

CSERESZNYE (*PRUNUS AVIUM* L.) GENOTÍPUSOK ANTOCIANIN- ÉS POLIFENOL TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA

MIHÁLYFI CSILLA¹, BEDŐ JANKA¹, HALÁSZ GÁBOR ENDRE², HUSSEIN DAOOD³, TÓTH-LENCSES ANDREA KITTI¹, KOVÁCS ZSÓFIA¹, VERES ANIKÓ¹

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő

²Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Környezettudományi Intézet, Környezetanalitikai és Technológiai Tanszék, Gödöllő

³Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kertészettudományi Intézet, Gödöllő

Különböző cseresznye genotípusokat elemeztünk kémiai és molekuláris genetikai módszerekkel. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) mértük és összehasonlítottuk cseresznye genotípusok antocianin és flavonoid összmenységét az egész termésben, külön a gyümölcshúsban és a héjban, valamint figyelembe vettük az eltérő tárolási módok befolyását a mintákra. Különbséget tapasztaltunk az azonnal fagyasztva tárolt, illetve késleltetve tárolt fajták beltartalmi értékei között. Egyes komponensek kevésbé bomlékonyabb a többi komponenshez képest hosszú távú fagyasztás hatására, továbbá, a héjban nagyobb koncentrációban detektáltuk az egyes komponenseket, mint a húsban. Az adatainkat összevetettük más szakirodalmi adatokkal, melyek egyeztek a mi vizsgálati eredményeinkkel. A hús és héj vizsgálat unikális tanulmánynak bizonyult, mivel eddig nem foglalkozott a témával szakirodalom.

Cseresznyelevelékből DNS-t izoláltunk, majd CDDP technika segítségével MYB konzervált régiókat vizsgálva kerestük az egyes fajták közötti polimorfizmust. Az eredményeket összevetettük a HPLC adatokkal és a polimorfizmus, valamint egyes komponensek különbségei közt kerestünk összefüggést.

Kulcsszavak: antocianin, polifenol, *Prunus avium*, CDDP

ANALYSIS OF ANTHOCYANIN AND POLYPHENOL CONTENT IN CHERRY (*PRUNUS AVIUM* L.) GENOTYPES

CS. MIHÁLYFI¹, J. BEDŐ¹, G. E. HALÁSZ², H. DAOOD³, A.K. TÓTH-LENCSES¹, Zs. KOVÁCS¹ AND A. VERES¹

¹Hungarian University of Agricultural and Life Sciences, Institute of Genetics and Biotechnology, Gödöllő

²Hungarian University of Agricultural and Life Sciences, Institute of Environmental Sciences Department of Environmental Analysis and Technology, Gödöllő

³Hungarian University of Agricultural and Life Sciences, Institute of Horticultural Sciences, Gödöllő

In our study, different cherry genotypes were analysed using chemical and molecular genetic methods. The total anthocyanins and flavonoids of the different varieties were measured and compared by high performance liquid chromatography (HPLC) in the whole fruit, in the flesh and in the skin, separately, and the influence of different storage methods on the samples was taken into account. We found difference between the amount of components of varieties stored frozen immediately and those stored delayed. Some components were less degradable compared to other components after prolonged freezing, furthermore we detected higher concentrations of some components in the skin than in the flesh. Our data were compared with other literature data, which were in agreement with our study results. The flesh and skin study proved to be a unique study as there is no literature on this topic so far.

We isolated DNA from cherry leaves and then searched for polymorphisms between cultivars using CDDP techniques by examining MYB conserved regions. The results were compared with HPLC data and correlations were sought between polymorphism and differences in individual components.

Key words: anthocyanin, polyphenol, *Prunus avium*, CDDP

Bevezetés

A cseresznye jelentős mennyiségű fontos tápanyagot és bioaktív összetevőt tartalmaz, mint a C-vitamin, rostok, valamint jótékony bioaktív vegyületeket, mint az antocianinok, a kvercetin és a karotinoidok. Számos biológiai folyamatot erősíthetnek vagy gátolhatnak, ami arra utal, hogy a gyümölcs potenciálisan megelőzheti a rákot, a szív- és érrendszeri betegségeket, a cukorbetegséget és egyéb gyulladásos állapotokat (McCune *et al.* 2011, Antognoni *et al.* 2020).

