

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Mikroszatellit marker fejlesztés *Rhodiola rosea* fajra

Veress Alexandra
Kertészmérnök BSc III. évfolyam

Konzulens: Dr. György Zsuzsanna, adjunktus

Budapest, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

1.	FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK.....	3
2.	BEVEZETÉS.....	4
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
3.1.	Bevezetés	6
3.2.	Botanikai leírás	7
3.3.	Földrajzi elterjedés.....	8
3.4.	A <i>Rhodiola rosea</i> gyógyhatásai	9
3.5.	A <i>Rhodiola rosea</i> hatóanyagai.....	9
3.6.	Molekuláris markerek	10
3.6.1.	RFLP.....	10
3.6.2.	PCR alapú technikák	11
3.6.3.	A <i>Rhodiola</i> nemzetségen belül használt molekuláris markerezési eljárások áttekintése ..	13
3.7.	Mikroszatellit markerek fejlesztése	14
3.7.1.	A <i>Rhodiola rosea</i> fajra specifikus mikroszatellit markerek előállítása	15
4.	CÉLKITŰZÉS	17
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER	18
5.1.	Növényanyag	18
5.2.	DNS-kivonás.....	18
5.3.	SSR marker-fejlesztés	18
5.3.1.	A genomi DNS-restrikciója.....	18
5.3.2.	Adapterek ligálása	19
5.3.3.	A keletkezett fragmentumok megsokszorozása	20
5.3.4.	Mágneses szelekció	22
5.3.5.	A szelektált fragmentumok klónozása.....	25
5.3.6.	Plazmid izolálás.....	27
5.3.7.	Szekvencia analízis.....	28
5.3.8.	Primer fejlesztés	28
5.3.9.	A kifejlesztett primerek működésének optimalizálása	28
5.3.10.	A molekuláris marker variabilitásának ellenőrzése (fragmentumhossz-analízis).....	29
6.	EREDMÉNYEK.....	31
6.1.	DNS kivonás	31
6.2.	SSR marker-fejlesztés	31
6.2.1.	A genomi DNS-restrikciója.....	31
6.2.2.	Mágneses szelekció	32

6.2.3.A szelektált fragmentumok klónozása.....	32
6.2.4.Plazmid izolálás.....	33
6.2.5.Szekvencia analízis.....	34
6.2.6.Primer-fejlesztés	34
6.2.7.A kifejlesztett primerek működésének optimalizálása	34
6.2.8.A molekuláris marker variabilitásának ellenőrzése (fragmentumhossz-analízis).....	36
7. MEGVITATÁS	39
8. ÖSSZEFOGLALÁS	41
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	42
10. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	43
11. MELLÉKLETEK.....	47

1. FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

bp.:	bázispár
AFLP:	amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus (Amplified Fragment Length Polymorphism)
BSA:	szarvasmarha szérum albumin
ddH ₂ O:	kétszer-desztillált víz
DNS:	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP:	dezoxi-nukleozidtrifoszfát (a PCR során beépíthető szabad nukleotidok)
EDTA:	etilén-diamin-tertraecetsav
EtOH:	etil-alkohol
IPTG:	izopropil-tiogalaktozidáz
ISSR:	egyszerű szekvencia ismétlődések között található variabilitás (Inter-Simple sequence Repeat)
mM:	milimol
μM:	mikromol
mtsi.:	munkatársai
PCR:	polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
RAPD:	véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP:	restrikciós fragmentumhossz-polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rpm:	fordulatszám/perc
SNP	egy pontos nukleotid-polimorfizmus (Short Nukleotid Polymorphism)
SSR:	egyszerű szekvencia ismétlődés (Single Sequence Repeat)
TBE:	Trisz-borát EDTA koncentrált puffer agaróz gélelektroforézishez
UV:	ultraibolya sugárzás
X-gal:	5-bromo-4chloro-3-indoyl-α-D-galaktozid

2. BEVEZETÉS

A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék hallgatójaként ismerkedtem meg, a dolgozat témáját adó *Rhodiola rosea*-val, mellyel kapcsolatban a Tanszéken számos kutatás zajlik. Ezek egyikébe kapcsolódtam be.

A *Rhodiola rosea* (rózsagyökér) egy évszázadok óta ismert gyógynövény, melynek hatóanyagai széles körben alkalmazhatóak különböző, az emberi szervezetre gyakorolt pozitív hatásai miatt. Európában történő felhasználása azonban csak az elmúlt néhány évtizedben terjedt el.

Mivel a rózsagyökér biokémiaiilag aktív komponenseit elsősorban a növény gyökere és rizómája tartalmazza, így a korábbi intenzív gyűjtés következményeként a növény egyedszáma rendkívüli mértékben lecsökkent. Ez a tény, illetve a drog iránt megnövekedett kereslet indokolta a *Rhodiola rosea* termesztésbe vonását.

A rózsagyökér hosszú tenyészedejű, így a termesztése lassan térül meg. A termesztés hatékonysága növelhető a jó minőségű drogot adó genotípus azonosításával, ennek szaporítóanyagként való felhasználásával. A nemesítési munka első lépése a természetben fellelhető genotípusok összegyűjtése és jellemzése. Ennek fontos eszközei lehetnek a molekuláris markerek.

A Tanszéken folyó kutatás egyik alapja a természetes *Rhodiola rosea* populációk genetikai variabilitásának vizsgálata molekuláris (SSR és ISSR) markerekkel. A rendelkezésre álló, faj-specifikus SSR markerek csekély száma indokolja a további markerfejlesztő munkát. Minél több marker áll rendelkezésünkre, annál pontosabb következtetéseket vonhatunk le a faj diverzitásával kapcsolatban. Szerencsés esetben egy adott molekuláris marker akár a növény magas hatóanyagtartalmához is köthető lehet. Egy ilyen molekuláris marker kifejlesztése nagymértékben elősegítené a rózsagyökér nemesítését, így termesztésének gazdaságosságát.

A kutatás, amelybe bekapcsolódtam, rózsagyökér-specifikus mikroszatellit markerek fejlesztését tűzte ki célul. Munkánk során a mikroszatellit markereket Bloor és mtsi. (2001) valamint Zane és mtsi. (2002) publikációja alapján fejlesztettük.

Az elmúlt évek alatt a DNS-alapú molekuláris markerezési eljárások között a mikroszatellitek használata vált a legnépszerűbbé.

Dolgozatomban bemutatom a *Rhodiola rosea*-t, a genetikai vizsgálatokhoz használt DNS-alapú molekuláris markereket, illetve az általunk vizsgált növényfajra eddig alkalmazott eljárásokat, valamint a mikroszatellit fejlesztési módszereket. A munka kivitelezését az Anyag és módszer fejezetben ismertetem és saját készítésű ábrákkal illusztrálom az egyes lépéseket, majd értékelem az

eredményeinket. A Megvitatás során a felmerült problémákra próbálunk megoldási lehetőségeket találni, illetve összehasonlítjuk eredményeinket más kutatók által elért konklúziókkal.

Munkám során az alkalmazott módszerek megismerését, elsajátítását, és a laboratóriumi tapasztalat megszerzését tartottam elsődlegesnek.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Bevezetés

A *Rhodiola rosea*-t (aranygyökér, sarkigyökér vagy rózsagyökér) amely az 1. ábrán látható, évszázadok óta használják Oroszország és Skandináv országok gyógyászatában. 1748 és 1961 között Svédország, Norvégia, Franciaország, Németország, a korábbi Szovjetunió és Izland tudományos folyóirataiban különböző alkalmazási területeit mutatták be. 1961 óta több mint 180 gyógyszeres, fitokémiai és klinikai tanulmányt publikáltak. Habár az aranygyökérről, mint adaptogén növényről, számos tanulmányt készítettek a különféle egészségmegőrző hatásai miatt, ezek Nyugat-Európában nagyrészt ismeretlenek maradtak. Ennek részben az lehetett az oka, hogy a publikációk többségét szláv és skandináv régióban beszélt nyelveken közölték (Brown és mtsi., 2002).

A *Rhodiola rosea* egy adaptogén gyógynövény. Az adaptogén elnevezés 1947-re vezethető vissza, és egy orosz tudós, Lazarev nevéhez köthető. Értelmezése szerint, az adaptogén növények olyan hatóanyagokat tartalmaznak, amelyek egy nem-specifikus immunválasz előidézésével ellensúlyozzák a szervezetre ártalmas fizikai, kémiai és biológiai stresszorokat. A sarkigyökérnek számos olyan hatása van, amelyek alapján az adaptogén növények közé sorolható. Ilyen például hogy, pozitív hatást gyakorol a szív- és érrendszeri működésre, valamint képes a központi idegrendszert stimulálni (Kelly, 2001).

Ma már a rózsagyökér kivonatából készült termékek széles körben keresettek, melyeket elsősorban a fizikai fáradtság csökkentésére illetve a mentális teljesítőképesség növelésére ajánlanak (Blomkvist és mtsi., 2009).



1. ábra: A *Rhodiola rosea* (Fotó: György, 2012).

3.2. Botanikai leírás

Az első feljegyzés a *rodia riza* gyógyászati alkalmazásáról Kr. e. 77-ből a De Materia Medica-ban volt olvasható, amely a görög orvos, Dioscorides nevéhez fűződik. A *Rhodiola rosea* nevet Linné adta neki, a gyökér megvágásakor érezhető rózsaszag miatt (Brown és mtsi., 2002). A növény latin nevét Priszter Szaniszló (1998) illatos rózsaszagvarjúhájnak fordította, de a köznyelvben csak rózsagyökérként terjedt el (Galambosi és György, 2008).

A *Rhodiola* fajok rendszertani besorolásának alkalmával a botanikusok között gyakran nézeteltérések alakultak ki a hovatartozást illetően, mivel a rendszerezés során nem lehet éles határt szabni a nemzetséget meghatározó jellegzetességek között (Brown és mtsi., 2002).

