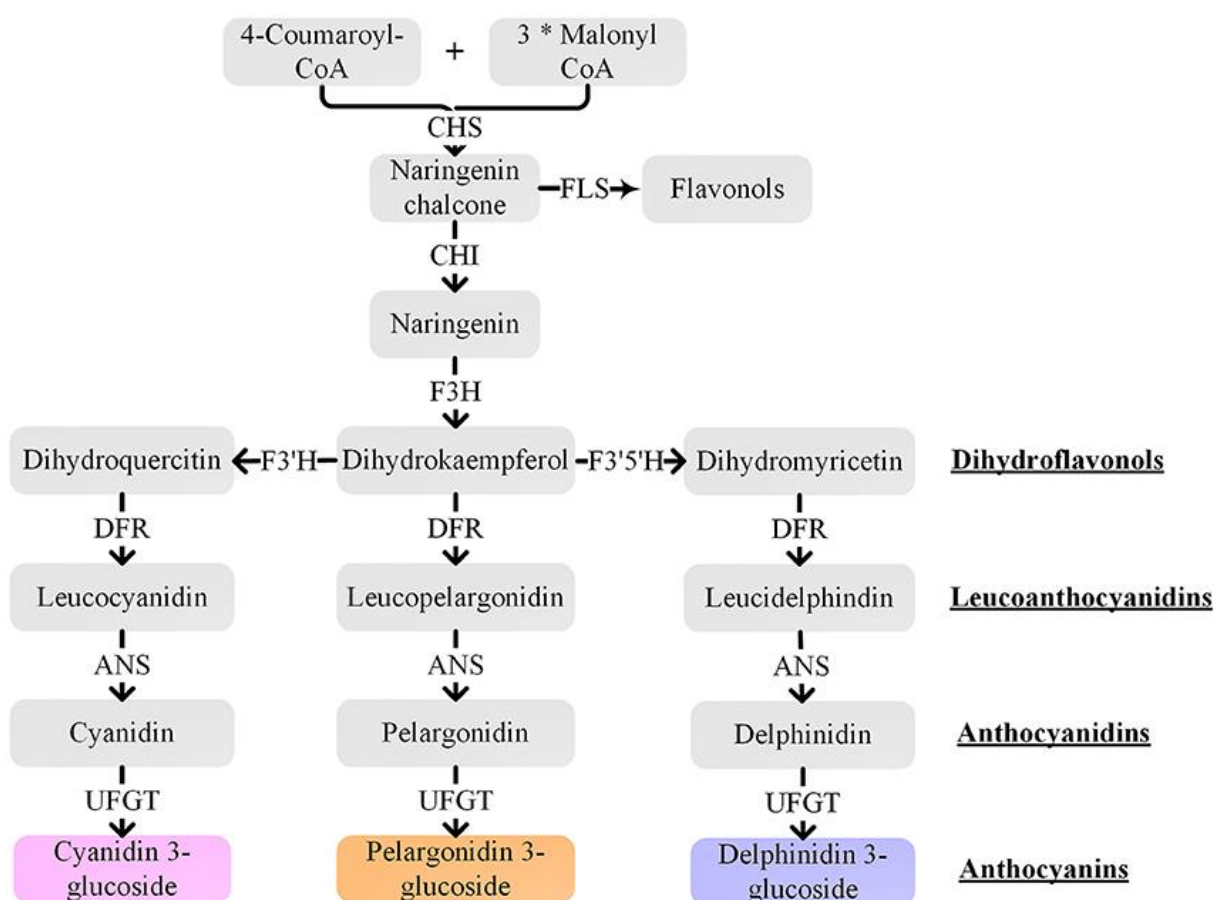
Az antocianin pigmentek számos funkciót látnak el a növényekben, ideértve az ultraibolya és oxidatív stressz elleni védelmet, növelik a növények vonzerejét a beporzó rovarok tekintetében, és hozzájárulnak a magvak szétterjedéséhez is. Az antocianinok gazdasági megfontolásból is érdekesek, hiszen a vásárlói preferenciáknak az egészségtudatos táplálkozás felé való elmozdulásával, a lila gyümölcsök és zöldségek piaci értéke egyre növekszik, így ez szerepet játszik abban, hogy a fogyasztók előnyben részesítsék az antociánosodó fajtákat, immár nem csak díszítő funkciójuk miatt (Stommel et al., 2009).

Összesen 19 fajta antocianidin, aglikon vagy antocianin kromofor ismert, de ezek közül a hat leglényegesebb: pelargonidin, cianidin, peonidin, delfinidin, petunidin és malvidin. Színük nagymértékben függ a B-gyűrű hidroxilcsoportjainak számától; minél nagyobb a

csoportok száma, annál kékebb a szín. Az antocianinok O-metilezése enyhén pirosító hatással bír (Tanaka et al., 2008). Fontos megjegyezni, hogy a delfinidin az egyetlen antocianidin, amelyet eddig paprikában találtak (Aza-González et al., 2012).

### 2.3. Lila szín kialakulásának háttere

Az antocián bioszintézise az általános flavonoid bioszintetikus út kiterjesztése. Általában az antocianinok bioszintézise (cianidin, pelargonidin és delfinidin származékok) a bioszintetikus folyamat három fő útján keresztül zajlik, így a három fő ágba részt vevő strukturális gének transzkripció szabályozása számos növényfajban különböző flavonoid pigmentek termelődéséhez vezet (1. ábra).



1. ábra - Antocián bioszintézis útvonala (Liu et al, 2018)

A folyamatban részt vevő enzimek közé tartozik a fenilalanin ammónia-liáz (*PAL*), cinnamát 4-hidroxiláz (*C4H*), 4-kumarát, CoA ligáz (*4CL*), kalkon szintáz (*CHS*), kalkon izomeráz (*CHI*), flavanon 3-hidroxiláz (*F3H*), flavonoid 3',5'-hidroxiláz (*F3'5'H*), dihidroflavonol-4-reduktáz (*DFR*), antocianin szintáz (*ANS*) és UDP-glükóz, flavonoid 3-glükoziltranszferáz (*UFGT*) (1. ábra) (Aza-González et al., 2013; Jung et al., 2019). Ezenkívül

egy antocianin permeáz (*ANP*) és egy glutation S-transzferáz (*GST*) is feltételezhető, hogy részt vesznek az antocianin megkötésében a vakuólumban (Zhang et al., 2015).

Az összes flavonoid, köztük az antocianinok szintézisének prekursorai a malonil-CoA és a p-kumaroil-CoA. Legalább három enzim szükséges a szintelen dihidroflavonolok (dihidro Kempferol, a dihidro kvercetin (taxifolin) és a dihidro miricetin) antocianinokká történő átalakításához. Az első ilyen enzimátikus átalakulás a dihidroflavonolok flavan-9,4-cisz-dioldokká (leukoantocianidinek) történő redukálása dihidroflavonol-4-reduktáz által. A különböző leukoantocianidinek további oxidációja és glikozilációja a megfelelő téglavörös pelargonidin, vörös cianidin és kék delfinidin pigmenteket eredményezi. Az antocianidin-3-glükozidok sok fajban tovább módosíthatók glikozilezéssel, metilezéssel és acilezéssel (Holton & Cornish, 1995).

A lila és zöldpaprika transzkripciós és metabolom adatait elemezve arra következtettek, hogy az antocianin biológiai metabolizmusa összetett, és számos transzkripciós faktor és enzim befolyásolja. Két lila és egy zöld paprika génexpressziós mintázatát összehasonlítva azt találták, hogy a *PAL*, *C4H*, *CHI*, *DFR*, *ANS*, *UFGT* gének expressziója magasabb volt a lila mintákban. A metabolomot vizsgálva, egy vegyületet azonosítottak, amit csak a lila növényekben sikerült kimutatni, a delfinidin-kloridot (Meng et al., 2022).

Az antocianin bioszintézist szabályozó gének olyan transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek pozitív, vagy negatív irányban befolyásolják az antocianinok termelődését. *Capsicum* fajok esetében három transzkripciós faktor család vesz részt a bioszintetikus út szabályozásában, ez az: R2R3-MYB, bHLH-MYC és WD40 transzkripciós faktorok (Ramsay & Glover, 2005; Tanaka et al., 2008). Ezekebből a transzkripciós faktorokból alakul ki az úgynevezett MBW (MYB-bHLH-WD40) komplex, amely a struktúrgének promótereirekhez kapcsolódva szabályozza azok átírását (Stommel et al., 2009). A WD40 transzkripciós faktor a platformot biztosítja a bHLH és MYB transzkripciós faktorok fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakításának (Koes et al., 2005; Ramsay & Glover, 2005). Az R2R3-MYB aktiválja a bHLH fehérjét kódoló génnek expresszióját, majd együttesen szabályozzák a struktúrgének átírását (Liu et al., 2015). Az R2R3-MYB transzkripciós faktornak pozitív hatása van az antocianin bioszintetikus útra, mivel aktiválja azokat a struktúrgéneket amik a színes antocianinok termeléséért felelősek a termés korai fejlődési fázisában (Borovsky et al., 2004). További kutatásokban szintén kimutatták, hogy a MYB transzkripciós faktorok szerepe a legnagyobb. Stommel és munkatársai leírták, hogy a paprika gyümölcsében az antocianin felhalmozódásáért a *MYBa* és a *MYC* (*bHLH*)



gének egyaránt felelősek. Ezen gének transzkriptumai nagyobb mértékben voltak jelen az antociánt felhalmozó szövetekben, mint a nem pigmentáltakban (Stommel et al., 2009). A *CaMYBa* gén csendesítésével levelekben arra mutattak rá, hogy a *CaMYBa* transzkripció faktor elengedhetetlen szerepet játszik az MBW aktivációs komplexben, így az antocianin felhalmozódást, és a MYC-t pozitívan szabályozhatja (Zhang et al., 2015).

A MYB domén egy körülbelül 52 aminosavból álló régió, mely a DNS-hez szekvencia-specifikus módon kötődik. A c-MYB-ben ez a domén háromszor ismétlődik (R1, R2 és R3). A növényekben a MYB fehérjék domináns családjának két ismétlődése van (R2R3 a c-MYB ismétlődéseihez képest). Ezenkívül a c-MYB-hez szorosan kapcsolódó, háromszor ismétlődő MYB-eket azonosítottak növényekben, valamint egyre több, egyetlen MYB doménnel rendelkező MYB fehérjét is (Jin & Martin, 1999).

A MYB transzkripció faktor családnak más folyamatokban is nélkülözhetetlen szerepe van. Ilyen a különböző stresszekre adott válasz, differenciálódás és a metabolikus folyamatok lezajlása (Ambawat et al., 2013; Du et al., 2009; Kizis et al., 2001). Nem csak a pozitív, szabályozást idézhetik elő, hanem negatívan is befolyásolhatják az antocián bioszintézist a bHLH fehérjével konkurálva, erre az R3-MYB-ek képesek (Albert et al., 2014).

#### 2.4. Antociánosodást okozó egyéb tényezők

A paprikában az antocián felhalmozódást nem csak a gének képesek aktiválni, hanem számos környezeti tényező is. Ezek közé tartozik az abiotikus stressz, mint például a szárazság, a nehéz fémek, az ásványi anyagok hiánya és a hőmérsékleti stressz.