Az antocianinok fontos természetes vízzoldható flavonoid pigmentek, megtalálhatóak a levelekben, gyümölcsökben, magvakban, virágokban. Különböző biológiai és fiziológiai funkciókat látnak el, melyek elősegítik a beporzást és a magvak szétterjedését, biotikus és abiotikus stresszrezisztenciát biztosítanak, és meghosszabbítják a növények termésének élettartamát (Qi *et al.* 2022). A vörös, lila, fekete és kék színt alakítják ki a növényi szervekben. A cseresznye gyümölcs színének kialakulásáért is elsősorban az antocianinok felelnek (Liu *et al.* 2011). A sárgás-piros és a vörös cseresznyefajták közötti különbség hét antocianin komponensnek köszönhető (pelargonidin-3-O-rutinozid, pelargonidin-3-O-glükózid, peonidin-3-O-rutinozid, peonidin-3-O-glükózid, cianidin-3-xilozid, cianidin-3,5-O-diglükózidnak, cianidin-3-O-arabinozid). Chu és munkatársai (2023) kimutatták, hogy pozitív korreláció van a MYB transzkripció faktorok expressziója és az antocianin-tartalom között, valamint a struktúrájuk különböző mértékű expressziója befolyásolja a színváltozatokat.

A tárolás és a szállítás során a cseresznye gyümölcse megpuhul, elsötétedik, és a cukor-sav egyensúlyban változások következnek be, amelyek befolyásolják az ízeket (Kupferman, 1995). A betakarítás utáni főbb minőségben bekövetkező romlási tulajdonságok közé tartozik a nedvességvesztés, a puhulás, a rothadás és a szár barnulása (Bernalte *et al.* 2003). Számos olyan betakarítás utáni kezelés létezik, amely késlelteti ezeket a változásokat, mint a vegyszerek, a besugárzás vagy az alacsony hőmérsékletű kezelések. Mindazonáltal egyre inkább tudatosul a fogyasztók körében, hogy a gyümölcsökön alkalmazott vegyszerek kezeléseik közül sok potenciálisan káros az emberre (Klein és Lurie, 1991). A fagyasztás megőrzi a cseresznye eredeti ízét és biológiailag aktív anyagait a lehető legnagyobb mértékben. A fagyasztással szemben támasztott fő követelmények, hogy a termés ne deformálódjon, integritása megmaradjon, az egyes termések ne csomósodjanak össze, valamint olyan fagyasztott termék készüljön belőle, amely könnyen fogyasztható, csomagolható és feldolgozható (Bernalte *et al.* 2003).

Anyag és módszer

A vizsgált 14 genotípust a MATE Gyümölcstermesztési Kutatóközpont Érd, Érdi Elvira Major biztosította. A mintavételezés random történt. Négy év genotípusait használtuk fel: 2019, 2021, 2022, 2024. A vizsgálatok során felhasználtuk a gyümölcsöket (egyben, valamint külön a hús és héj) és a leveleket.

Genotípusok:

- | | | |
|----------------------|----------------------|---------------------|
| • 'Aida' | • 'Négus' | • 'Tünde' |
| • 'Anita' | • 'Péter' | • 'Valerij Chkalov' |
| • 'Bigarreau Burlat' | • 'Sándor' | • 'Vega' |
| • 'Carmen' | • 'Sárga hibrid' | • 'Vera' |
| • 'Krupnoplodnaja' | • 'Szomolyai fekete' | |

A cseresznye héj színéből színskálát hoztunk létre, melyből három csoportot alkottunk. Az I. csoportba tartoznak a világos jeggyel rendelkező típusok. A II. csoportba a piros, sötétpiros héjjal rendelkező fajták, míg a III. csoportba a sötétbordó, fekete jegyekkel rendelkező típusok kerültek. Az 1. ábra szemlélteti a csoportosítás kialakítását.