A *Rhodiola rosea* a *Crassulaceae* (varjúhájfélék) családba, a *Sedoideae* (varjúhájformák) alcsaládba és a *Rhodiola* nemzetségbe tartozik (Khanum és mtsi., 2005). Kezdetben a *Sedum* nemzetségbe sorolták (kb. 10 faj) de 1963-ban Hegi elkülönítette a *Rhodiola*-k csoportját (kb. 50 fajt). Egyes források szerint ma kb. 200 faj, (Chiorghita és mtsi., 2011) míg mások szerint mindössze 24 faj tartozik ebbe a nemzetségbe (Panossian és mtsi., 2010).

A rózsagyökér kétlaki, évelő növény, amely 30-80 cm magasra nő és sárga virágokat hoz (Khanum és mtsi., 2005). Áprilistól augusztusig virágzik (Tasheva és Kosturkova, 2012). Vastag, vágáskor kellemes illatot kibocsájtó gyöktörzse van (Khanum és mtsi., 2005). A rizóma átlagosan 70-400g, de a 3,5 kg-ot is elérheti. Levelei hosszúkásak, elliptikus alakúak (Tasheva és Kosturkova, 2012). Az 2. ábra a *Rhodiola rosea* növényt mutatja be.



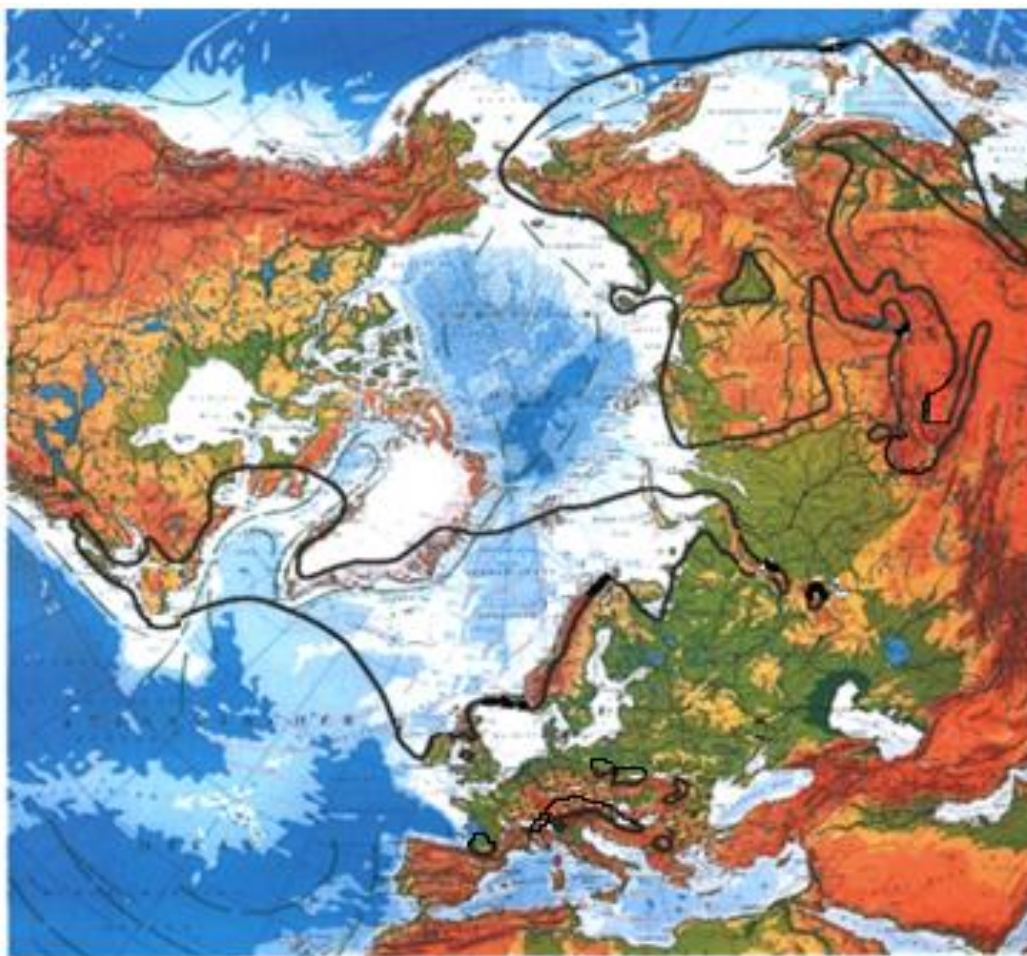
2. ábra: A *Rhodiola rosea* növény felépítése (Forrás: Brown és mtsi., 2002).

3.3. Földrajzi elterjedés

A *Rhodiola* nemzetség valószínűleg Délnyugat-Kína hegyvidéki területeiről és a Himalájából származik (Chiorghita és mtsi., 2011).

A rózsagyökér elsősorban az északi félteke magas hegységeiben illetve sarkvidéki területein él. Közép- és Észak-Ázsiában, az Altáj hegységtől kezdve Mongólián át, Szibériában is tömegesen előfordul (Khanum és mtsi., 2005). Alaszkában, Kanadában és az Amerikai Egyesült Államok északi hegységeiben is fellelhető (Brown és mtsi., 2002). Európában az Alpok, a Pireneusok és a Kárpátok hegységeikben, Ázsiában az Altáj, a Himalája és az Urál hegységeikben 980-2000m közötti magasságban fordul elő (Tasheva és Kosturkova, 2012). Grönlandon és Izlandon is fellelhető (Zini és mtsi., 2008). A 3. ábrán ezen elterjedési területek láthatóak.

Az intenzív gyűjtésének köszönhetően néhány őshonos élőhelyén már kipusztult, illetve helyenként rendkívül lecsökkent az egyedszáma (Chiorghita és mtsi., 2011). Ez természetvédelmi intézkedéseket indokolt, néhány országban bekerült a veszélyeztetett növényfajokat tartalmazó Vörös Könyvbe (Tasheva és Kosturkova, 2012).



3. ábra: A *Rhodiola rosea* előfordulási területei (Forrás: Pleschenk, 2012).

3.4. A *Rhodiola rosea* gyógyhatásai

Az rózsagyökér közkedvelt gyógynövény a népgyógyászatban (Kelly, 2001). A vikingek már évszázadokkal ezelőtt alkalmazták a fizikai teljesítőképesség, illetve az állóképesség javítására. Mongol orvosok pedig a TBC és a rák kezelésére írták fel (Brown és mtsi., 2002).

A franciák az 1900-as években az agyműködés élénkítésére használták, míg a németek fejfájás ellen. Oroszországban ebben vélték felfedezni a hosszú élet titkát. A tibeti orvoslásban tüdőbajok kezelésére alkalmazták (Darbinyan és mtsi., 2000).

A Grúzai Köztársaság falvaiban még ma is hagyomány, hogy házasság előtt egy csokor *Rhodiola* növényt ajándékoznak az ifjú párnak, annak hitében, hogy az fokozza a termékenységet és biztosítja az egészséges gyermek születését. Közép-Ázsiában kemény telek idején, a hideg és az influenza ellen eddig a rózsagyökér teája bizonyult a leghatásosabbnak (Brown és mtsi., 2002).

Összességében az rózsagyökér a fizikai teljesítőképesség és a munka termelékenységének növelésére, a hosszú élet elérésére, és a magashegyi betegség ellen használták, valamint a fáradtság, depresszió, a vérszegénység, az impotencia, bélproblémák, fertőzések, és idegrendszeri rendellenességek kezelésére (Brown és mtsi., 2002), mivel kivonatai adaptogén, antioxidáns és antipszichotikus hatással is bírnak (Tasheva és Kosturkova, 2012).

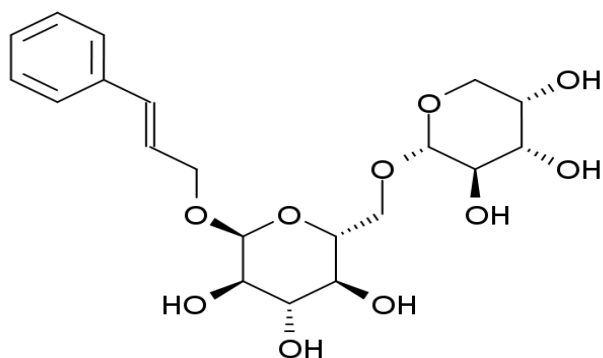
Napjainkban a rózsagyökérből izolált készítményekről szóló tanulmányok bebizonyították az idegrendszeri-, szív-és érrendszeri rendellenességekre gyakorolt pozitív hatásait, a fáradtság elleni, az antidepresszáns, és a nyugtató hatásait, továbbá a szellemi teljesítőképesség fokozását, valamint az élettartam meghosszabbításában és a központi idegrendszer stimulálásában betöltött szerepét. Manapság világszerte használják étrend-kiegészítőként (Panossian és mtsi., 2010).

3.5. A *Rhodiola rosea* hatóanyagai

A *Rhodiola rosea* gyökeréből 28 összetevőt, föld feletti részeiből további 15 komponenst izoláltak (Kelly, 2001).

A *Rhodiola rosea* gyökerén elvégzett fitokémiai vizsgálatok eredményeképpen számos biológiailag aktív anyagot azonosítottak, köztük szerves savakat, flavonoidokat, tanninokat és sok fenolos vegyületet. Utóbbiak közé tartoznak a fenilpropán származékok, mint például a rozavinek (rozavin, rozin, rozarin), amelyek speciálisan a *Rhodiola rosea* fajban fordulnak elő, és a feniletán szalidroزيد, amely minden *Rhodiola* fajban megtalálhatóak (Perfumi és Mattioli, 2007).

A rózsagyökér legfőbb komponensei a rozavin, a rozin, a rozarin és a szalidroزيد (Patov és mtsi., 2006). A 4. ábrán a rozavin szerkezeti képletét láthatjuk.



4. ábra: A rozavin, az aranygyökér biokémiai aktivitásáért felelős egyik legfontosabb komponensének szerkezete (Forrás: Brown és mtsi., 2002).