Példa erre, hogy alacsonyabb hőmérsékletnek kitett paprikákban megnövekedett expressziót mutattak a *CaMYBa*, *F3'5'H*, *DFR* és *ANS* esetén. A *CaMYBa* esetében a paprika szárában magasabb expressziós szintet detektáltak, miután UV-B és/vagy alacsony hőmérséklet kezelést kapott. A *CaMYBa* expressziója erősen indukálódik hat óra UV-B és/vagy 22 óra hidegkezelés után, illetve ezek kombinációjától (León-Chan et al., 2020).

A fény megléte fontos a lila szín kialakulásához. A lila paprika gyümölcsében található antocianinok 2 hét sötét periódus majd 48 órás fénykezelés után csak kis mennyiségben halmozódtak fel a perikarpiumban, bár az antocianin szintézist befolyásoló gén gyorsan expresszáldott (Zhou et al., 2022).

A hosszú ideig tartó, nagy intenzitású fény alatt nevelt paprika levelek magasabb antocianin pigmentációt mutattak, mint a gyengébb fényviszonyok között nevelt növények. A

*CaMYBa* expressziója magasabb volt alacsony hőmérséklet/erős fényviszonyok mellett, és a hőmérséklet nem befolyásolta az alacsony vagy sok fényen termesztett paprika leveleinek antocián tartalmát (Lightbourn et al., 2007).

Az antocián tartalom szárazságnak kitett növényekben fajonként változhat, ahogy azt a paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.), paprika (*Capsicum annuum* L.) és menta (*Mentha arvensis* L.) esetében vizsgálták. Szárazságnak kitett növények esetén az antocianinok csak a mentában halmozódtak fel, a paprikában nem változott, a paradicsomban pedig csökkent a mennyiségük. Giberrellin (GA3) kezelés hatására az antocianinok szintje nőtt a paprikában és a mentában kontroll körülmények között (Abdelkader 2015). Nehéz fémek közül a kadmium, réz, ólom, cink és vas által okozott stressz hatását vizsgálták, melyben a *CaMYB* család egyes génjeinek expressziós szintje megnőtt (Xie et al., 2022).

A lila szín kialakulást a paprikában környezeti tényezőkön kívül mutáció is okozhatja. A retrotranszpozon inszerciója a termés és egyéb szövetek színváltozását indukálhatja. A retrotranszpozonok beépülhetnek transzkripcióban aktív régiókba vagy azok közelébe, és mutációkat okozhatnak a gének megzavarásával, expressziójuk megváltoztatásával, vagy genomiális átrendeződésekkel (Kumar & Bennetzen, 1999).

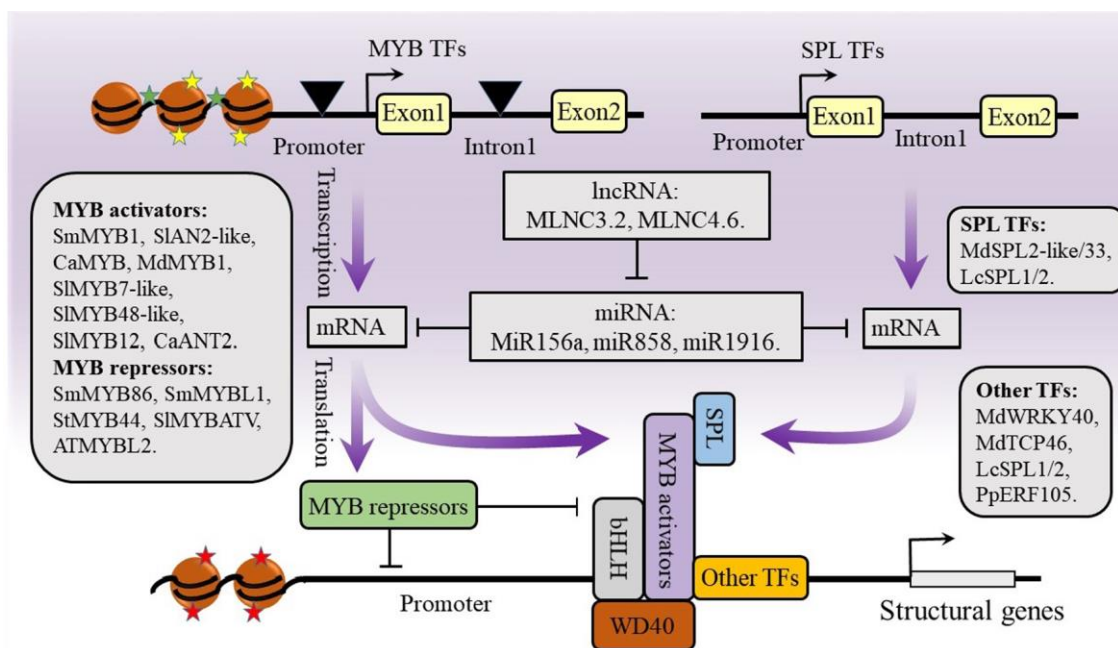
A paprikával ellentétben a szőlőben nem funkciónyeréses mutációt vált ki a retrotranszpozon inszerció, hanem (*Vitis vinifera*) a retrotranszpozon a *VvmybA* régiójába történő beépülésével, gátolta az antocián bioszintézist, ami fehér termést eredményez (Kobayashi et al., 2004).

A vérnarancs (*Citrus sinensis*) jellegzetes színének molekuláris alapja a *Ruby Myb* gén retrotranszpozon által közvetített transzkripció aktiválásából adódik. Az antocianin termelés hidegfüggősége a vérnarancsban a retroelem transzkripció hideg indukciójából adódik (Butelli et al., 2012).

A *PsMYB10.2* gén csak vörös húsú gyümölcsökben expresszálódik, melyet a japán szilvafélékben tapasztalt túlzott expresszió igazolta. Feltételezik, hogy az LTR retrotranszpozon elősegítheti a *PsMYB10.2* expresszióját és aktiválhatja az antocianin bioszintézis útvonalat (Fiol et al., 2022).

Egy másik kutatás során antocián termelő és nem termelő paprikákat kereszteztek, majd F<sub>2</sub> generációt vizsgálták. Ezután génexpressziós mintázat és antocián tartalom alapján is értékelték az eredményeket. A paprikában az R2R3-MYB transzkripció faktor kódoló *CaAn2*

(*CaMYBa* gén) gén szabályozza az antocianin bioszintézist. A *CaAn2* transzkripcióját a Ca-nLTR-A inszerciója, egy nem LTR retrotranszpozon aktiválja a *CaAn2* szabályozó régiójában, ami antocianin felhalmozódást eredményez a paprikában (Jung et al., 2019). Másik kísérletben a *CaMYBa* szekvenciájában kerestek különbséget fehér és lila paprikában, ahol Nikko és Peruvian Purple fajtákat kereszteztek. A lila Peruvian Purple paprikában szekvenálás során fedezték fel, hogy egy szekvencia beépült a *CaMYBa* promóter régiójába, amely a LINE-1 retrotranszpozon jellemző paramétereit mutatta (2. ábra) (Ohno et al., 2020).



2. ábra Transzkripció regulátor hálózata az antocián bioszintézisnek, fekete háromszög jelöli a retrotranszpozon beépülésének helyét (Li et al., 2022)

## 2.5. Antocián hatásai

A növények számára nélkülözhetetlen, hogy a környezeti tényezők ellen képesek legyenek védekezni, káros hatásukat csökkenteni. Az antocián számos ilyen tulajdonsággal bír.

Az antocianinok négy feltételezett funkciójának legújabb bizonyítékait: (1) fényvédők és antioxidánsok, (2) reaktív oxigénfajták (ROS) által kiváltott jelátviteli kaszkádok közvetítői, (3) kelátképző szerek fémek és/vagy metalloidek számára, és (4) a levelek öregedésének késleltetői, különösen a tápanyaghiányos növényekben.

Az antociánok magas intenzitású fényben, alacsony hőmérsékleten, tápanyaghiányban, valamint sebzési és kórokozók által halmozódnak fel a növényben (Steyn, 2009).

A reaktív oxigénfajták (ROS), például az  $O_2^{\bullet-}$ , a  $H_2O_2$  és az  $\bullet OH$  általában stressz körülmények között keletkeznek, és erős oxidáló aktivitást mutatnak. A ROS felhalmozódik a növényekben a kórokozók támadásával szemben, védekezési választ adva a növényben (Wojtaszek, 1997).

Az antociánok jelenléte nem csak a növényekben fejt ki pozitív hatását, hanem az emberek számára táplálék/folyadék formájában a szervezetbe juttatva is hasznos. Az antocianinban gazdag gyümölcslé DNS-védő és antioxidáns hatást mutatott, amely gyümölcslé fogyasztása eredményezte a testzsír jelentős csökkenését és a zsírintes tömeg növekedését. A szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitása szignifikánsan megemelkedett antocianinban gazdag gyümölcslé fogyasztása után (Bakuradze et al., 2019).

# 1. A vizsgálatok módszerei

## 1.1. Növényanyag

A kísérlet előzményeképp a két *C. annuum* fajtát keresztezték egymással. Apaként az extrém lila, LINE-1 retrotranszpozont hordozó 'Black Pearl' fajtát, anyaként pedig a fűszer típusú 'Kaldom' fajtát alkalmazták (1. táblázat.). Munkámat az F<sub>1</sub> nemzedék vizsgálatával kezdtem, és az öntermékenyítést követően az F<sub>2</sub> vizsgálatával folytattam.

**1. táblázat** – Szülők és fenotípusos adatai

Szerv	'Black Pearl'	'Kaldom'
Szár	Lila	Zöld
Nódusz	Lila	Alapvetően zöld, de lilulhat
Levélnyel	Lila	Zöld
Levéllemez	Lila	Zöld
Levélér	Lila	Zöld
Sziromlevél	Lila	Fehér
Portok	Lila	Lila
Bibe	Sötét lila	Fehér
Csészelevél	Lila	Zöld
Gazdaságilag érett termés	Lila	Zöld
Biológiailag érett termés	Piros	Piros



## 1.2. Módszer

### *F<sub>1</sub> nemzedék vizsgálatai*

Az F<sub>1</sub> nemzedéket két csoportra osztottuk, az egyik csoportot természetes fény alatt tartottuk, a másik csoportot pedig növénynevelő lámpa alatt (Osram Flouora (2800 lm) + Sylvania DaylightStar (6500 lm)). A fény és a retrotranszpozon inszerció hatását mind a vegetatív, mind a generatív szerveken vizsgáltuk, levelek mellett, a gazdaságilag érett

termésekről és biológiailag érett termésekről vettünk mintát, mivel a termések színe az érés előrehaladtával változik.

### *Analitikai vizsgálatok*

#### *Növényi kivonatok*

A totál polifenol tartalom (TPC) és a totál monomer antocianin tartalom (TMA) és az összes antioxidáns kapacitás (FRAP – Ferric Reducing Ability of Plasma) vizsgálatokhoz a paprika termést folyékony nitrogénben homogenizáltuk. A kivonást metanol:desztilláltvíz:hangyasav 60:39:1 térfogatszázalékú keverékével végeztük. A mintákat 4°C -on centrifugáltuk 20 percig, a mérésekhez a felülúszót használtuk. A totál flavonoid tartalom (TFC) vizsgálathoz a paprika bogyó maghéját felszeleteltük és milliQ vízzel extraháltuk 1:10 arányban.