1. táblázat Az adott hullámhosszon detektált komponensek

Sárga hibrid	I.	Komponens	Detektált hullámhossz (nm)
Vega	I.	Össz. antocianin	516
Sándor	I.	Neoklorogénsav	325
Aida	I.	Kumaroil-kinasav	311
Krupnoplodnaja	II.	Epikatechin	279
Bigarreau Burlat	II.	Rutin	355
Tünde	II.	Kvercetin-3-glükozid	355
Anita	II.	Naringenin-dihexóz	289
Carmen	II.	Dikaffeoil-kinasav	288
Valerij Chkalov	III.	Kaempferol-glükozid	348
Péter	III.	Klorogénsav	325
Vera	III.		
Szomolyai fekete	III.		
Négus	III.		

1. ábra Színskála és kategorizálás

A 2019-es és 2024-es mintákat a mintavétel után azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, míg a 2021-es és 2022-es mintákat nem, csak 30 perc elteltével. Mind a két esetben, a későbbiekben -70°C -on, felhasználásig tároltuk a mintákat.

A HPLC vizsgálathoz a fagyasztott mintákból 2 g-ot dörzsöltünk el dörzsmozsárban, kevés kvarchomokkal. Oldatot készítettünk 3 vegyszázalékos metafoszforsavból, ami 70%-át alkotta az oldatnak és metanolból. Minden mintára 30 ml-t mértünk. A kivonatot 15 percig rázattuk, majd 24 óráig hűtőben tároltuk 4°C -on. A minták ultrahangos kezelést kaptak 5 percig, 18°C -on, majd centrifugáltuk 5 percig 5000 g sebességen. A kivonatot leszűrtük $0,45\ \mu\text{m}$ pórusméretű hidrofób PVDF anyagú fecskendőszűrőn keresztül üvegmintatartóba, majd a HPLC rendszerbe helyeztük (Hitachi Chromaster, Supelco Ascentis® Express 90 Å C18-PCP 15 cm x 4,6 mm, $2,7\ \mu\text{m}$ oszloptípus). A mintákat tíz hullámhosszon vizsgáltuk.

Az összes antocianin koncentrációja tartalmaz cianidin-3-glükozidot, cianidin-3-rutinozidot, pelargonidin-3-rutinozidot és peonidin-3-rutinozidot. Ezeket a vizsgálat során összesítettük, így összes antocianin-tartalmat mértünk. A HPLC rendszer vezérlését és a kromatogramok értékelését OpenLab 2.8. szoftverrel végeztük. A koncentrációt a terület, a mért hullámhossz és a faktor segítségével kaptuk meg. Végeredményül a cseresznye egyes komponenseinek mennyiségének koncentrációját kaptuk, $\mu\text{g/g}$ -ban.

A DNS kivonást a begyűjtött, majd -70°C -on tárolt levelekből a Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit DNS kivonó kit protokollja alapján hajtottuk végre. A DNS koncentrációt a Nanodrop spektrométerrel (Thermo Scientific NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ellenőriztük. A vizsgálathoz a NanoDrop 1000 3.8.1. szoftvert használtuk. A termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük.