3.6. Molekuláris markerek

A DNS-alapú molekuláris markerek olyan dezoxiribonukleinsav szakaszok, amelyek genomi szinten levő különbségek kimutatására alkalmasak és nem feltétlenül nyilvánulnak meg a fenotípusban. Előnyük, hogy a többi markerrel (pl. morfológiai) ellentétben, függetlenek az egyed korától, fejlettségi szintjétől és a környezeti hatásoktól is (Agarwal és mtsi., 2008).

A molekuláris markerezési eljárások legyőzve a térbeli és időbeli távolságot, lehetőséget adnak a genetikai változatosság felmérésére. Napjainkban a variabilitás és diverzitás tanulmányozásában alapvető szerepet játszanak (Behera és mtsi., 2008), valamint a nemesítési programokban is jól hasznosíthatóak (Gupta és mtsi., 2001).

A molekuláris markerezés két alapvető módszere a restrikciós enzimekkel történő hasítás, illetve az amplifikáción alapuló (PCR) polimeráz láncreakció (Velich, 2001).

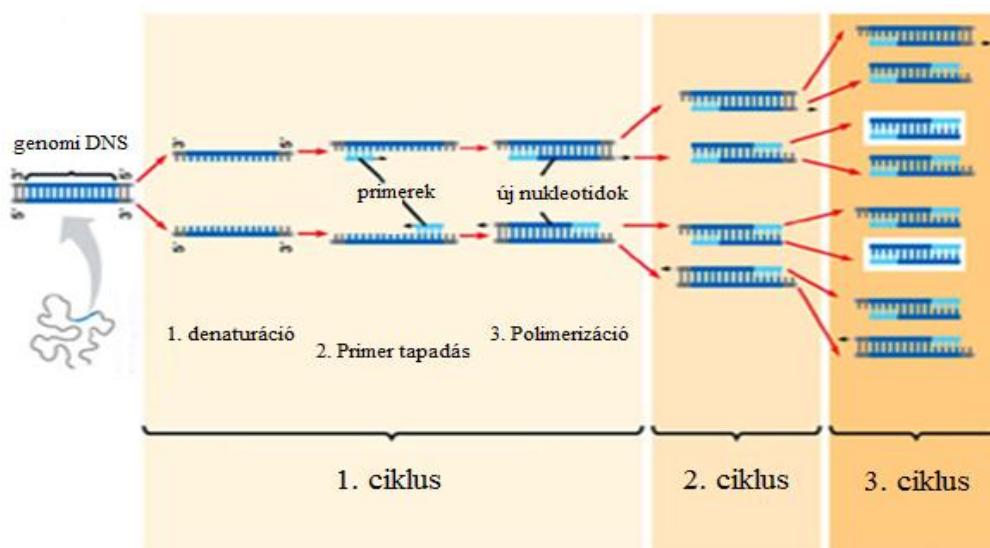
3.6.1. RFLP

Az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism = restrikciós fragmentumhossz-polimorfizmus) azon alapul, hogy ha egy DNS-szakasz restrikciós enzim-felismerő hasító helyben különbözik egy másiktól, akkor a két szakasz enzimatis emésztése eltérő hosszúságú fragmentumokat eredményez (Velich, 2001). A restrikciós enzimek tehát specifikus felismerőhellyel rendelkeznek, és katalizálják a nukleinsavak hasítását, melyek különböző méretű DNS-szakaszokat eredményeznek. A restrikciós fragmentumok agaróz gélelektroforézissel a molekulaméret alapján elkülöníthetőek. A DNS-darabok sokaságából a Southern blotoláson alapuló hibridizáció segítségével kimutathatóak az értékes információt hordozó szekvencia-sorozatok (Botstein és mtsi., 1980).

3.6.2. PCR alapú technikák

A PCR (Polimerase Chain Reaction = polimeráz láncreakció) a nukleinsavak meghatározott szakaszainak felszaporítására alkalmazható módszer (Parker és mtsi., 1998). A polimeráz láncreakció tulajdonképpen a sejtekben végbemenő DNS replikáció *in vitro* (nincs szükség élő sejtre) körülmények közötti utánzása (László, 1999). A PCR során enzimatikus úton, az amplifikálandó szakasz két végén megfelelő primereket alkalmazva meghatározott DNS szakaszokat tudunk felszaporítani.

A folyamat három lépésből áll, amelyek ciklikusan ismétlődnek (5. ábra). A felszaporítandó DNS-szakasz minden ciklusban megduplázódik. Először a dupla szálú DNS-t magas hőmérsékleten, ~95°C-on denaturáljuk. A második lépésben 40-60°C-ra csökkentve a hőmérsékletet a primerek hozzáhibridizálódnak a DNS-szál megfelelő részeihez. Végezetül a hőmérsékletet 72°C-ra emelve, a polimeráz a primerektől kiindulva komplementer szakaszt szintetizál (Hajósné, 1999).



5. ábra: A polimeráz láncreakció (PCR). Az ábrán a 3 cikusból álló reakció menete, illetve az első cikluson belül zajló lépések figyelhetőek meg (Forrás: Lawley, 2010).

3.6.2.1. RAPD

A RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA = véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS) módszer a PCR során egyetlen, tetszőleges primer alkalmazásával különböző méretű DNS-fragmentumokat szaporít fel. Az egyes minták közötti eltérések etídium-bromid jelenlétében, agaróz gélen elválasztva és ultraibolya sugárzás alatt láthatóvá téve detektálhatóak (Jones és mtsi., 1997).

3.6.2.2. AFLP

Az AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism = amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus) a restrikciós enzimes hasítás után a keletkezett fragmentumokat PCR során felszaporítja. A hasító enzimek vágási helye ismert, így ezekre a végekre lehetőség van adapterek ligálására és az adapterre való primer tervezésére. A gélelektroforézis alapján kapott mintázatot a restrikciós fragmentumok hosszkülönbsége eredményezi (Jones és mtsi., 1997).

3.6.2.3. SNP

Az SNP-n (Single Nucleotide Polimorphism = egyponyos nukleotid-polimorfizmus) alapuló eljárások egyre inkább terjednek a genetikai tudományok területén. A tanulmányozást elősegíti, hogy az egyponyos nukleotid-polimorfizmus nagy mintaszám esetén is gyorsan és egyszerűen vizsgálható (Ye és mtsi., 2001).

Az SNP-k a bázisok egyedi pozíciói a genomban, amelyek egy populáción belül kimutatják az öröklődés során végbemenő változásokat (Twyman, 2005). Az SNP marker egy adott helyen történő csere, egyszerű bázisváltozás a DNS-szekvenciában. Az SNP azonosításának számos technikája létezik. Általában a kimutatás két lépésből áll: 1.) SNP azonosítása allél-specifikus reakciókkal, 2.) ezek kimutatása a termékek azonosítása alapján (Vignal és mtsi., 2002). Az allél-elkülönítés alapja lehet hibridizáció, primer meghosszabbítás vagy enzimátikus emésztés (Twyman, 2005).

3.6.2.4. SSR

A SSR-ek (Simple Sequence Repeat = egyszerű szekvencia ismétlődés) a prokarióta és eukarióta élőlényekben is előforduló, tandem módon ismétlődő motívumok, amelyek a genom kódoló és nem-kódoló régiójában is megtalálhatóak (Zane és mtsi., 2002). A bázispárok száma alapján midiszatellit-, miniszatellit és mikroszatellit-eket különböztethetünk meg. Ilyen ismétlődések például az $(AT)_n$, $(ATC)_n$, $(AGTC)_n$, $(AGTCT)_n$ (Hajósné, 1999).

A mikroszatellit-ek véletlenszerűen és egyenletesebben oszlanak el a genomban, míg a miniszatellit-ek inkább csak a telomerákban találhatóak meg. A DNS-alapú markerek között a mikroszatellit-ek a sokaságuk és hipervariabilitásuk miatt fontos csoportot képviselnek (Gupta és mtsi., 1996).

A mikroszatellit-eket határoló DNS-szakaszok szekvenciája fajon belül általában konzervatív. Ezen szekvenciákra tervezett primerekkel a közbeeső mikroszatellit régió polimeráz láncreakcióval felszaporítható. Az ismétlődő szakaszok ismétlődésszámában lévő különbségek a kapott fragmentumok eltérő hossza alapján mutathatóak ki. Ezeket a molekuláris markereket

populációgenetikai tanulmányokra, kapcsoltsági- és fizika térképek készítésére, fajtaazonosításra is alkalmazzák (Hajósné, 1999).

A mikroszetliti markerek jól reprodukálhatóak, multi-allélikus tulajdonsággal rendelkeznek és kodomináns öröklődésűek (Zini és mst., 2009).

3.6.2.5. ISSR

Az ISSR (Inter Simple Sequence Repeat = egyszerű szekvencia ismétlődések között található variabilitás) a mikroszatellitokhoz hasonlóan a genom néhány bázispár hosszúságú, tandem ismétlődésű régióin alapuló módszer. Az SSR-rel szembeni előnye, hogy az ehhez használt primerek fejlesztése nem túl bonyolult folyamat. Az ISSR primerek magukra a mikroszatellit régiókra vannak tervezve úgy, hogy az ismétlődést megelőző illetve követő 1-2-3 nukleotidot is tartalmazza, mint például (TAT)_nG, C(TGT)_n. Ez a biztosíték arra, hogy a primerek a DNS mikroszatellit régióinak végéhez csak ezen nukleotidokkal ellátott helyekre hibridizálódnak (Heszky és mst., 2005). A fragmentumok felszaporítása itt is PCR-el, majd elválasztásuk gélelektroforézissel történik (Velich, 2001).

3.6.3. *A Rhodiola nemzetségen belül használt molekuláris markerezési eljárások áttekintése*

A *Rhodiola* nemzetség esetén eddig csak néhány tanulmány született, amely a fajok genetikai diverzitásának felmérését célozta.

Az első publikáció Yan és mst. (2003) nevéhez fűződik. Izoenzimokkal vizsgálták a *Rhodiola sachalinensis* faj 217 egyedét, amelyek Kína 15 különböző élőhelyéről származtak. 12 enzim felhasználásával 19 allélt azonosítottak.