#### *Totál Polifenol Tartalom - TPC*

A totál polifenol tartalmat Folin-Ciocalteu reagenssel mértük (1250 µl folin, 240 µl metanol:desztilláltvíz (80:20), 10 µl felülúszó, 1000 µl nátrium-karbonát)  $\lambda = 760$  nm-en Singleton & Rossi (1965) alapján, Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. Az abszorbancia eredményeket mmol galluszsav/1 g friss tömegré számítva adtuk meg (Singleton & Rossi, 1965).

A méréshez a következő reagenseket állítottuk össze:

- 50 ml Folin + 500 ml desztillált víz
- 80:20 metanol:desztillált víz (MeOH:DV)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 37,1 g/ 500 ml desztillált víz
- 3 mM galluszsav: 0,056 g / 100 ml desztillált víz
- 0,3 mM galluszsav: 100 µl 3 mM galluszsav + 900 µl MeOH:DV

A méréshez a következő kalibrációs sort állítottuk össze (2. táblázat).

**2. táblázat** - TPC méréséhez kalibrációs sor összeállítása

<b>Kalibráció</b>	<b>Folin (µl)</b>	<b>MeOH:DV (µl)</b>	<b>Galluszsav (µl)</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (µl)</b>
Vak1	1250	250	0	1000
Vak2	1250	250	0	1000
3	1250	200	50	1000
4	1250	150	100	1000
5	1250	100	150	1000
6	1250	50	200	1000
7	1250	0	250	1000

Az oldatokat 50 fokra beállított vízfürdőbe helyeztük 5 percre.

A kalibrációs sort követően a mintákat a következők szerint készítettük:

1250 µl Folin + 240 µl MeOH:DV + 10 µl minta + 1000 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

#### *Összes Antioxidáns kapacitás - FRAP*

Az antioxidáns kapacitást, FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) módszerrel határoztuk meg Benzie és Strain (1996) alapján ( $\lambda=593$  nm) Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. Az antioxidáns aktivitást az aszkorbinsav standard kalibrációs görbéje alapján számítottuk ki. Az eredményeket mmol aszkorbinsav egyenérték/1 g friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg (Benzie & Strain, 1996).

#### *Totál Flavonoid Tartalom - TFC*

A totál flavonoid tartalmat alumínium-klorid kolorimetriás módszerrel határoztuk meg Adefegha és Oboh, (2011) alapján, 0,5 ml felülúszóhoz 1,5 ml 95% -os etanol, 0,1 ml 10% -os alumínium-kloridot, 0,1 ml kálium-acetátot és 2,8 ml desztilláltvizet adtunk (Adefegha & Oboh, 2011). Az abszorbanciát  $\lambda = 415$  nm -en mértük Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel. A flavonoid tartalmat a kvercetin standard kalibrációs görbéje alapján számítottuk ki. Az eredményeket mg kvercetin egyenértékben fejeztük ki 1 g friss tömegre számítva.

#### *Totál Monomer Antocianin Tartalom - TMA*

A totál monomer antocianin tartalom mérést Giusti és Wrolstad, (1996) által leírtak szerint végeztük (Giusti & Wrolstad, 1996). A 250 µl mintához 2 ml kálium-hidroxid (pH 1,0) és nátrium-acetát (pH 4,5) puffereket mértünk. 15 perc elteltével az abszorbanciát Jenway 6105 UV/Vis spektrofotométerrel mértük  $\lambda = 520$  nm és  $\lambda = 700$  nm hullámhosszon. Az eredményeket µg cianidin-3-glükozid/1 g friss tömegre adtuk meg.

A következő formulát használtuk az eredmények értékeléséhez:

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

Ahol  $A=(A_{520}- A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$ ,  $MW = 449.2 \text{ g/mol}$  cianidin-3-glükózid,  $Df = \text{hígítás}$ ,  $\epsilon = 26,900$  extinkciós koefficiense a cianidin-3-glükózidnak.

### *Genotipizálás*

#### *DNS izolálás*

A szülői és  $F_1$  vonalak esetén genomi DNS-t a levélmintákból E.Z.N.A.® HP Plant DNA Mini Kit protokoll szerint izoláltuk. A nukleinsav mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Az izolált DNS-eket  $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$  koncentrációra hígítottuk a PCR-hez. A PCR-eket Bio-Rad készülékben végeztük, ThermoScientific™ DreamTaq polimeráz felhasználásával a gyártói protokoll alapján. A primereket az 4. táblázat tartalmazza.

#### *Génexpresszió vizsgálata*

RNS izoláláshoz a OMEGA E.Z.N.A.® Plant RNA kitet, az RNS visszairásához pedig Thermo Scientific™ RevertAid First Strand cDNA Synthesis kitet és oligo-dT primert használtunk a gyártó ajánlása alapján. A qPCR-t Stratagene készülékben, Thermo Scientific™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix-el, valamint a 4. táblázatban feltüntetett primerek felhasználásával végeztük.

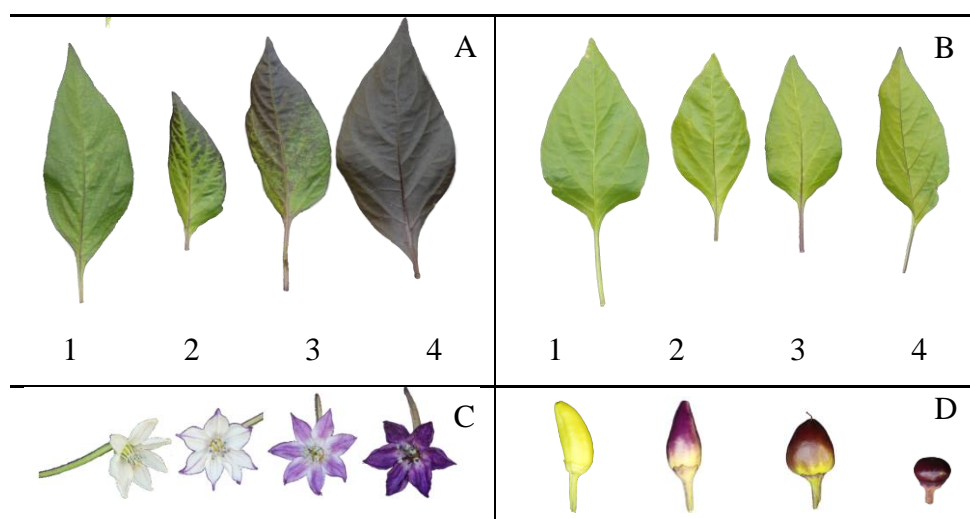
#### *Az $F_2$ nemzedék vizsgálatai*

#### *Fenotipizálás*

A 198 darab  $F_2$  paprika fenotípusos adatainak felvételezése 2 hetente történt. Az adatok rögzítését a vegetatív szervek közül a nádusz, szár, lomblevél, levélér, levélnyél, a generatív részek közül pedig, a csészelevél, szíromlevél, portok, bibe, és termés szín tekintetében egy négy fokú skálán végeztük (3. táblázat).



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



### Genotipizálás

A 198 F<sub>2</sub>-es növény közül 103 növényből vontunk ki DNS-t, amihez a Macherey-Nagel™ Nucleospin™ Plant II Kit-et használtuk a gyártói ajánlás szerint. Az izolált DNS-eket 20 ng/μl koncentrációra hígítottuk a PCR-hez. A PCR-eket Bio-Rad készülékben végeztük, ThermoScientific™ DreamTaq polimeráz, vagy Promega *GoTaq*® Long PCR Master Mix felhasználásával a gyártói protokollok alapján. A primereket a 4. táblázat tartalmazza.

### Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai értékeléséhez (átlag és szórás, normalitás vizsgálat, ANOVA) SPSS 25 programot használtunk, 95%-os megbízhatósági szintet (P-érték  $\leq 0,05$ ) tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A qPCR-t ddCT módszerrel értékeltük, a hőtésképeket pedig a TBtools programmal készítettük el (Chen et al., 2020).

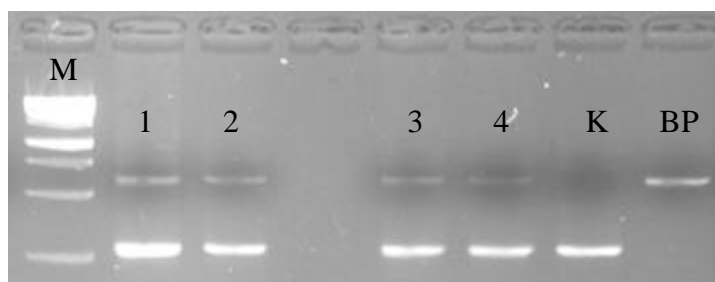
**4. táblázat** – A vizsgálatokhoz használt primerek, szekvenciáik, tapadási hőmérsékletük, és alkalmazásuk módja

Primer	Szekvencia 5'-3'	T <sub>A</sub> (°C)	Alkalmazás módja
CaMYBaLINE-1 FW1	GCAAAGAGCAAGGGACACAGCTC	60	Retrotranszpozon kimutatása
CaMYBaLINE-1 FW2	GACGCGAATTACGGCAGAGGATTAG		
CaMYBaLINE-1 R	CGGTGTCTTGTGGATCGGACATCC		
ACT – FW	GGACTCCGGTGATGGTGT	61	Génexpressziós vizsgálatok
ACT – R	GTCCTGACAATTTCTCGCTCAG		

Ca10g11650 – FW	TGGCTGCAGTTGGGATCTTT	61	
Ca10g11650 – R	TCCCAACCATCACTTTGTCCT		
Ca10g11690 – FW	TACTCGCCTTCTGAGGAAGGTA	61	
Ca10g11690 – R	TGGTACTTGAGAAGTTCCGAGG		
Ca10g11710 – Fw	GACAGCGAGCGATGTGAAAA	61	
Ca10g11710 – R	GGCACTTGAGAAGTTCTGTGG		
TTG1 – FW	TGGGGAAACTACACAAGCTCA	61	
TTG1 – R	TCCACTCGAAAGAGGGGACA		
CHS – FW	AGGAGGTTCTGAAGGGAACAA	61	
CHS – R	CCATCACCAAAGAGTGCTTG		
ANS – FW	ACCAGAAGTAGCACTTGGCG	61	
ANS – R	ACCAGAAGTAGCACTTGGCG		
DFR – FW	CTAACACAGGGAAGAGGCTGGTTT	61	
DFR – R	AATCGCTCCAGCTGGTCTCATCAT		
<i>F<sub>2</sub> nemzedék vizsgálatához használt primerek</i>			
CaMYBaLINE-1 FW1	GCAAAGAGCAAGGGACACAGCTC	60	Retrotranszpozon kimutatása
CaMYBaLINE-1 FW2	GACGCGAATTACGGCAGAGGATTAG		
CaMYBaLINE-1 R	CGGTGTCTTGTGGATCGGACATCC		
CaMYBaLINE-1 FW1	GCAAAGAGCAAGGGACACAGCTC	60	Long PCR – retrotranszpozon kimutatása
CaMYBaLINE-1 teljes R	AGTTAGGTTCAAATTGAGGTGTCC		
EPMS-924 f	GCCGTCGTCAGAAAAGGTAG		
EPMS-924 r	TGCATTTCTGTCAGAGGCTG		
EPMS-418 F	ATCTTCTTCTCATTCTCCCTTC		
EPMS-418 R	TGCTCAGCATTAACGACGTC		
EPMS-303 F	AAAACCTCAAACCTACCCCTGG		
EPMS-303 R	TTAAGCGTAGCGCTTGTGTG		
CAMS-647 F	CGGATTCGGTTGAGTCGATA		
CAMS-647 R	GTGCTTTGGTTCGGTCTTTC		
CAMS-066 F	AAAACATGCACCAGTCCTT	60	SSR analízis
CAMS-066 R	CAACCGCCTGAATTTTCTCT		
EPMS-718 F	TCACTCGTTATATTTTCTGTCTCG		
EPMS-718 R	CTGCTGAAGCGTGGTGAATA		
EPMS-750 F	GGGATCCGAATCAGAATACG		
EPMS-750 R	TCTAGGTTTCGGGGAGGATT		
CAMS-811 F	GAAGAAACGAAGGATGAACAAAA		
CAMS-811 R	CCTGTTTCTTCTTCCTCAGC		
CAMS-855 F	AAGTGTCAAGGAAGGGGACA		
CAMS-855 R	CCTAACCACCCCAAAAGTT		