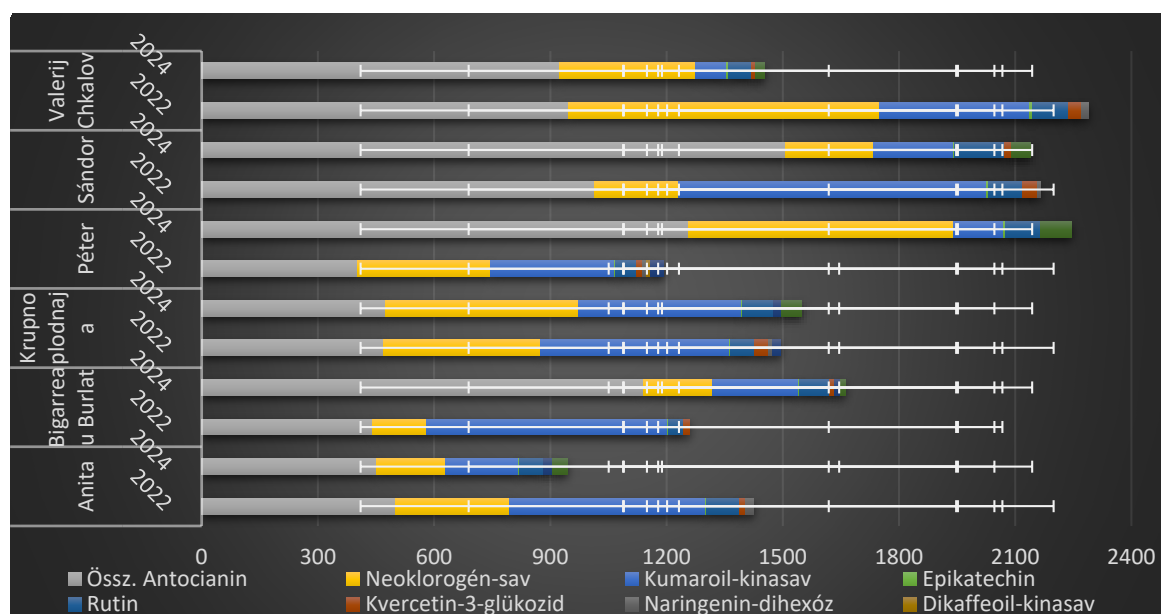
A CDDP markertechnika esetén a PCR paramétereit Collard és Mackill (2009) publikációja nyomán állítottuk be, melyet a saját vizsgálatunkra optimalizáltunk a Phusion polimeráz enzimhez ($2\ \text{U}/\mu\text{l}$), melyből $0,1\ \mu\text{l}$ -t mértünk ki. A MYB primerekből ($100\ \text{pg}/\mu\text{l}$) $1,5\ \mu\text{l}$ -t, a DNS templátból ($20\ \text{ng}/\mu\text{l}$) $2\ \mu\text{l}$ -t, a 10 mM-os dNTP-ből $0,2\ \mu\text{l}$ -t és az 5X GC puffer-ből $2\ \mu\text{l}$ -t adtunk hozzá. Steril vízzel egészítettük ki $10\ \mu\text{l}$ végtérfogatra. Az alkalmazott CDDP MYB primerek szekvenciáit a 3. táblázat szemlélteti.

2. táblázat A CDDP markerek szekvenciái

Primer	Szekvencia (5'-3')	Hossz (nukleotid)	GC tartalom
MYB1	GGCAAGGGCTGCCGC	15	80%
MYB2	GGCAAGGGCTGCCGC	15	80%

Eredmények

Az évek közötti összehasonlítás eredményeképpen a 2022-es mintákban a kumaroil-kinasav koncentrációja magasabb volt 'Anita', 'Bigarreau Burlat', 'Krupnoplodnaja', 'Négus', 'Péter', 'Sándor', 'Sárga hibrid', 'Valerij Chkalov' és 'Vega' genotípusoknál, mint 2024-ben. Továbbá, 2022-ben nagyobb koncentrációkat detektáltunk a neoklorogénsav, az összes antocianin és a rutin esetén a 'Anita', 'Sárga hibrid', 'Valerij Chkalov' genotípusoknál, a kvercetin-3-glükozid komponensnél a 'Bigarreau Burlat', 'Krupnoplodnaja', 'Sándor' és 'Valerij Chkalov' típusoknál, valamint az epikatechin esetén a 'Krupnoplodnaja', 'Négus', 'Sándor' és 'Valerij Chkalov' fajtáknál. Az évek közötti különbséget és a komponensek mennyiségét a 2. ábra szemlélteti. A 2024-ben gyűjtött mintáknál az epikatechin az 'Anita', 'Péter' a kaempferol-glükozid a 'Bigarreau Burlat', 'Krupnoplodnaja' és 'Péter', a klorogénsav 'Bigarreau Burlat', 'Péter', 'Valerij Chkalov' esetén; valamint az összes antocianin-tartalom, neoklorogénsav, kaempferol-glükozid és rutin a 'Krupnoplodnaja', 'Péter', 'Sándor' esetén és a kaempferol-glükozid 'Krupnoplodnaja', 'Péter' genotípusok esetén volt több a 2022-es típusoknál.