Lei és mst. (2006) a *Rhodiola crenulata* populációit vizsgálták ISSR módszerrel. 164 egyedet hasonlítottak össze, melyeket 9 különböző helyről gyűjtötték be Kínában. A molekuláris markerezéshez 12 ISSR primert használtak. Ezen primerek összesen 184 polimorf lókuszt eredményeztek.

A *Rhodiola iremelica* populációi közötti különbségek felmérésére és a genetikai variabilitás tanulmányozására Yanbaev és mst. (2007) izoenzim markereket használtak. Ehhez poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztak. A *Rhodiola iremelica*-t 21 különböző élőhelyéről gyűjtötték be Oroszország területéről. 8 lókuszból 33 allélváltozatot figyeltek meg.

Elameen és mst. (2008) az AFLP segítségével a *Rhodiola rosea* diverzitását vizsgálták. 97, Norvégiából származó egyedre alkalmazták ezt a markerezési eljárást. 5 primer 109 polimorf lókuszt eredményezett.

A *Rhodiola rosea* fajt Zini és mtsi. (2009) SSR markerek használatával tanulmányozták, mely SSR markereket maguk fejlesztették. 47 egyedet vizsgáltak meg, melyek Olaszország két területéről (22 Val Genova-ból, 25 Col Bricon-ból) származtak. A vizsgált lókuszok mindegyike polimorf volt, lókuszonként 2-5 allélváltozatot mutatva a megfigyelt heterozigótaság 9 és 76% között változott.

Hou és Lou (2011) a *Rhodiola dumulosa* genetikai diverzitásának vizsgálatához az AFLP molekuláris markerezési eljárást alkalmazták. A *Rhodiola dumulosa* 35 populációjából 1089 egyedet gyűjtöttek be Kínában. A használt 225 marker közül 221 polimorfnak bizonyult.

Kozyrenko és mtsi. (2011) oroszországi *Rhodiola rosea* populációkat vizsgáltak ISSR technikával. 147 növényt gyűjtöttek be 11 populációból. A markerezés során 8 primert használtak és 243 lókuszt találtak polimorfnak.

György és mtsi. (2012b) a Zini és mtsi. (2009) által fejlesztett SSR markereket alkalmazták oroszországi rózsagyökér populációk vizsgálatára. Eredményeik szerint a 8 markerből csupán 4 bizonyult hasznosnak, a másik 4 vagy nem működött megbízhatóan vagy nem volt polimorf.

3.7. Mikroszatellit markerek fejlesztése

A genomban előforduló mikroszatellitek mennyisége, összefüggésben van az organizmus genomméretével (Tóth és mtsi, 2000).

A mikroszatellit lókuszok kinyerésének hagyományos módja a vizsgálni kívánt faj génkönyvtára alapján történik, amely során a mikrosatelliteket több ezer klón közül, kolónia hibridizáció többszöri megismétlésével különítik el. Habár viszonylag egyszerű, különösen a mikrosatellitekben gazdag genomok esetében, ez a megközelítés hosszadalmas és kevésbé hatékony a tandem-ismétlődésű régiókban szegényebb fajoknál. Emiatt számos alternatív módszert dolgoztak ki azért, hogy csökkentsék az időt, amelyet a mikrosatellitek izolálása igényel, és hogy ezzel együtt jelentősen megnöveljék a hatékonyságot (Zane és mtsi., 2002).

A génkönyvtár készítés elkerülésére, néhány kutató az ismeretlen mikrosatellit régiók megtalálására a RAPD eljárás módosított változatát javasolta (Cifarelli és mtsi., 1995; Richardson és mtsi., 1995). Vagy véletlenszerűen kiválasztott, mikrosatellit ismétlődésekkel „kikötött” primereket, vagy egyszerű RAPD primereket alkalmaztak, és a későbbiek során a polimeráz láncreakció termékeit mikrosatellit próbákkal hibridizálták Southern blotolás után. A megfigyelések alapján a RAPD eljárással felszaporított termékek nagy mennyiségben tartalmaztak ismétlődő régiókat, a pozitív klónok kiválasztása után a mikrosatellitek elkülönítése egyszerűen elvégezhető a Southern hibridizáció segítségével, vagy a RAPD termékek mindegyikének

klónozásával és a klónok végig pásztázásával. A gyakorlatban azonban ez az eljárások nem terjedt el, mert a protokoll 2%-nál alacsonyabb hatékonysággal alkalmazható.

Egy másik ilyen eljárás a primerek meghosszabbításán alapszik. Erről a módszerről 2 tanulmány jelent meg, amelyek nagyon hatékonyan működtek az (AC) ismétlődés esetében, ugyanis a pozitív klónok 40-100%-os eredményt adtak. Ezek a protokollok meglehetősen sok lépésből állnak.

Az eddig bemutatott kísérletek a dinukleotid ismétlődések kiválasztására vonatkoznak.

A mikroszatellitek megtalálásának egy további lehetősége a szelektív hibridizáció, amelyet az esetek 25%-ában alkalmaztak, így ez egy kifejezetten népszerű módszer. A publikációk 20%-tól 90%-ig terjedő hatékonyságról számolnak be. A di-, tri- és tetranukleotid mikroszatellit ismétlődések óriási különbségeket mutatnak ki az egyes taxonok között, a növényektől kezdve egészen a gerincesekig.

A FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences COntaining repeats = az ismétlődő szekvenciák gyors előállítása az AFLP módszerével) módszer esetében 50-95%-os valószínűséggel várható pozitív eredmény (Zane és mtsi., 2002). A következő fejezetben Zini és mtsi. (2009) munkája alapján részletesen ismertetem ezt az eljárást.

3.7.1. A *Rhodiola rosea* fajra specifikus mikroszatellit markerek előállítása

Zini és mtsi. (2009) az aranygyökér genomi DNS-ét, a Val di Sol-ból (Trentinó régió, Olaszország) származó növény fiatal leveléből, egy CTAB-alapú eljárással nyerték ki. Emésztés, az AFLP adaptorok ligálása és az amplifikátumok kiválogatása után a FIASCO módszert alkalmazták. Három mikroszatellitekkel dúsított könyvtárat hoztak létre biotin-sztreptavidin immobilizációs technika segítségével. A biotin-jelölt (CAA)₁₀, (CT)₁₅ és a (GT)₁₅ külön-külön, az AFLP által amplifikált fragmentumokhoz hibridizálódtak, majd ezek kiválasztására sztreptavidin bevonatú mágnes gyöngyöket alkalmaztak. Az elszeparálódott DNS fragmentumokat desztillált vízben eluálták. Az adapterekre tervezett primerekkel PCR-rel felsokszorozták ezeket a fragmentumokat, majd a keletkezett terméket klónozták, szekvenálták.

96 klón nukleotid-szekvenciáját határozták meg. A szekvenált klónok 36%-a tartalmazott mikroszatellit régiót, melyek között 7% azonos volt, míg a többi 93% egymástól eltérő fragmentumokat eredményezett. A klónozott szekvenciák között, a tandem-ismétlődések azonosítását primerek tervezése követte.

A *Rhodiola rosea* 47, két előfordulási területről származó egyedeit vizsgálták, hogy megállapíthassák a fejlesztett mikroszatellit markerek polimorfizmusát. A 23 tervezett és tesztelt primerpár közül 15 sikeresen amplifikálta a fragmentumokat a várt tartományon belül. Ezek közül 3

nem volt variábilis, 4-nél pedig a primer több helyre is bekötődött és nem csak az adott mikroszatellit régiót szaporította fel. A másik 8 mikroszatellit lókuszt polimorf volt. A kifejlesztett 8 SSR allél-változatainak száma 2 és 5 között váltakozott lókuszonként. Ezen lókuszok magas fokú variabilitást mutattak a vizsgált populációk között. A heterozigótaság 0,091 és 0,760 között alakult.

4. CÉLKITŰZÉS

A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszéken folyó kutatásba kapcsolódhattam be. Munkánk előzménye a Tanszéken történő *Rhodiola rosea* populáció-genetikai vizsgálatai. Az eddigi kutatások során mindössze 8 mikroszatellit lókuszt azonosítottak e növény esetében. A tanszéki tapasztalatok alapján a 8 marker közül is csupán csak 4 használható megbízhatóan (György és mtsi., 2012a és 2012b). Ilyen kevés markerrel nem kaphatunk teljes körű áttekintés a fajok genetikai variabilitást illetően.

Célunk volt a rózsagyökér specifikus mikroszatellit markerek számának gyarapítása. Minél több marker áll rendelkezésünkre, annál pontosabbak lehetnek vizsgálataink, melyek a *Rhodiola rosea* faj genetikai diverzitását célozzák.

1. Elsődleges célunk az volt, hogy mikroszatellit régiókat keressünk a *Rhodiola rosea* genomjában, majd az, hogy ezeket elkülönítsük.
2. Munkánk legfőbb célja, hogy az SSR lókusztokat határoló szakaszokra primereket fejlesszünk.
3. Végezetül célunk volt a kifejlesztett primerek alkalmazhatóságának vizsgálata. Több, különböző elterjedési területről származó *Rhodiola rosea* egyeden tesztelve a primereket megbizonyosodjunk a lókusztok variabilitásáról.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Növényanyag

A felhasznált növényanyag a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszék *Rhodiola rosea* DNS-génbankjából származott. A munkánk során felhasznált növények begyűjtése Ausztriából, Norvégiából, Olaszországból, Oroszországból, Svájcól és Szlovéniából történt.

5.2. DNS-kivonás

A DNS-t fagyasztott *Rhodiola rosea* levelekből vontuk ki. A DNS-kivonáshoz az E.Z.N.A. SP Plant Mini Kit-et (Omega, USA, Kalifornia) használtuk és a hozzá rendelt protokollt követtük.