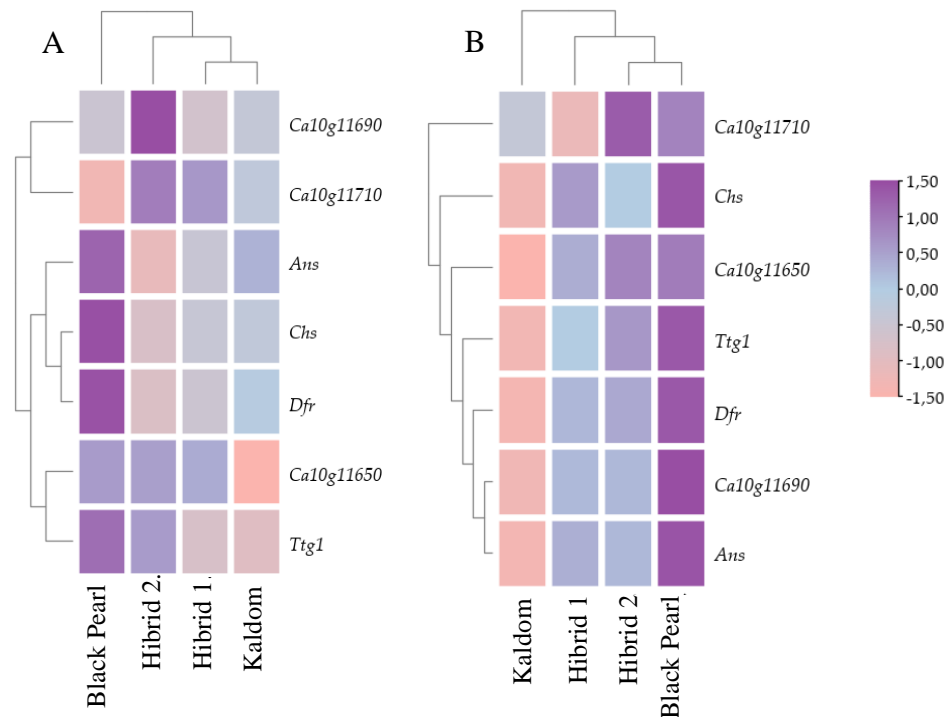
## 2. Eredmények és értékelésük

Az F<sub>1</sub> növények első lombleveléből izoláltunk DNS-t. A LINE-1 retrotranszpozon inszercióra előzetesen tervezett primerekkel teszteltük őket, hogy bizonyíthassuk, hogy valóban hibridek. Az F<sub>1</sub> növények mindegyikében detektáltuk mind az anyai allélt (körülbelül 250 bp), mind pedig az apára jellemző fragmentumot (körülbelül 600 bp) (3. ábra).



**3. ábra** – molekula tömegmarker, 1, 2: F<sub>1</sub> Hibrid 1. csoport, 3, 4: F<sub>1</sub> Hibrid 2. csoport, 5: 'Kaldom' (K), 6: 'Black Pearl' (BP)

Az F<sub>1</sub> növényeket két csoportra osztottuk, az első csoportot természetes fény alatt, a második csoportot pedig növénynevelő lámpa alatt tartottuk, hogy a retrotranszpozon inszerción túl a fény antocián bioszintézisre gyakorolt hatását is vizsgálhassuk. Ehhez levélmintát a legfelső levélemeletről szedtük, a terméseket pedig gazdasági érettségükben vizsgáltuk. Erre azért volt szükség, mert még a LINE-1 inszerció hatása miatti extrém mértékű antocián felhalmozódás is tranziens a 'Black Pearl' bogyóiban, az érésfázis függvényében változik a bogyó színe. Az RNS izolálást és a cDNS szintézist követően qPCR-t végeztünk. A qPCR során négy, az antocián bioszintézisben szabályozó szerepet betöltő génnek, és három struktúrgénnek vizsgáltuk az expresszióját (4. ábra).



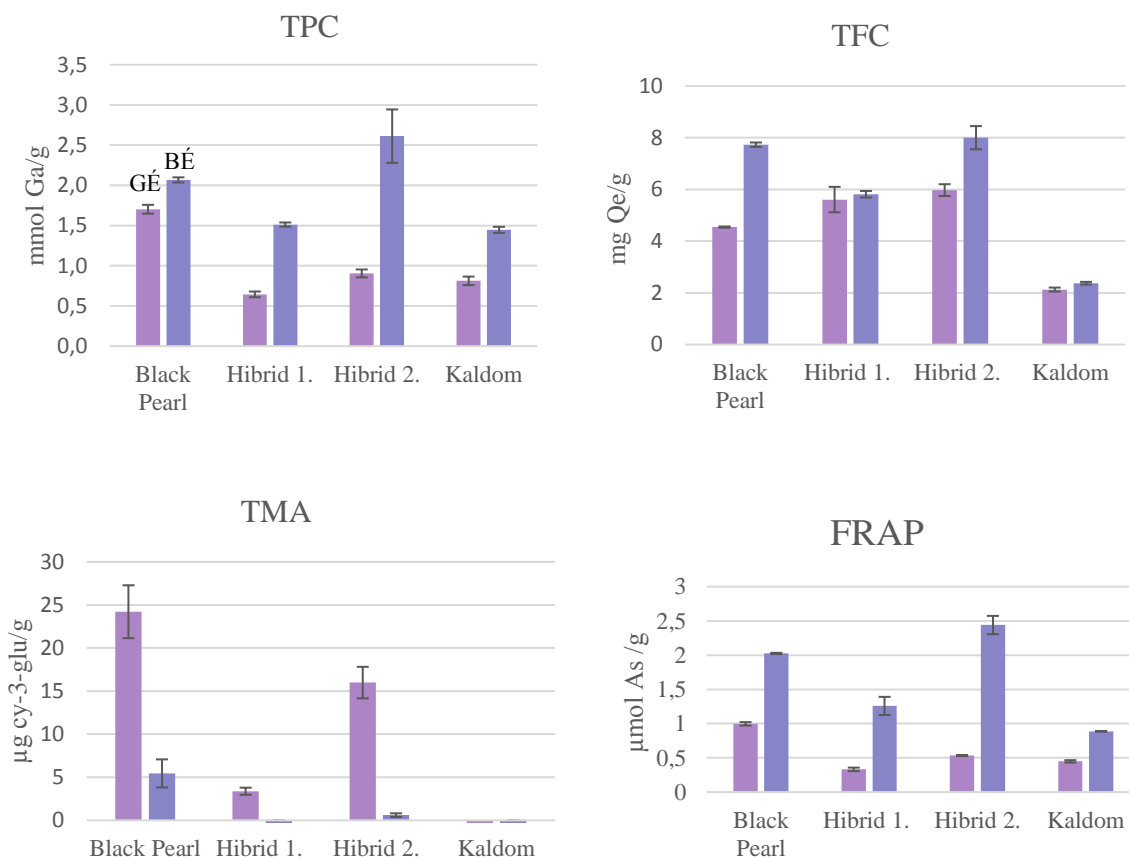
**4. ábra-** génexpressziós mintázat levelekben (A) és bogyókban (B)

A struktúrgének közül egy korai – csalkon szintáz (*CHS*) - és két kései gént – antocianidin szintáz (*ANS*) és dihidroflavonol reduktáz (*DFR*) vizsgáltunk. 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 összevetettük a szülői genotípusokéval.

A levelekből és a bogyókból izolált minták esetén is, 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. Míg a szakirodalom abban nagyjából egyetért, hogy a szabályozó R2R3-MYB transzkripciós faktorok a bioszintetikus út kései géneire hatnak, ellentmondásos eredmények születnek a korai gének szabályozásáról. Borovsky és munkatársai (2004) nem találtak összefüggést a szabályozó MYB-ek és a *CHS* expressziója között, ahogy Zhang et al. (2015) sem. Lightbourn et al. (2007), Stommel et al. (2009), Aza-González et al. (2013) ellenben pozitív összefüggést detektált a *CHS* expressziója és a MYB transzkripciós faktorok expressziója között (Borovsky et al., 2004; Zhang et al., 2015, Lightbourn et al., 2007; Stommel et al., 2009, Aza-González et al., 2013). Ezt erősítik a mi eredményeink is. A liluló szövetekben magasabb *CHS* expressziót detektáltunk. 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, amit növénynevelő lámpa alatt tartottunk. Gazdasági érettségben a 'Kaldom' bogyója zöld, az antocián bioszintézisben akár struktúrgén akár szabályozó szerepet betöltő gén expresszióját csak kis mértékben detektáltuk. 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 detektáltunk (5. ábra).

A génexpresszió mérésével párhuzamosan analitikai vizsgálatokat is végeztünk az F<sub>1</sub> növényekből képzett csoportokon. Azokat a beltartalmi mutatókat vizsgáltuk, amelyekre feltételeztük, hogy hathat a LINE-1 inszercióval járó funkcionyeréses mutáció miatt megnövekedett antocianin tartalom. Az analitikai vizsgálatokat gazdasági érettségben (GÉ), és teljesen biológiai érettségben (BÉ) lévő bogyókkal végeztük, mértük a totál polifenol (TPC), totál monomer antocianin (TMA), totál flavonoid tartalmukat (TFC) és összes antioxidáns kapacitásukat (FRAP) a mintáknak (5. ábra).



**5. ábra** – Beltartalmi mutatók gazdasági érettségű (GÉ) és biológiai érettségű (BÉ) termékek esetén

Az antocianin tartalom kivételével, minden mért beltartalmi mutató magasabb értékeket mutatott a teljes biológiai érettségben lévő minták esetén. Holott, azt vártuk, hogy a gazdasági érettségben lévő bogyók megnövekedett antocianin tartalma hozzá fog tenni mind a polifenol, mind az antioxidáns kapacitáshoz. Howard et al, Sora et al azt találták, hogy a TPC-t leginkább befolyásoló tényező, az nem az érésfázis, hanem a kiindulási szövet, illetve a vizsgált genotípus (Howard et al., 2000; Sora et al., 2015). A legmagasabb polifenol tartalmat a növénynevelő lámpa alatt tartott Hibrid 2.-es csoportban mértük teljes biológiai érettségben, 2,61 mg galluszsav egyenérték / 1 g friss tömeg. Ugyanebben az érésfázisban a 'Kaldom' mutatta a legkisebb értéket. Gazdasági érettségben a 'Black Pearl' fajtában mértük a legmagasabb értéket 1 g friss tömegre vonatkoztatva (5. ábra).