2. ábra A 2022. és 2024. évi 'Anita', 'Bigarreau Burlat', 'Krupnoplodnaja', 'Péter', 'Sándor' és 'Valerij Chkalov' egész gyümölcs mintáinak HPLC-vel elemzett komponensei, µg/g mértékegységben megadva

A hús és héjminták összehasonlítása során a héjminták gazdagabbak a detektált komponensekben, mint a húsminták, néhány kivétellel. A kumaroil-kinasav koncentrációja több volt az 'Aida', 'Bigarreau Burlat', 'Carmen', 'Sándor', 'Sárga hibrid', 'Valerij Chkalov', 'Vega' és 'Vera' genotípusok, a kvercetin-3-glükozid a 'Négus', az epikatechin az epikatechin a 'Bigarreau Burlat', 'Négus', 'Vega' és az antocianin és naringenin-dihexóz koncentrációja pedig a 'Sárga hibrid' genotípusok esetén volt nagyobb a hús mintákban.

A színskála alapján az I. és II. csoport alacsony antocianin és epikatechin koncentrációval, a III. csoport pedig magas antocianin-, neoklorogénsav és rutin koncentrációval rendelkezik.

A tartós mélyfagyasztás hatással volt a gyümölcsök beltartalmi összetevőire. A 2019-es és 2024-es mintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, míg a 2021-es és 2022-es mintákat

30 perc elteltével. Az azonnal tárolt minták kevésbé bomlottak el a detektált komponensek. A gyümölcs elválasztva sokkal bomlékonyabb, mint egészben tárolva.

A 2022-es év időjárási feltételei lehettek a legkedvezőbbek a cseresznyeterméshez, a túlzott hőség negatív hatással lehet a termés hozamra.

A CDDP MYB primerekkel végzett PCR eredményeként 2500 és 200 bázispár között kaptunk fragmentumokat. A MYB transzkripció faktorok szerepet játszanak az antociánbioszintézis szabályozásában, így a polimorfizmus összefüggésbe hozható az egyes fajták antioxidáns és flavonoid tartalmával. A héj alapján kialakított I., II. és III. kategóriába tartozó genotípusok MYB primerekkel kapott eredményei korrelációt mutattak.

MYB1				MYB2			
bázispár	I.	II.	III.	bázispár	I.	II.	III.
2300		X	X	2500	X	X	
1800		X	X	2000	X	X	X
1700		X		1900		X	X
1400	X		X	1400	X	X	
1300	X		X	900	X	X	X
1200			X	700	X	X	X
1100		X		550		X	X
1000		X	X	450		X	X
900	X	X		380			X
650			X	250	X	X	X
620	X		X				
550		X	X				
400		X	X				
280	X		X				

3. ábra A CDDP MYB1 és MYB2 primerekkel kapott fragmentumok és a héj alapján kialakított színskála kategóriák (I., II., III.) összevetése

Irodalom

- Antognoni, F., Potente, G., Mandrioli, R., Angeloni, C., Freschi, M., Malaguti, M., ... & Tartarini, S. (2020). Fruit quality characterization of new sweet cherry cultivars as a good source of bioactive phenolic compounds with antioxidant and neuroprotective potential. *Antioxidants*, 9(8), 677.
- Bernalte, M. ., Sabio, E., Hernández, M. ., & Gervasini, C. (2003): *Influence of storage delay on quality of “Van” sweet cherry. Postharvest Biology and Technology*, 28(2), 303–312.
- Chu, L., Zheng, W., Wang, J., Wang, Z., Zhao, W., Zhao B., Xu G., Xiao, M., Lou, X., Pan, F., Zhou, Y. (2023): Comparative analysis of the difference in flavonoid metabolic pathway during coloring between red-yellow and red sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Gene*, 880, 147602.
- Collard, B.C.Y., Mackill, D. (2009): Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 27. 558-562.
- Klein, J.D., Lurie, S., 1991. Postharvest heat treatment and fruit quality. *Postharvest News Inform.* 2, 15-19
- Kupferman, E.M., (1995): Managing cherry temperature for optimum quality. *Good Fruit Grower* June, 39-41
- Liu, Y., Liu, X., Zhong, F., Tian, R., Zhang, K., Zhang, X., Li, T. (2011): Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *Journal of food science*, 76(4), C633–C638.
- McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R., & Thomson, C. A. (2011). Cherries and health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(1), 1–12.
- Qi, X., Liu, C., Song, L., Dong, Y., Chen, L., Li, M. (2022): A Sweet Cherry Glutathione S-Transferase Gene, PavGST1, Plays a Central Role in Fruit Skin Coloration. *Cells*, 11(7), 1170.