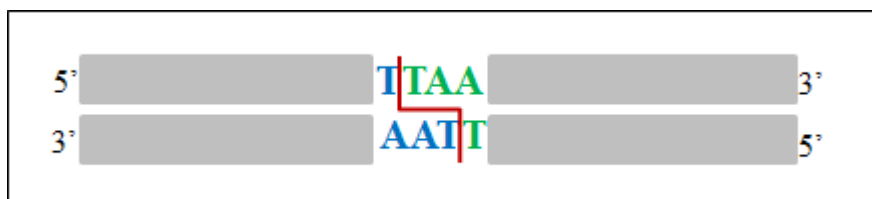
A DNS mennyiségét és minőségét gélelektroforézissel, valamint Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, USA) készülékkel állapítottuk meg. A gélelektroforézishez 1%-os TBE agaróz gél használtunk, melyben mintáinkat etídium-bromid fluoreszcens festékanyaggal tettük UV fény által láthatóvá.

Tiszta és magas koncentrációjú DNS-re volt szükségünk. Munkánk kezdetén legfontosabb feladatunk az volt, hogy megfelelő minőségű mintát válasszunk. A kiindulási DNS-t a NanoDrop értékei és PCR során felszaporított minták gélképe alapján választottuk ki.

5.3. SSR marker-fejlesztés

5.3.1. A genomi DNS-restrikciója

A genomi DNS-hasítását Zane és mtsi (2002) cikke alapján végeztük el. Első lépésként a kiválasztott DNS-t a Tru1I (Mse1) restrikciós enzimmel feldaraboltuk. Ez a négybázisos felismerő-helyű enzim átlagosan 256 bázispáronként vágja el a DNS-t. Így különböző hosszúságú ismert végződésű fragmentumok keletkeztek. A DNS-ben végbemenő hasadást a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra: A Tru1I restrikciós enzim vágási helyei a DNS-ben. Ahol a *Rhodiola rosea* genomjában előfordulnak ezek a szekvenciák, ott végbemegy a hasítás.

1. táblázat: A restrikciós lépéshez használt reagensek és mennyiségük.

A hasítás összetevői:	A felhasznált mennyiség:
1x-es reakció-pufferR (Fermentas)	2 µl
Tru1I (Fermentas, 10 unit/µl)	1 µl
DNS (S5):	8 µl
ddH ₂ O:	9 µl
Összesen:	20 µl

Az 1. táblázat a DNS-feldarabolásához használt komponenseket és mennyiségüket ismerteti. Ezt egy kloroformos tisztító lépés követte, amelyre azért volt szükség, hogy a Tru1I enzimet és pufferét eltávolítsuk. Ugyanis jelenlétük megzavarhatja a későbbi PCR sikerességét.

A tisztító lépés menete:

1. A meghasított genomi DNS-hez 180 µl ddH₂O-t és 400 µl kloroformot adtunk.
2. Az elegyet 3 percig vortexeltük, majd 10 percig állni hagytuk.
3. Ezután 20 percig 4°C-on, 12000 rpm-el centrifugáltuk.
4. Egy új 1,5 µl-es centrifuga csőbe átpipettáztuk a felülúszót.
5. Ehhez 600 µl 7.5 M NH₄AC-abs Et-OH-t adtunk és döntögetéssel összekevertük.
6. Másfél órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.
7. Újra centrifugáltuk 4°C-on, 12000 rpm-el 20 percen keresztül.
8. A felülúszót eltávolítottuk.
9. 1000 µl -20°C-os, 70%-os EtOH-t pipettáztunk hozzá.
10. Ezt is 20 percig, 4°C-on, 12000 rpm-el centrifugáltuk.
11. A felülúszót ismét leszívtuk.
12. Fél órára vákuum-centrifugába tettük (amíg ki nem száradt).
13. Végül a kicsapódott DNS-t 15 µl ddH₂O-val oldottuk fel.

5.3.2. Adapterek ligálása

Zane és mtsi (2002) cikke alapján a DNS-hez adaptereket illesztettünk. A tisztító lépés után a Tru1I enzimes hasítás során keletkezett ragadós végekhez ismert szekvenciájú adaptert ligáltunk a 7. ábrán látható módon, amelyek a vágáskor létrejövő ragadós végződésekhez kapcsolódtak. Az adaptert a Tru1I top és Tru1I bottom hibridizációjával állítottuk elő. A szekvenciák az 1. mellékletben láthatóak. A reakcióelegyetek és mennyiségüket a 2. táblázat tartalmazza.

5'GTAGACTGCGTACCTAA [] TTAGGTACGCAGTCTAC 3'
 3'CATCTGACGCATGGATT [] AATCCATGCGTCAGATG 5'

7. ábra: A DNS-hez kapcsolódó adapterek szekvenciája. Az adapter a Tru1I top és a Tru1I bottom oligonukleotidok hibridizálódásával áll össze, amelyek végei a Tru1I restrikciós enzim által vágott ragadós végekhez kapcsolódnak. Egymást kiegészítő (komplementer) tulajdonságuk miatt, a későbbiekben a Tru1I top oligonukleotid, mint primer vesz részt a reakcióban.

2. táblázat: Az összeillesztéshez használt komponensek és mennyiségek.

A ligálás összetevői:	A felhasznált mennyiség:
2x-es reakció-puffer (Fermentas)	10 µl
adapter:	2 µl
T4 DN- ligáz (Fermentas, 5 unit/µl):	1 µl
DNS:	5 µl
ddH ₂ O:	2 µl
Összesen:	20 µl

Az összemért reakcióelegyet 1-1,5 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd egy újabb tisztító lépésnek vetettük alá, a korábban ismertetett recept alapján.

5.3.3. A keletkezett fragmentumok megsokszorozása

A hasítás során keletkezett fragmentumokat a hozzájuk kötődött adapterekhez hibridizáló primerek segítségével PCR készülék (SwiftTM MaxPro, Esco Micro Pte. Ltd, Singapore) alkalmazásával felszaporítottuk. A 3. táblázatban láthatjuk a polimeráz láncreakció lépéseit, a folyamat során változó hőmérsékleteket és azok hosszúságát.

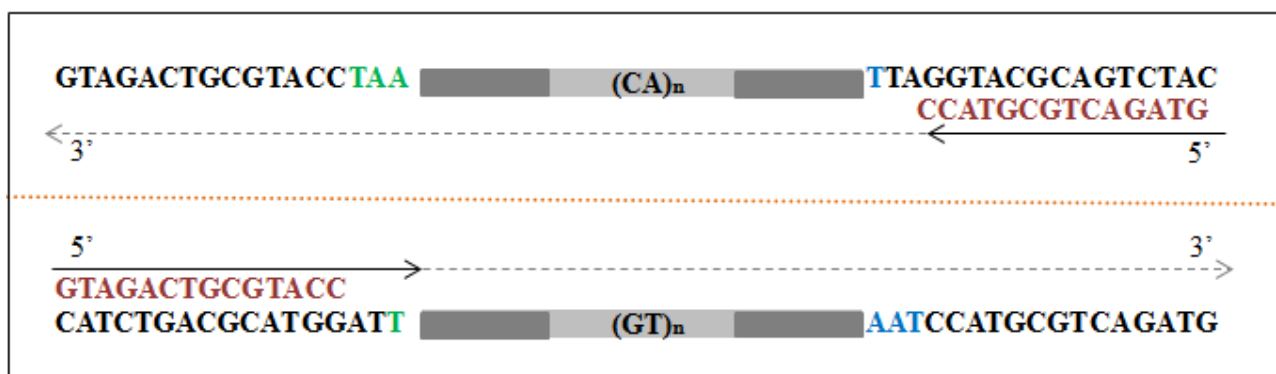
3. táblázat: A polimeráz láncreakció lépései, azok hőmérséklete és ideje.

A PCR lépései:	hőmérséklet:	idő:	
Denaturáció:	94°C	5 perc	} 25 ciklus
Denaturáció:	94°C	30 másodperc	
Primer-tapadás:	52°C	30 másodperc	
Polimerizáció:	72°C	45 másodperc	
Végső polimerizáció:	72°C	7 perc	
	4°C	∞	

4. táblázat: A PCR-hez összemért elegy komponensei és azok mennyisége.

A PCR reagensei:	A felhasznált mennyiség:
Taq 10x-es reakció-puffer (Fermentas):	2 µl
25mM MgCl ₂ :	0,96 µl
10mM dNTP-mix:	0,4 µl
Primer (Mse1 top, 10 µM):	2,5 µl
BSA (1mg/ml):	0,5 µl
Taq DNS-polimeráz (Fermentas, 1 unit/ µl):	0,5 µl
DNS:	1,5 µl
ddH ₂ O:	11,64 µl
Összesen	20 µl

A 4. táblázat a polimeráz láncreakció során felszaporított termék kiindulási összetevőit és mennyiségeiket tartalmazza. A 8. ábrán a primerek, és azok hibridizációs helyei láthatóak. A DNS-polimeráz 5'→3' irányba szintetizál, így az adapterek tulajdonságaiból adódóan a reakció során elegendő egyetlen primer. Ez a TruI oligonukleotid. Ezt a lépést is Zane és munkatársai (2002) cikke alapján végeztük el.



8. ábra: A primer tapadás. Az adapter primere a Tru1I top. A PCR során azért elegendő egy primer, mert a DNS 2 szálának szétválása során a polimerizáció mindkét esetben 5'-3'-s irányba történik. Az adapterek komplementaritása miatt az ellenkező irányú polimerizáció során azonos szekvenciákat kapunk.