A TFC esetén szintén valószínűsíthető egy erősebb genotípusos hatás, hiszen a 'Black Pearl'-el ellentétben mindkét vizsgált érésfázisban a Hibrid 2. csoport növényei mutatták a legmagasabb értékeket, 5,97 és 8,99 mg quercetin egyenérték / 1 g friss tömeg. A mért értékek 2,12 és 8,99 mg quercetin egyenérték / 1 g friss tömeg közt szórnak, ami egybeesik Garra et al. (2020) eredményeivel, kutatásukban 3,14 és 8,90 mg Qe / 1 g friss tömeg közt szórtak az értékek (5. ábra) (Garra et al., 2020).

Antocianin tartalmat csak a hibridekben, illetve a 'Black Pearl' fajtában detektáltunk. A természetes fény alatt tartott csoport teljes biológiai érettségében már nem tartalmazott antociánt, de a növénynevelő lámpa alatt tartott Hibrid 2. növényekben ki tudtuk mutatni. A 'Kaldom' fajta nem halmoz fel antocianint, sem gazdasági, sem biológiai érettségben (5. ábra.).

Az összes antioxidáns kapacitás erős korrelációt mutat a TPC értékekkel. A nem liluló 'Kaldom' fajta és a természetes fény alatt tartott Hibrid 1. csoport eredményezte a legalacsonyabb értékeket, míg a 'Black Pearl' és a Hibrid 2. csoport a két vizsgált érésfázis tekintetében átlagosan ugyanakkora értéket mutatott. A 'Black Pearl' paprikában magasabb értékeket mértünk a gazdaságilag érett bogyókban, a Hibrid 2.-es növények magasabb értékeket produkáltak a teljes biológiai érettségben (5. ábra).

Kevesebb eredmény lelhető fel az eltérő megvilágítás egyéb polifenolos vegyületekre kifejtett hatásáról. Egy kétéves kísérlet során Díaz-Pérez és munkatársai a paprika beltartalmát vizsgálták 2 csoport esetén; az egyik csoport azon növényekből épült fel, melyeket különböző színű árnyékhálóval takarták le, és a kontroll csoportnak alkalmazták a takaratlan növényeket. Eredményeik alapján, a termésekben a TPC, TFC és az összes antioxidáns kapacitás magasabb értékeket mutatott a takaratlan növényeknél. Ugyanezeknél a beltartalmi mutatóknál csökkenő

tendenciát tapasztaltak, az egyre sötétebb árnyékolóhálók alkalmazásával (Díaz-Pérez et al., 2020). Szabadföldi, üvegházi és üvegházi árnyékolóhálóval takart növények beltartalmának összehasonlítását végezték el Angmo és munkatásai. Az árnyékolás szignifikánsan változtatta meg a polifenolos vegyületek mennyiségét és összetételét a termésekben, míg a szántóföldön és üvegházban nevelt növények terméseinek a totál polifenol és totál flavonoid tartalma nem különbözött szignifikánsan (Angmo et al., 2021).

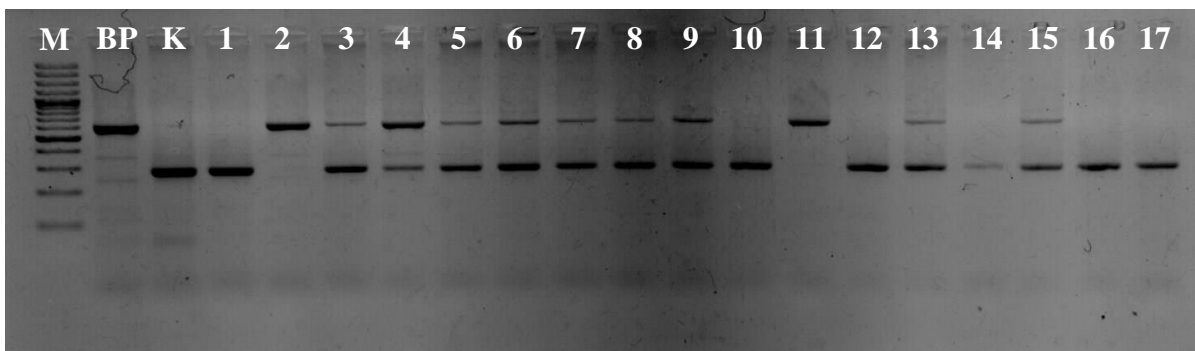
Kék fény (470 nm) hatását vizsgálták a totál polifenol, C-vitamin és az összes antioxidáns kapacitás mértékére. A megvilágítás hatására ezen beltartalmi mutatók értékei növekedtek, ugyanakkor ezt a növekedést nem a fény intenzitása okozta, hanem a spektrumnak az eltérése, mert vörös fény (660 nm) hatására nem volt szignifikáns változás, csak a karotionid bioszintézisben (Pola et al., 2019). Kísérletünk során a Hibrid 1. csoportot a csírázástól a mintagyűjtés napjáig naponta átlagosan  $2304 \text{ W/m}^2$  globális sugárzás érte, a Hibrid 2. csoport ugyanennyi idő alatt átlagosan naponta  $3200 \text{ W/m}^2$  sugárzást kapott. Gazdasági és biológiai érettségű termésekben a beltartalmi mutatók magasabb szintet mutattak a Hibrid 2. csoportunk esetében, mint a Hibrid 1. csoporté. A Hibrid 2. csoportban a totál flavonoid tartalom értéke még a 'Black Pearl'-nél is magasabb volt mindkét érésfázisban, az antioxidáns kapacitást tekintve gazdasági érett fázisban mértünk magasabb szintet (5. ábra). Az előzőekben említett Díaz-Pérez és Angmo eredményeivel összezsengenek az általunk kapott adatok, mely szerint a nagyobb fényintenzitás növeli a növények totál polifenol, totál flavonoid és az összes antioxidáns kapacitását a kevesebb fényt kapó növényekhez képest (Angmo et al., 2021, Díaz-Pérez et al., 2020).

Az F<sub>1</sub> növények öntermékenyítését követően magot fogtunk róluk, és a Molekuláris Genetika és Nemesítés csoport üvegházába tőzeges palántanevelő földbe vetettük őket 10\*10 cm-es cserepekbe (6. ábra).



**6. ábra** – kelő F<sub>2</sub> növények

Ahogy az F<sub>2</sub> növények elérték az első valódileveles kort, megkezdjük rajtuk a genotipizálást és a fenotipizálást is (6. és 7. ábra). A fenotipizálást 2 hetente végeztük 10 hetes perióduson keresztül. Ahhoz, hogy a fenotípusos adatokat kiértékelhetően össze tudjuk vetni a genotípussal, 103 növényből izoláltunk DNS-t.



**7. ábra** – az F<sub>2</sub> növények genotipizálása, M: molekula tömegmarker (ThermoScientific GeneRuler 100 bp Plus), BP: 'Black Pearl', K: 'Kaldom' 1-17: F<sub>2</sub> növények

Hasadó populáció lévén, az F<sub>2</sub> egyedek között detektáltunk olyan genotípusokat, amelyek csak anyai allélt hordoztak (például 1-es, 10-es növény), vagy csak apai allélt hordoztak (2-es növény, 11-es növény), vagy esetleg heterozigóták (például 3., 4., 5. minta) (7.



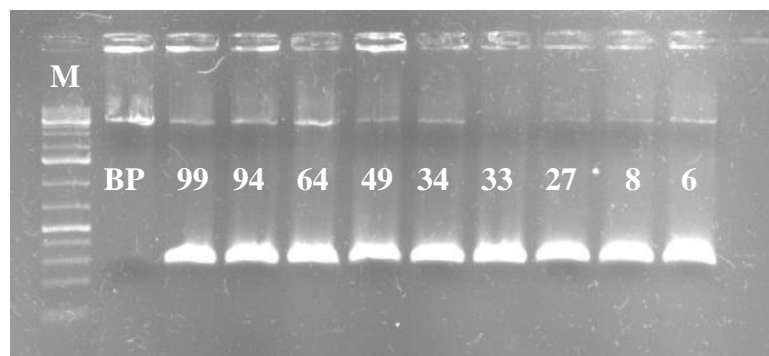
ábra). Az F<sub>2</sub> növények genotipizálásához ugyanazt a marker rendszert alkalmaztuk, amivel az F<sub>1</sub> egyedekben bizonyítottuk a retrotranszpozon inszerciót.

A genotipizált paprikákat véletlenszerűen válogattuk ki, a tesztelt mintákban 31 csak anyai allélt, 27 csak apai allélt hordozó és 45 heterozigóta genotípusú egyed volt. Mivel a heterozigóták között óriási volt a változatosság, Long PCR-rel teszteltük, hogy a retrotranszpozon teljes hossza kimutatható-e a vizsgált egyedekben.



**8. ábra** – F<sub>2</sub> növények változatossága nem csak az antociánosodásban, de a bogyó alakjában is megnyilvánult

A Long PCR-hez a 'Black Pearl'-t használtuk kontrollnak. A minták a legkülönbözőbb fenotípusú heterozigóta egyedek közül kerültek ki. A 'Black Pearl' fajtából csak a retrotranszpozonra jellemző fragmentumot amplifikáltuk, míg a heterozigóták mindegyikében megkaptuk az anyai allélt, és a teljes hosszúságú retrotranszpozont is.



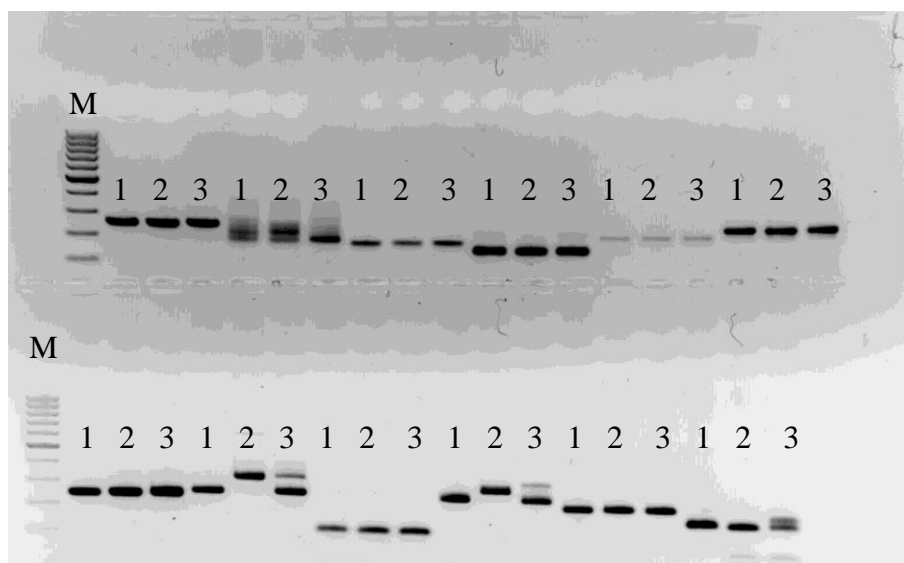
**9. ábra** – Long PCR a 'Black Pearl'-el és a heterozigótákkal, M: molekula tömegmarker (ThermoScientific GeneRuler 1 kb Plus), BP: 'Black Pearl', 99-6: F<sub>2</sub> növények

A genotípusos adatokat összevetettük a fenotípusos adatokkal, így találtunk 10 növényt, amely esetekben a paprikák ellentmondó eredményeket produkáltak, ebből pár genotípus-fenotípus ellentmondást a következő 10. ábra mutat be, a képek bal oldalán az apai allélt hordozó, de fenotípusában az apával ('Black Pearl', jobb oldali paprika) nem egyező növény látható (10. ábra). A 36-os növényben (A) genotipizálás során az apai allélt detektáltuk, viszont fenotípusában a heterozigótákhoz áll közelebb, ugyanezt találtuk 78-as (B) és 11-es (C) növény esetén is (10. ábra).



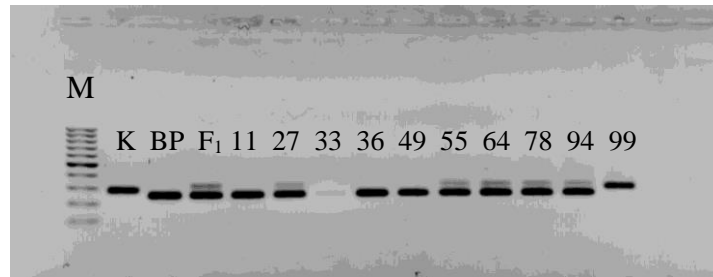
**10. ábra** - ellentmondó fenotípusos – genotípusos adatokra példa, A: 36, B: 78, C: 11-es növény, a 'Black Pearl'-el összehasonlítva

Hogy ezeket a növényeket tovább vizsgálhassuk SSR analízist is végeztünk. A több markert teszteltünk, a tesztek eredményét az 11. ábra mutatja be.



**11. ábra** – SSR tesztek az P és F<sub>1</sub> nemzedéken, M: molekula tömegmarker, 1: 'Black Pearl', 2: 'Kaldom', 3: F<sub>1</sub>

A tesztek után a polimorf mintázatot mutató markerekkel teszteltük mind az szülői, F<sub>1</sub> és a fenotípusos eltérést mutató F<sub>2</sub> egyedeket (12. ábra).



**12. ábra** – polimorf mintázatot produkáló SSR marker, CAMS-855, mintasorrend: 'Kaldom', 'Black Pearl', F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>: 11, 27, 33, 36, 49, 55, 64, 78, 99 kódú egyedek

A különböző markerekkel végzett vizsgálatokban az elemzett marker lokuszok allél összetételéből nem lehet egyértelműen az anya, vagy az apa fenotípusára következtetni. Ennek oka lehet, hogy a növény megjelenését a funkcionális gén lokuszokban lévő allélok határozzák meg. Ezzel szemben a marker allélok a nem kódoló genomi régiókban vannak (12. ábra). Így tervezzük egy olyan marker rendszer bevonását, ami a kódoló régiót célozza meg.

Az 5. táblázatban foglaltuk össze az 'A Vizsgálatok Módszerei' fejezetben bemutatott 4 fokú antociánossági skálán felvett fenotípusos adatok átlagát és szórását, illetve ez a táblázat tartalmazza a vizsgált 10 szövet adatait az 5 felvételezési időpontban, az F<sub>2</sub> növények genetikai háttere szerint csoportosítva. A portok kivételével a csak anyai allélt hordozó genotípusok átlaga 1,00 és 2,71 közt volt, a csak apai allélt hordozó növények átlaga 2,74 és 4,00 közt, a heterozigóták átlaga pedig 1,33 és 3,49 között volt, szövetről és időponttól függetlenül (5. táblázat).

Minden vizsgált szövet esetén (szár, nádusz, levélnyél, levéllemez, levélér, szíromlevél, portok, bibe, csészelevél, illetve termés) azt figyeltük meg, hogy az idő múlásával mind a csak anyai, vagy csak apai allélt hordozó, illetve a heterozigóta egyedek is egyre kevésbé lilák. A növények azonos körülményeknek voltak kitéve, így feltételezzük, hogy a csökkenő antocián tartalom a genetikai háttér által befolyásolt.

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

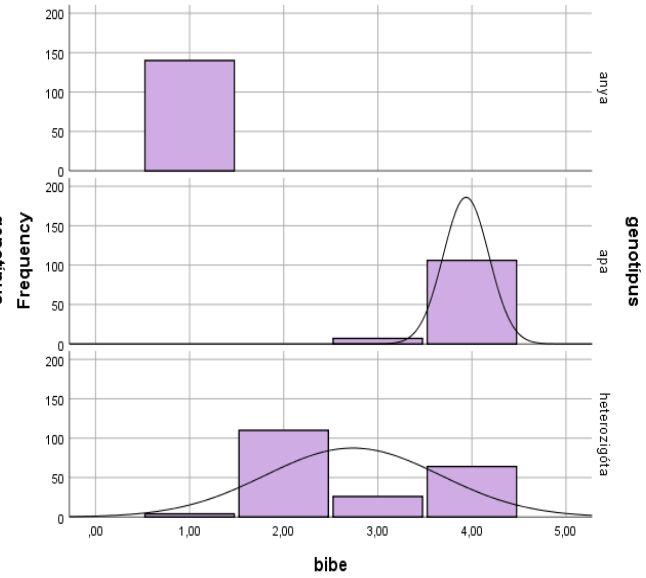
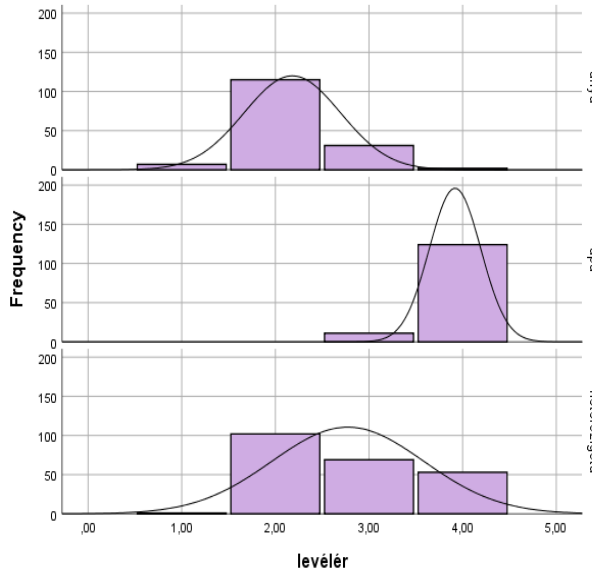
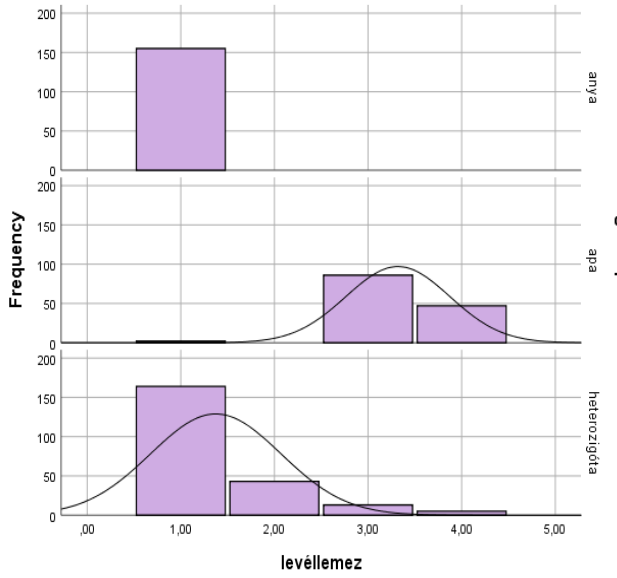
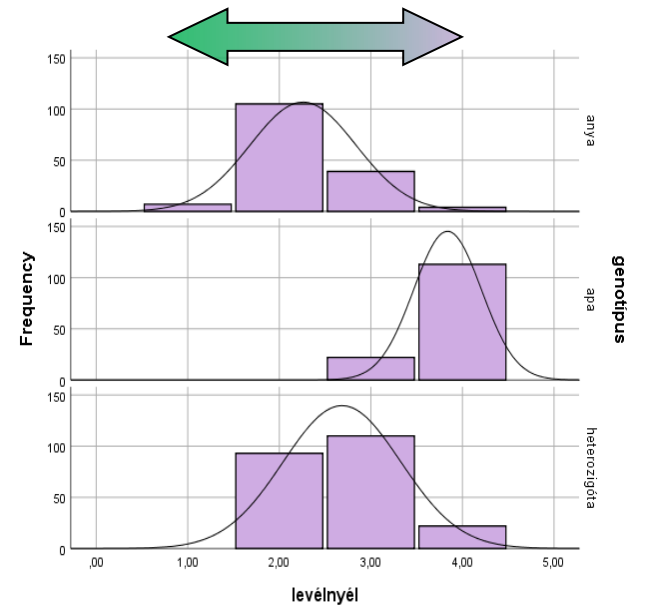
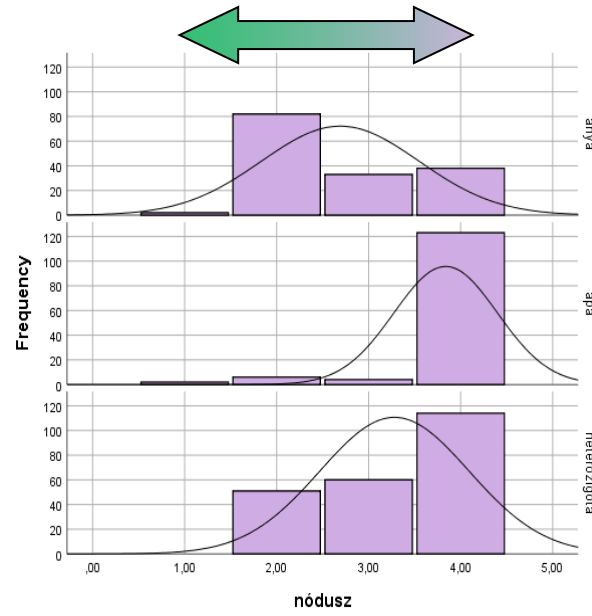
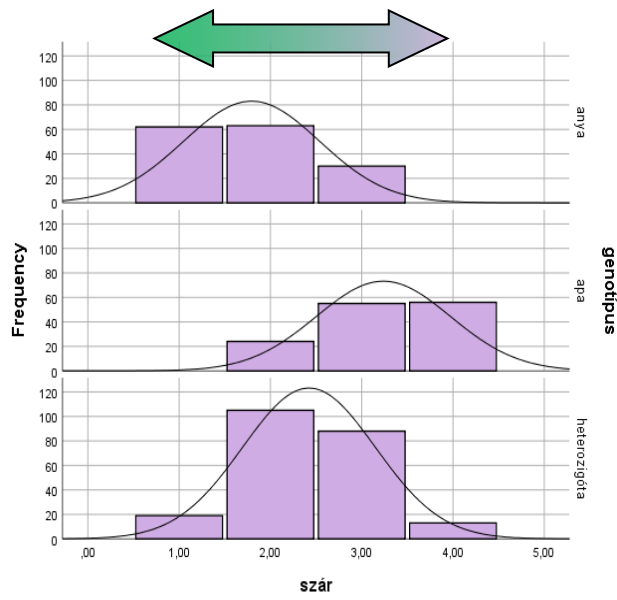
		szár	nóduz	levélnyel	levéllemez	levélér	szíromlevél	portok	bibe	csészelevél	termés
2. hét	anya	2,06 <sub>a</sub> +0,11	2,71 <sub>a</sub> +0,14	2,19 <sub>a</sub> +0,11	1,00 <sub>a</sub> +0,00	2,32 <sub>a</sub> +0,13	1,00 <sub>a</sub> +0,00	4,00+0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,00 <sub>a</sub> +0,00	1,00 <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