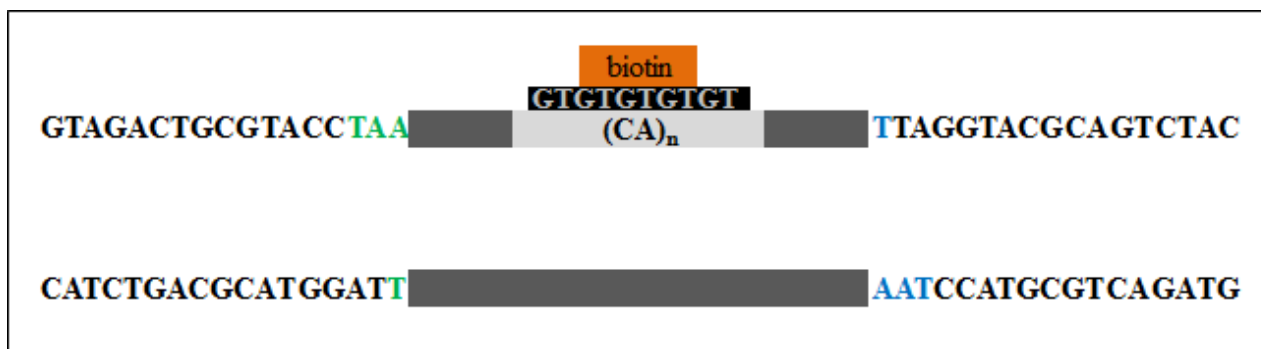
5.3.4. Mágneses szelekció

Mintánkban 2 bázispár hosszúságú (CA) szakaszokat szerettünk volna találni. Ebben a biotin-szreptavidin kapcsolaton alapuló mágneses szelekció segített. Ez a folyamat arra szolgált, hogy kiválasszuk azon fragmentumainkat, amelyek tartalmazzák ezt a mikroszatellit régiót. 5'-végen biotin-jelölt 10 bázispár hosszúságú (GT)₅ oligonukleotidokat adtunk a polimeráz láncreakció során felszaporított termékünkhöz. A hibridizáció komponensei az 5. táblázatban szerepelnek.

5. táblázat: A mágneses hibridizációban résztvevő összetevők és mennyiségük.

A hibridizáció elemei:	A felhasznált mennyiség
10μM (GT) ₅ :	2,5 μl
PCR termék:	6 μl
ddH ₂ O:	11,5 μl
Összesen:	20 μl

Az 5. táblázat alapján összeállított elegyet 7 percen keresztül 94°C-on tartottuk, majd másodpercenként 0,1°C-kal csökkentettük a hőmérsékletet a 20°C eléréséig. Ezalatt a DNS denaturálódott, majd a biotinnal jelölt szakaszok hozzákapcsolódtak a (CA) motívumokat tartalmazó DNS-darabokhoz. A folyamatot a 9. ábra mutatja (Bloor és mtsi., 2001).



9. ábra: A biotin-jelölt (GT)₅ szakaszok hozzáhibridizálódnak a keresett (CA)_n mikroszatellit régiókat tartalmazó DNS darabokhoz. A biotin molekulának a későbbiekben a kívánt motívumokat tartalmazó fragmentumok kiválasztásában lesz szerepe.

Az ezt követő lépés során a hibridizált termékeket mágneses szelekciónak vetettük alá, amely segítségével kiválogattuk azokat a DNS-darabokat, amelyekhez hozzákapcsolódtak a biotin-jelölt (GT)₅ ismétlődést tartalmazó szakaszok. A kiválasztódást mágnes gyöngy felületén található sztreptavidin molekula segítette. A sztreptavidin hozzá kötődött a (GT) ismétlődéseket tartalmazó fragmentumok biotin molekulájához. A mágnes gyöngyöket egy mágneses centrifugacső állvány segítségével gyűjtöttük össze. Ezzel elkülönültek a számunkra fontos (CA) szakaszt tartalmazó, illetve az azokat nem tartalmazó fragmentumok. Ez a 10. ábrán látható.

A mágneses szelekció menete:

Előmosás:

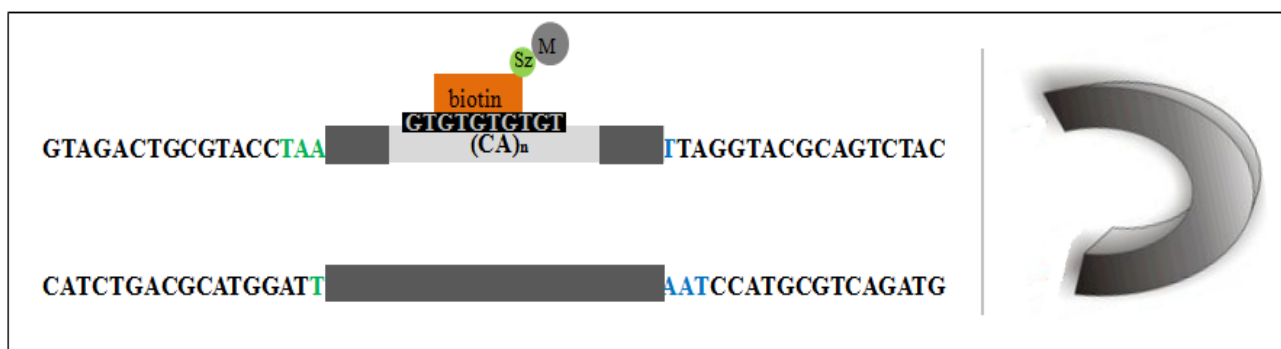
1. 10 µl felületkezelt sztreptavidin mágnes gyöngyöt (Dynabeads M-280 sztreptavidin, Life Technologies Corporation, Invitrogen) mértünk egy 1,5 µl-es centrifugacsőbe, majd ezt összevortexeltük.
2. A centrifugacsövet 2 percig egy mágneses mikrocentrifugacső-tartó állványra helyeztük, és megvártuk amíg a mágnes gyöngyök a cső falára a mágneshez tapadnak. A felülúszót eltávolítottuk.
3. 20 µl, egyszeres Binding and Wash (1M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) mosó-puffert adtunk hozzá és ezt felszuszpendáltuk (összekevertük).
4. A második és harmadik lépést kétszer megismételtük.

Előblokkolás:

- 20 μ l, kétszeres mosó-puffert adtunk a csövekbe, valamint további 20 μ l indifferens (bármilyen) PCR terméket.
- 5 percig óvatos pipettázással összekevertük az elegyet.
- Ismét mágnesre helyeztük 2 percre, majd leszívtuk a felülúszót.

Mágneses szelekció:

- 20 μ l, kétszeres mosó-puffert, 10 μ l mintát a keletkezett termékünkől, 2 μ l indifferens PCR terméket és 8 μ l ddH₂O-t adtunk a pellethez, amit 15 percig kevergettünk.
- 15 perc után 2 percre mágnesre helyeztük és ismét leszívtuk a folyadékot.
- További 37 μ l, egyszeres mosó-puffert és 3 μ l indifferens PCR terméket mértünk a csövünkbe.
- 5 percig kevergettük, majd újra a mágnes oszlopra helyeztük és leszívtuk a felülúszót.
- 37 μ l, egyszeres mosó-puffert valamint 3 μ l indifferens terméket adtunk a rendszerhez és ezt 20 percig ráztuk.
- 3 percre a mágnes oszlopra helyeztük, majd ismét leszívtuk az áttetsző folyadékot.
- A 12-es és 13-as lépést megismételtük.
- Végül 25 μ l T₁₀E₀ (10 mM TrisCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0) pufferrel és 2,58 μ l ddH₂O-val kevertünk.



10. ábra: A (CA)_n szakaszhoz hozzáhibridizálódott a biotinnal jelölt (GT)₅ szakasz. A biotinhoz hozzákapcsolódott a streptavidin (zöld). Végül a mágnes gyöngy (szürke) által a mágnes oszlopba helyezett centrifuga csövünk falához tapadtak.

6. táblázat: A mágneses szelekciót ellenőrző reakcióelegy összetevői és mennyiségeik.

A PCR reakció komponensei:	A felhasznált mennyiség:
Taq 10x-es reakció-puffer (Fermentas):	4 μ l
25mM MgCl ₂ :	1,92 μ l
10mM dNTP-mix:	0,8 μ l
Primer (Mse1 top, 10 μ M):	6,4 μ l
BSA (1mg/ml):	1 μ l
Taq DNS-polimeráz (Fermentas, 1 unit/ μ l):	1 μ l
DNS:	3 μ l
ddH ₂ O:	21,88 μ l
Összesen:	40 μl

A mágneses hibridizáció sikerességét PCR-rel, majd a keletkezett termék gélelektroforézisével ellenőriztük. A 6. táblázatban ezen lépések összetevőit foglaltuk össze. A 7. táblázat pedig a polimeráz-lánreakció során végbemenő folyamatot tartalmazza. Ebben a fejezetben Bloor és mtsi (2001) cikke alapján dolgoztunk.

7. táblázat: A hibridizációt ellenőrző PCR reakció programja a következő volt.

PCR reakció lépései:	hőmérséklet:	idő:	
Denaturáció:	94°C	6 perc	
Denaturáció:	94°C	30 másodperc	} 30 ciklus
Primer-tapadás:	52°C	30 másodperc	
Polimerizáció:	72°C	45 másodperc	
Végső polimerizáció:	72°C	30 perc	
	4°C	∞	

5.3.5. A szelektált fragmentumok klónozása

Mivel elméletileg eljutottunk odáig, hogy már a centrifugacső csak a számunkra fontos fragmentumokat tartalmazza, ezeket klónozással választottuk szét. A DNS-darabjainkat pTz57R/T vektorba (InsTA Clone PCR Cloning Kit Fermentas- Thermo Scientific, Burlington, Kanada) illesztettük, majd a ligátumokat DH5 α kompetens sejtekbe transzformáltuk. A 8. táblázatban az összekapcsolás komponenseit láthatjuk. Az így keletkezett elegyet egy éjszakán át 4°C-on tartottuk.

8. táblázat: A mágnesezés után keletkezett termék ligálásához használt összetevők és mennyiségeik.