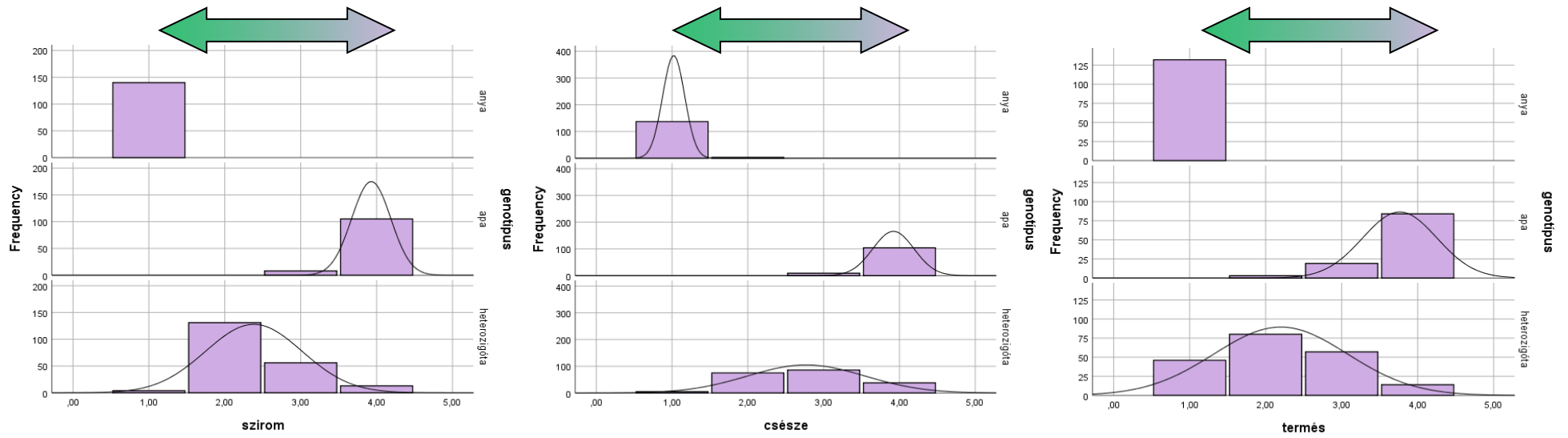
Jegyzet: Egy oszlop egy altáblázatában lévő azonos betűvel ellátott adatok szignifikánsan nem különböznek egymástól a  $p < 0,05$  szinten

Az egyes szövetekre vonatkoztatott szín erősséghez kötött értékek eloszlás mintázatához csoportokat képeztünk a csak anyai allélt hordozó, csak apai allélt hordozó, illetve a heterozigóta egyedekből. 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).

Generatív és vegetatív szervek szerint csoportosítva, a generatív szervek esetében az anyai genotípusú  $F_2$  egyedek az egyes érték körül érik el a maximumukat, míg a retrotranszpozon inszerciót mindkét allélon hordozó apai egyedek erőteljesebb lilulást mutatnak. A heterozigótáknál, amely egyedek csak egyik alléljukon hordozzák a LINE-1 non-LTR retrotranszpozon inszerciót, megfigyelhetjük, hogy mind a bibe, szíromlevél, csészelevél és termés is a köztes értéknél, azaz az apai és anyai genotípus átlagánál van a görbe csúcsa, mely a *Ca10g11650*-es gén expressziójának fenotípusos realizációját mutatja, tehát feltételezzük, hogy ezekben a szövetekben mind működik a *Ca10g11650*, azaz a *CaMYBa* és hozzájárul a fenotípus kialakításához (13. ábra).

A vegetatív szerveknél például a szár és a nódusz esetében az anyai genotípusú egyedek is mutatnak egy alacsonyabb mértékű antociánosodást, így egyértelmű következtetéseket nem tudunk tenni ezen szövetek esetében. A levéllemez színének tekintetében az anyai genotípusú  $F_2$  egyedek nem lilulnak, az apai genotípusúak lilák, a heterozigótáknál pedig ez eddigi eredményekkel ellentétben a színintenzitás az anyai genotípushoz van közelebb. Ez alapján feltételezzük, hogy a levéllemez antociánosodásáért nem egyedül a *Ca10g11650* gén felelős.





13. ábra - Szinerósség eloszlás vegetatív és generatív szervekben

Az előzőekben számszerűsített adatoknak varianciáját elemeztük. Az így kapott F értékeket az egyes szervekre összehasonlítottuk a mintavételre, a genotípusra, és a mintavétel × genotípusra vonatkozóan. Az eredményeket az 6. táblázatban foglaltuk össze. Minden szövet esetén kiemeltük a legnagyobb F értéket, mely a legerősebb hatást jelzi. Egyértelműen kijelenthetjük, hogy a genotípussal van összességében a legnagyobb hatás, mivel minden esetben ehhez tartozott a legnagyobb F érték (6. táblázat).

**6. táblázat –** Varianciaanalízis

<b>F értékek</b>	<b>szár</b>	<b>nódusz</b>	<b>levélnyel</b>	<b>levéllemez</b>	<b>levélér</b>	<b>szíromlevél</b>	<b>bibe</b>	<b>csészelevél</b>	<b>termés</b>
mintavétel	16,42	3,83	0,34	0,31	0,52	0,12	1,27	0,03	3,1
genotípus	<b>95,12</b>	<b>51,85</b>	<b>187,11</b>	<b>512,95</b>	<b>182,41</b>	<b>1059,04</b>	<b>587,94</b>	<b>797,54</b>	<b>491,24</b>
mintavétel × genotípus	0,25	4,08	0,09	0,33	0,41	0,09	1,24	0,08	1,5

A LINE-1 retrotranszpozon öröklésmenetét a hasadó populáció segítségével elemeztük. Az F<sub>2</sub> nemzedéket tekintve a virágszírom megoszlása (43:88:65- lila:átmeneti:fehér), mely az elvárt 1:2:1 hasadási aránytól eltérő eredményt mutat. A termést vizsgálva a 3:1 aránynak a hasadás nem felel meg, amelyből arra következtethetünk, hogy az antociánosodás nem egy lókusztól befolyásolt, mint ahogy Ohno és munkatársai leírták (7. táblázat) (Ohno et al., 2020).

**7. táblázat:** Fenotíposos megoszlás az F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> nemzedékekben

	<b>F<sub>1</sub> és F<sub>2</sub> nemzedék</b>	<b>Egyedszám</b>	<b>Egyedszám</b>			<b>Várt hasadás</b>	<b>x<sup>2</sup> (p érték)</b>
			<b>Lila</b>	<b>Átmeneti</b>	<b>Fehér/zöld</b>		
szírom termés	F <sub>1</sub>	5	- 5	5 -	-	0:1:0 1:0	
szírom termés	F <sub>2</sub>	196 103	43 72	88	65 31	1:2:1 3:1	x <sup>2</sup> =6,98 (p=0,001) x <sup>2</sup> =1,43 (p=0,2)



### 3. Következtetések és javaslatok

A dolgozatom alapját a 'Black Pearl' egy LINE-1 retrotranszpozon inszerciót hordozó minden szövetében liluló és 'Kaldom' fűszer típusú nem liluló *Capsicum annuum* fajta keresztezése szolgálta.

Ezzel a keresztezéssel a célunk többrétű volt. Vizsgáltuk az extrém mértékű antociánosodás egyik kiváltó okát, a LINE-1 retrotranszpozon inszerciót mind az F<sub>1</sub> és az F<sub>2</sub> generációkban. A hasadó populáció segítségével a LINE-1 retrotranszpozon öröklésmentét elemeztük. Ugyanebben az F<sub>2</sub> generációban a fenotípusos adatok felvételezése révén a célunk az volt, hogy megállapítsuk, hogy a retrotranszpozon inszerció által felerősített *Ca10g11650* gén melyik szövetekben fejti ki hatását. Továbbá, célul tűztük ki azt is, hogy a funkció nyeréses mutációt előidéző retrotranszpozon inszerció által felerősített antocián bioszintézisben szerepet játszó gének expresszióját mérjük, és ezzel párhuzamosan vizsgáljuk, hogy a megnövekedett antocián tartalom hogyan hat a beltartalmi mutatóira a terméseknek. Következtetéseinket az alábbiakban foglaljuk össze.

Az F<sub>1</sub> növények öntermékenyítését követően az F<sub>2</sub> nemzedék fenotipizálását végeztük el. Az így létrehozott hasadó populációnál LINE-1 retrotranszpozon inszerció öröklésmentének a meghatározására különböző szövetek antocián akkumulációjátfigyeltük meg. Az eredményeink arra utalnak, hogy az antocián bioszintézis nem egy lókusztól befolyásolt. A hasadó nemzedékben a genotípus és a fenofázis viszonyaiban vizsgálva a különböző szövetek antociánosodását megállapítható, hogy annak ellenére, hogy a vizsgált szövetekben folyamatosan csökken az antocián tartalom ahogy idősödik a növény, mégis a genotípus van a legnagyobb hatással a fenotípusukra.

A hasadó F<sub>2</sub> nemzedéket vizsgáltuk 10 szövetben, 10 héten felvételezve a fenotípusos adatokat. A 10 szövet közt nem csak a generatív szervek, hanem a vegetatív szövetek elszíneződését is figyelemmel kísértük. Az általunk összeállított, 4 fokú antociánossági skálán felvett adatokból készített hisztogram alapján megállapíthatjuk, hogy a generatív szövetek esetén egyértelmű a retrotranszpozon inszerció által felerősített *Ca10g11650* gén hatása a szövetek elszíneződésére, olyan szövetekben is, mint például a bibe. Ugyanakkor a vegetatív szövetek vizsgálatakor egyértelmű következtetéseket nem tudunk levonni. Az eredményeink alapján nagyobb egyedszámú hasadó populáció létrehozásával pontosabban meg tudnánk határozni a hatásmechanizmusát ennek a génnek. Valamint több különböző keresztezésből

származó hasadó populáció bevonása segítene abban, hogy a vizsgálataink egyértelmű eredményeket adjanak a vegetatív szövetek tekintetében is.

Az  $F_1$  nemzedéknél génexpressziós és analitikai vizsgálatokat végeztünk. A génexpressziós mintázat alapján arra következtetünk, hogy a *CHS* génexpresszió is összefüggésben van az antocián tartalommal, hiszen a legmagasabb értéket a 'Black Pearl' esetén mértük. Ugyanígy, a nagyobb fény mennyiség magasabb génexpressziót eredményezett, így arra következtetünk, hogy a vizsgált transzkripciós faktorok mindegyike indukálódik fényre. A beltartalmi mutatók tekintetében a természetes fényen tartott növények alacsonyabb értékeket mutattak a növénynevelő lámpa alatt tartott egyedeknél, így feltételezzük, hogy nem csak az antocián bioszintézis, de az egyéb polifenolos vegyületek termelődését is befolyásolja az eltérő fény mennyiség, ami végső soron a termékek antioxidáns kapacitásában is megmutatkozik.

## 4. Összefoglalás

A dolgozat célja a LINE-1 retrotranszpozon inszerció hatásának vizsgálata volt paprika faj esetében, egy hasadó populáció létrehozásával. A kísérlet előzményeképp már létrehozták az F<sub>1</sub> nemzedéket a 'Kaldom' és a 'Black Pearl' fajták keresztezésével.