Ligálás komponensei:	A felhasznált mennyiség
5x-ös ligáló-puffer (Fermentas):	3 µl
Plazmid (pTz57R/T, 55mg/µl):	1,5 µl
T4 DNS-ligáz (Fermentas, 5 unit/ µl):	0,5 µl
PCR termék:	4 µl
ddH ₂ O:	6 µl
Összesen:	15 µl

Következő nap 50 µl DH5α kompetens sejthez hozzáadtunk 5 µl-t a ligátumunkból. Ezt 10 percig jégen tartottuk, majd 1 percre 42°C-ra helyeztük. Végül 1-2 perc alatt ismét visszahűtöttük. Az *E.coli* baktériumnak 950 µl LB-t (Bacto-Trypton 10g, élesztőkivonat 5g, NaCl 10g, Agar por 15g/l) adtunk, majd 37°C-on 1,5 órán keresztül rázattuk. Ezen idő alatt a baktériumok osztódásnak indultak. Másfél órával később következett a szélesztés. Ehhez szükségünk volt a táptalajt tartalmazó plate-re (LB + ampicillin), 50 µl X-Gal-ra, valamint 100 µl IPTG-re (Life Technologies Corporation, Invitrogen, 200g/ml). A kimért X-Gal-t és IPTG-t összekevertük, majd egyenletesen felvittük a plate-re. 15 perc várakozási idő után ugyanezt tettük 150 µl felszaporított *E.coli* baktériummal.

Sikeres transzformáció és szélesztés után másnap kék és fehér telepeket láthattunk a plate-n. A pozitív telepek azok, amelyek nem mutatták a kék színreakciót. Következésképpen a fehér telepekkel dolgoztunk tovább. Ezeket masterplate-re vittük át. Minden jól elkülöníthető telepre kolónia PCR-t mértünk össze. A 9. táblázatban tüntetjük fel a kolónia PCR elemeit, amelyben a DNS-templát a masterplate-re átkent baktériumtelep maradéka volt.

9. táblázat: A kolónia PCR reakcióelegy komponensei és mennyiségeik.

A kolónia PCR komponensei:	A felhasznált mennyiség:
Taq 10x-es reakció-puffer (Fermentas):	1,25 µl
25mM MgCl ₂ :	1,25 µl
10mM dNTP-mix:	0,25 µl
Primer (M13 forward, 10µM):	0,5 µl
Primer (M13 reverse, 10µM):	0,5 µl
Taq DNS-polimeráz (Fermentas, 1 unit/ µl):	0,3 µl
ddH ₂ O:	8,45 µl
Összesen	12,5 µl

10. táblázat: A kolónia polimeráz láncreakció programja.

A kolónia PCR reakció lépései:	hőmérséklet:	idő:	
Denaturáció:	94°C	5 perc	} 30 ciklus
Denaturáció:	94°C	45 másodperc	
Primer-tapadás:	45°C	60 másodperc	
Polimerizáció:	72°C	90 másodperc	
Végső polimerizáció:	72°C	5 perc	
	4°C	∞	

Az összemért elegybe beleértettük a baktériumtelep leszedését segítő pipetta hegyet. A program végeztével ismét gélelektroforézist csináltunk.

5.3.6. Plazmid izolálás

A kolónia PCR után a pozitív telepeket folyadékkultúrában felszaporítottuk. A masterplate-ről külön üvegcsékbe 2 µl ampicillint tartalmazó 2 ml folyékony LB táptalajba vittük át a telepeket. Egy éjszakán át 37°C-on ráztuk, másnap plazmidot izoláltunk belőle, amelyhez az E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit-tet (Omega, USA, Kalifornia) használtuk és a megadott, Plasmid Mini Spin Protocol szerint jártunk el. Ennek sikerességét NanoDrop-pal ellenőriztünk. Hasítással még egyszer ellenőriztük az inzert beépülését. A hasítás összetevőit mutatja a 11. táblázat.

11. táblázat: A hasítás során összemért reagensek és mennyiségük.

A hasítás összetevői:	A felhasznált mennyiség:
10x-es F.D. Green-puffer (Fermentas)	2 µl
BamHI (10 unit/µl):	1 µl
XbaI (10 unit/µl)	1 µl
plazmid:	2 µl
ddH ₂ O:	12 µl
Összesen:	20 µl

A hasítási elegyet 15 percig 37°C-on inkubáltuk, majd további 10 percre 65°C-ra helyeztük. Utána ellenőrzésként ismét gélelektroforézist végeztünk.

5.3.7. Szekvencia-analízis

A plazmidok szekvencia-analízisére az MTA Szegedi Biológiai Központjában került sor. A nukleotidok sorrendjének meghatározását a BAYGEN (Bay Zoltán Közhasznú Nonprofit Kft. Növénygenetika Intézetének Kapilláris Szekvenáló Platformja) végezte.

5.3.8. Primer fejlesztés

Amennyiben valóban tartalmazott mikroszatellit motívumot a DNS-szakasz, a Primer 3 interneten elérhető software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) segítségével primereket fejlesztettünk rájuk. A primereket a Csertex Kft-től (Magyarország, Budapest) rendeltük.

5.3.9. A kifejlesztett primerek működésének optimalizálása

A primerek megérkezése után ellenőriztük működésüket, valamint optimalizáltuk a primerek tapadási hőmérsékleteit. A Csertex Kft. a megrendelt primerekhez megadta az optimális primertapadási hőmérsékletet, az RhpB13 primer esetében a forward-nak 53°C a reverse-nek 57°C, az RhpB14a-nál 53°C és 55°C, az RhpB14b-nél 47°C és 57°C. Az adatok alapján 53°C-on próbáltuk ki őket. Később a kifejlesztett primerek tapadási hőmérsékletének optimalizálása gradiens PCR segítségével történt, melynek összetevőit a 12. táblázat mutatja.

12. táblázat: A gradiens PCR reakcióelegy összetevői és mennyiségei.

A gradiens PCR elemei:	A felhasznált mennyiség:
Green Taq 10x-es reakció-puffer (Fermentas):	2 µl
10mM dNTP-mix:	0,4 µl
Primer (RhpB14a forward, 10 µM):	0,5 µl
Primer (RhpB14a reverse, 10 µM):	0,5 µl
Dream Taq DNS-polimeráz (Fermentas, 1 unit/ µl):	0,15 µl
DNS (V2, olasz)	1 µl
ddH ₂ O:	15,45 µl
Összesen:	20 µl

A gradiens PCR annyiban speciális, hogy az általunk használt készülék a ciklus 3. lépésében különböző primertapadási hőmérsékleteket képes biztosítani. A programozás során a primertapadási hőmérsékletre intervallumokat kellett megadtunk. A primerek működését gélelektroforézissel ellenőriztük.

5.3.10. A molekuláris marker variabilitásának ellenőrzése (fragmentumhossz-analízis)

Végül a *Rhodiola rosea* faj különböző populációiból származó egyedeken megvizsgáltuk a kifejlesztett primerek által felszaporított mikroszatellit régiók genetikai variabilitását.

13. táblázat: A polimeráz láncreakció összetevői és mennyiségei.

A PCR elemei:	A felhasznált mennyiség:
Dream Taq 10x-es reakció-puffer (Fermentas):	2 µl
10mM dNTP-mix:	0,4 µl
Primer (RhpB14a forward, 10 µM):	0,4 µl
Primer (RhpB14a reverse, 10 µM):	0,5 µl
Primer (M13*, 10 µM):	0,3 µl
Dream Taq DNS-polimeráz (Fermentas, 1 unit/ µl):	0,15 µl
DNS:	1 µl
ddH ₂ O:	15,25 µl
Összesen:	20 µl

A 13. táblázatban látható a polimeráz-láncreakcióban résztvevő komponensek és mennyiségeik. A PCR során a 3 különböző primer-párra, a gradiens PCR által optimalizált primertapadási hőmérsékleteket állítottuk be. A kifejlesztett primereket számos egymástól távol eső populáció egyedeinek DNS-ével vizsgáltuk meg.

A polimeráz láncreakcióban az M13* primer egy 5' FAM fluoreszcens jelölést tartalmazó oligonukleotid (1. melléklet). A fluoreszcens jelölés a fragmentumhossz-analízishez szükséges. A tervezett (RhpB14a) primer-pár működését gélelektroforézissel ellenőriztük. A másik két primer-pár esetében hasonlóan jártunk el.

A gélelektroforézis alapján kiválasztottuk a megfelelően amplifikálódott mintákat, melyeket fragmentumhossz-analízisre küldtünk.

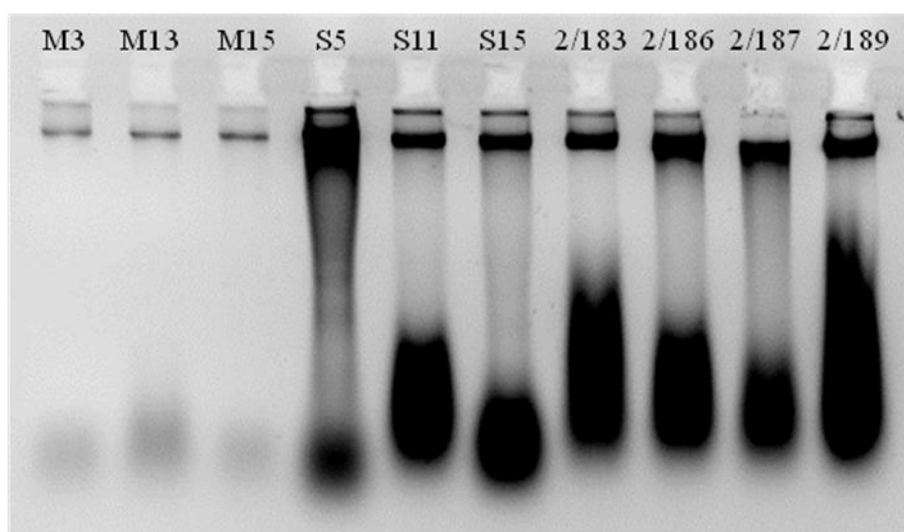
A DNS-szakaszok méretének meghatározásához szükséges, hogy a primerek egyike fluoreszcens jelölést hordozzon. A fluoreszcens jelölés azonban nagyon drága. A költségek csökkentése érdekében alkalmaztuk a Schuelke (2000) által fejlesztett módszert. A fluoreszcens jelölést az M13* nevű általános primer hordozza és az általunk tervezett primereket úgy rendeltük, hogy azok tartalmazzák a jelölt primer nukleotid sorrendjét is. Így 3 primer vesz részt a reakcióban, amelynek során a DNS-hez hibridizáló primerhez kapcsolódik hozzá egy következő ciklusban a jelzést hordozó M13* primer. A DNS szakaszok hosszának meghatározása egy lézeres detektáló

rendszerben történik (Schuelke, 2000). A kifejlesztett primerek által felszaporított mintáink fragmentumhossz-analízisét a BIOMI Kft. (Magyarország, Gödöllő) végezte.