Az F<sub>1</sub> egyedeket, miután bizonyítottuk, hogy hibridek, eltérő fényen neveltük. Megállapítottuk, hogy mindkét csoportnak magasabb az antocián bioszintézisben akár szabályozó, akár struktúrgén szerepet betöltő gén expressziója mint a 'Kaldom' fajtának, de nem olyan magas, mint a 'Black Pearl'-nek. A növénynevelő lámpa alatt tartott növényeknek magasabb volt az expressziójuk a vizsgált gének tekintetében, mint a természetes fényen neveltéké. Az analitikai mérések során megállapítottuk, hogy a biológiailag érett termések totál flavonoid, totál polifenol tartalma magasabb, mint a gazdasági érettségben lévő bogyóké. Ugyanezt detektáltuk az összes antioxidáns kapacitásra. Antocianin tartalmat csak a 'Black Pearl'-ben, illetve a hibridekben tudtunk kimutatni.

Az F<sub>1</sub> növények öntermékenyítését követően az F<sub>2</sub> generációt genotipizáltuk, és egy 10 hetes perióduson keresztül fenotipizáltuk. Fenotípusos adatokat 198 növényről gyűjtöttünk 10 szövetben, 5 időpontban, egy 4 fokú skálán, a genotípusos adatokhoz 103 növényt vizsgáltunk. Ezeket az adatokat összevetettük egymással és statisztikai módszerekkel elemeztük. Azt találtuk, hogy a szervek túlnyomó részében az antociánossági mutató a 10 hetes periódus alatt csökkent. Ennek ellenére, a varianciaanalízis alapján, a legerősebb hatása nem a mintavétel időpontjának, hanem a genotípusnak volt. Minden esetben az apai allélt hordozó egyedek voltak a legantociánosabbak, ezt statisztikai módszerekkel is bizonyítottuk és egy eloszlásfüggvényen ábráztuk.

## 5. Köszönet nyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítségükkel hozzájárultak a szakdolgozatom megszületéséhez.

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek, Dr. Veres Anikó egyetemi docensnek a lehetőségért, a munkám során rám fordított figyelméért, türelméért és a kutatás egésze során nyújtott szakmai segítségéért. Ezenkívül köszönettel tartozom másik témavezetőm, Kovács Zsófia egyetemi tanársegédnek kitartó támogatásáért, munkájáért és felkészültségéért, ami hozzájárult a dolgozat elkészüléséhez. Köszönöm szépen mindenkinek!

## 6. Irodalomjegyzék

- Abdelkader, A. F. (2015). Tolerance strategies of some GA3-pretreated edible plants during growing under drought stress. *Egyptian Soc ExpBiolo*, 11(2), 217-225.
- 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.
- Albert, C., Aronson, J., Fürst, C., & Opdam, P. (2014). Integrating ecosystem services in landscape planning: requirements, approaches, and impacts. *Landscape Ecology*, 29(8), 1277-1285.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N. R., & Yadav, R. C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(3), 307-321.
- Angmo, P., Phuntsog, N., Namgail, D., Chaurasia, O. P., & Stobdan, T. (2021). Effect of shading and high temperature amplitude in greenhouse on growth, photosynthesis, yield and phenolic contents of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 1539-1546.
- Aza-González, C., Herrera-Isidró, L., Núñez-Palenius, H. G., Martínez De La Vega, O., & Ochoa-Alejo, N. (2013). Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development. *Biologia Plantarum*, 57(1), 49-55.
- Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2012). Molecular biology of chili pepper anthocyanin biosynthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 93-98.
- Bakuradze, T., Tausend, A., Galan, J., Groh, I., Berry, D., Tur, J. A., Marko, D., & Richling, E. (2019). Antioxidative activity and health benefits of anthocyanin-rich fruit juice in healthy volunteers. *Free radical research*, 53(sup1), 1045–1055. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1618851>
- Bargavi R, Elumalai S. Chilli (*Capsicum Annuum*) Cultivation, Diseases, Breeding, Advanced Techniques in Biotechnology- General Review. *Biosci Biotechnol Res Asia* 2010;7(1)
- 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.
- Binod Prasad Luitel, 강원희 and 이택중. (2011). Variation for Fruit Yield and Quality Characteristics in Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Germplasm Collection. *한국육종학회지*, 43(2), 139-144.
- Borovsky, Y., Oren-Shamir, M., Ovadia, R., De Jong, W., & Paran, I. (2004). The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to Anthocyanin2 of *Petunia*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(1), 23-29.
- Boshland, P.W. & E. Votava. (1999). Pepper: vegetable and spice capsicums. CAB Intl., U.K.
- Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., ... & Martin, C. (2012). Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *The Plant Cell*, 24(3), 1242-1255.

- 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.
- Díaz-Pérez, J. C., John, K. S., Kabir, M. Y., Alvarado-Chávez, J. A., Cutino-Jiménez, A. M., Bautista, J., ... & Nambeesan, S. U. (2020). Bell pepper (*Capsicum annum* L.) under colored shade nets: fruit yield, postharvest transpiration, color, and chemical composition. *HortScience*, *55*(2), 181-187.
- Du, Y., Wooten, M. C., & Wooten, M. W. (2009). Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease. *Neurobiology of disease*, *35*(2), 302-310.
- Fiol, A., García, S., Dujak, C., Pacheco, I., Infante, R., & 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. *bioRxiv*.
- Garra, A.; Alkalai-Tuvia, S.; Telerman, A.; Paran, I.; Fallik, E.; Elmann, A. Anti-proliferative activities, phytochemical levels and fruit quality of pepper (*Capsicum* spp.) following prolonged storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2020**, *55*, 3574–3584.
- Giusti, M. M., and Wrolstad, R. E. (1996). Characterization of red radish anthocyanins. *Journal of food science* **61**, 322-326.
- González-Pérez S, Garcés-Claver A, Mallor C, Sáenz de Miera LE, Fayos O, et al. (2014) New Insights into *Capsicum* spp Relatedness and the Diversification Process of *Capsicum annum* in Spain. PLOS ONE 9(12): e116276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116276>
- Gonzalez-Perez, S., Garces-Claver, A., Mallor, C., Saenz de Miera, L. E., Fayos, O., Pomar, F., ... & Silvar, C. (2014). New insights into *Capsicum* spp relatedness and the diversification process of *Capsicum annum* in Spain. *Plos one*, *9*(12), e116276.
- Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. springer science & business media. 60-74
- Holton, T. A., & Cornish, E. C. (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *The Plant cell*, *7*(7), 1071–1083. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1071>
- Howard, L.R.; Talcott, S.T.; Brenes, C.H.; Villalon, B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1713–1720.
- Jin, H., Martin, C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* **41**, 577–585 (1999). <https://doi.org/10.1023/A:1006319732410>
- Jung, S., Venkatesh, J., Kang, M. Y., Kwon, J. K., & Kang, B. C. (2019). A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annum*. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, *287*, 110181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110181>

- Kizis, D., Lumberras, V., & Pagès, M. (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS letters*, *498*(2-3), 187-189.
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., & Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science*, *304*(5673), 982-982.
- Koes, R., Verweij, W., & Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in plant science*, *10*(5), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.03.002>
- Kumar, A., & Bennetzen, J. L. (1999). Plant retrotransposons. *Annual review of genetics*, *33*(1), 479-532.
- Lantos F. (2018). Capsicum genus „A paprika fajok eredete”. Szentes Városért Közalapítvány, Szentes ISBN 978-615-00-3030-2
- León-Chan, R. G., Lightbourn-Rojas, L. A., López-Meyer, M., Amarillas, L., Basilio, J., Heredia, T. F. M. B., ... & León-Félix, J. (2020). Differential gene expression of anthocyanin biosynthetic genes under low temperature and ultraviolet-B radiation in bell pepper (*Capsicum annuum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, *23*(3), 501-508.
- Li, S., He, Y., Li, L., Li, D., & Chen, H. (2022). New insights on the regulation of anthocyanin biosynthesis in purple Solanaceous fruit vegetables. *Scientia Horticulturae*, *297*, 110917.
- Lightbourn, G. J., Griesbach, R. J., Novotny, J. A., Clevidence, B. A., Rao, D. D., & Stommel, J. R. (2008). Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *The Journal of heredity*, *99*(2), 105–111. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm108>
- Lightbourn, G. J., Stommel, J. R., & Griesbach, R. J. (2007). Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *132*(6), 824-829.
- Liu, J., Osbourn, A., & Ma, P. (2015). MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Molecular plant*, *8*(5), 689-708.
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F., Visser, R. G., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review. *Frontiers in Chemistry*, *6*, 52.
- Meng, Y., Zhang, H., Fan, Y., & 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), 358. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03746-y>
- Ohno, S., Ueno, M., & Doi, M. (2020). Differences in the CaMYBA genome between anthocyanin-pigmented cultivars and non-pigmented cultivars in pepper (*Capsicum annuum*). *The Horticulture Journal*, *89*(1), 30-36.
- Peterson, P. A. (1959). Linkage of fruit shape and color genes in *Capsicum*. *Genetics*, *44*(3), 407.

- Pola, W., Sugaya, S., & 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(1), 59-66.
- Ramsay, N. A., & Glover, B. J. (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in plant science*, 10(2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.011>
- Simonne, A. H., Simonne, E. H., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A., & Green, N. R. (1997). Ascorbic acid and provitamin a contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annuum*L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(4), 299-311.
- 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.
- Sora, G.T.; Haminiuk, C.W.; da Silva, M.V.; Zielinski, A.A.; Gonçalves, G.A.; Bracht, A.; Peralta, R.M. 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. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, 52, 8086–8094.
- Steyn, W. J. (2009). Prevalence and Functions of Anthocyanins in Fruits. *Kevin Gould· Kevin Davies· Chris Winefield*, 85.
- Stommel, J. R., & Griesbach, R. J. (2008). Inheritance of fruit, foliar, and plant habit attributes in *Capsicum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(3), 396-407.
- Stommel, J. R., Lightbourn, G. J., Winkel, B. S., & Griesbach, R. J. (2009). Transcription factor families regulate the anthocyanin biosynthetic pathway in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(2), 244-251.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya, A. (2008), Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54: 733-749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
- Wojtaszek P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical journal*, 322 (Pt 3)(Pt 3), 681–692. <https://doi.org/10.1042/bj3220681>
- Xie, Y. F., Zhang, R. X., Qin, L. J., Zhao, D. G., & Xia, Z. M. (2022). Genome-wide identification and genetic characterization of the CaMYB family and its response to five types of heavy metal stress in hot pepper (*Capsicum annuum* cv. CM334). *Plant Physiology and Biochemistry*, 170, 98-109.
- Zhang, Z., Li, D. W., Jin, J. H., Yin, Y. X., Zhang, H. X., Chai, W. G., & 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00500>
- Zhou, Y., Mumtaz, M. A., Zhang, Y., Shu, H., Hao, Y., Lu, X., ... & Wang, Z. (2022). Response of Anthocyanin Accumulation in Pepper (*Capsicum annuum*) Fruit to Light Days. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8357.



## 7. NYILATKOZAT

### NYILATKOZAT

Alulírott Holló Viktória Bernadett, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Mezőgazdasági Biotechnológiai MSc szak nappali/levelező\* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakedolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem\*

Kelt: Gödöllő, 2023.05.03



Hallgató

### NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatom/Szakedolgozatom/Diplomadolgozatom áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatom/Szakedolgozatom/Diplomadolgozatom záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom\*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem\*

Kelt: Gödöllő, 2023. 05. 03.



Belső konzulens