6. EREDMÉNYEK

6.1. DNS kivonás

Munkánk kezdetén a Genetika és Növénynevelés Tanszék DNS-bankjából származó *Rhodiola rosea* egyedek közül 10 növény fagyasztott leveléből vontuk ki a DNS-t. A DNS-ek Svájcban (M3, M13, M15), Szlovéniából (S5, S11, S15) és Norvégiából (2/183, 2/186, 2/187, 2/189) származtak. A NanoDrop-al végzett mérés eredményeképpen ezek DNS-koncentrációja 100 és 200 ng/μl között volt. A 11. ábrán ezen minták gélelektroforézis utáni képét láthatjuk.



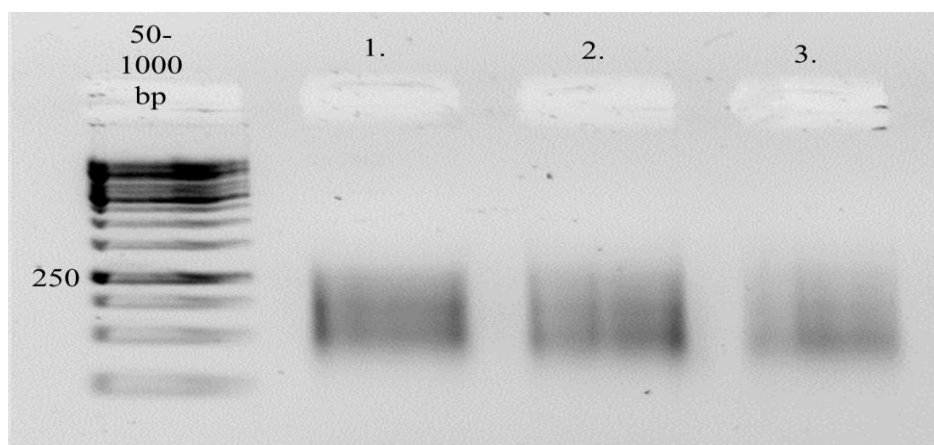
11. ábra: A DNS-kivonás után a megfelelőnek bizonyuló magas koncentrációjú minták gélelektroforézise. A gélkép alapján az S5-ös, szlovéniai *Rhodiola rosea*-ból kivont DNS-t választottuk.

A gélkép és a koncentrációtartalom alapján az S5-ös, szlovéniai *Rhodiola rosea* DNS-e bizonyult a legmegfelelőbbnek, így munkánk során a továbbiakban ezzel dolgoztunk.

6.2. SSR marker-fejlesztés

6.2.1. A genomi DNS restrikciója

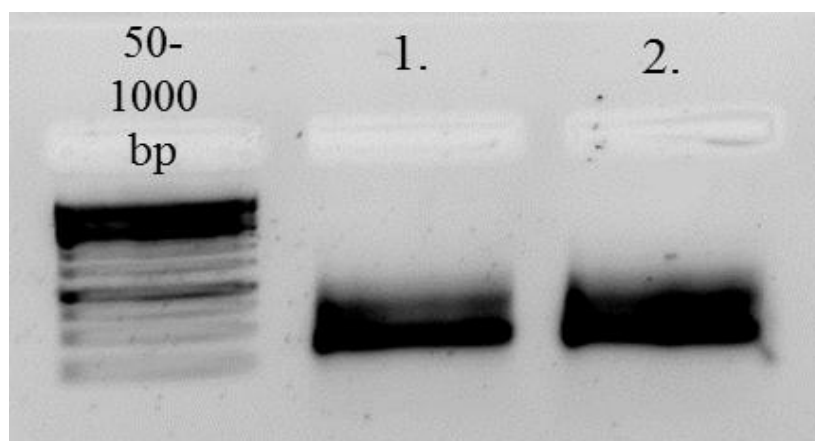
A kiválasztott S5-ös mintát az MseI (TruII) restrikciós enzimmal hasítottuk. A vágást adapter ligálása követte, majd ezen fragmentumokat PCR-el felszaporítottuk. A 12. ábrán látható, hogy a PCR reakció sikeresnek mondható, vagyis különböző méretű DNS-fragmentumok képződtek.



12. ábra: A termék jelenlétének ellenőrzése. Az itt látható gékép alapján bizonyosodtunk meg arról, hogy az ellenőrző polimeráz láncreakció megfelelően működött, és eddigi munkánk sikeresnek mondható. A termékben sok, különböző méretű fragmentum jelenléte volt megfigyelhető. Az ábrán látható számok a PCR reakció kiindulási DNS mennyiségét jelölik. Az 1. zsebben 0,75µl, a 2-ban 1,5µl a 3-ban pedig 2,5µl volt az elegy kezdeti DNS-tartalma. A 2-es termékkel folytattuk munkánkat.

6.2.2. *Mágneses szelekció*

A következő lépés során szelektálnunk kellett a mikroszatellit régiót valóban tartalmazó DNS-szakaszokat. Ezt a mágneses szelekció elve alapján végeztük el. A keletkezett terméket ismét ellenőriznünk kellett. A 13. ábrán látható két “smear” bizonyítja, hogy a termékünk jelen van keletkezett elegyben.

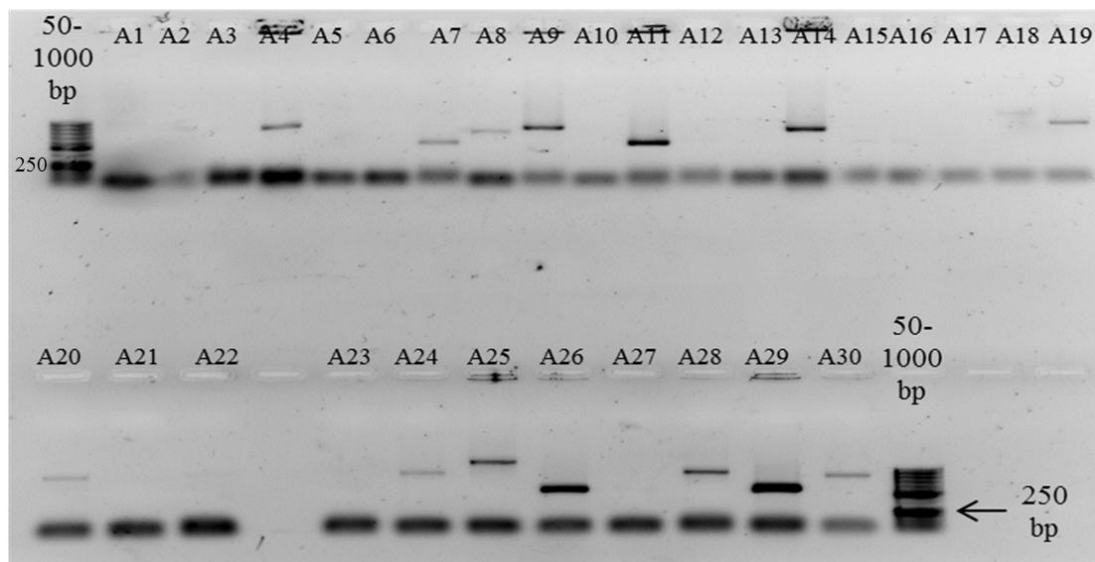


13. ábra: A mágneses hibridizáció sikerességét ellenőrző PCR reakció termékeinek géképe. A látható 2 “smear” mutatja a sokféle méretű DNS-szakaszok jelenlétét. Az 1. és a 2. amplifikonok között az a különbség, hogy a másodikban a PCR reakció kiindulási termékét kétszeresére hígítottuk.

6.2.3. *A szelektált fragmentumok klónozása*

Mivel várakozásaink szerint már csak a mikroszatelliteket tartalmazó fragmentumok voltak jelen az oldatban ezeket pTz 57 R/T vektorhoz kapcsoltuk, majd kompetens sejtbe transzformáltuk.

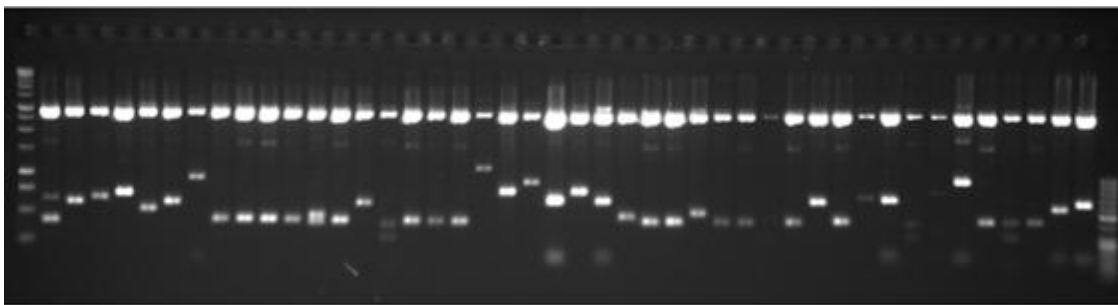
A kolónia PCR során további szelekcióra volt lehetőségünk, melynek gélelektroforézis utáni eredményét a 14. ábra tartalmazza. Összesen 106 kolóniát ellenőriztünk polimeráz-láncreakcióval, majd a gélelektroforézis alapján választottuk ki a megfelelő mintáinkat. Ahol történt polimerizáció ott eltérő méretű, a $(CA)_n$ motívumot feltételezhetően tartalmazó DNS-szakaszok láthatóak. A következő lépést 44 mintával folytattuk a kolónia PCR alapján.



14. ábra: A kolónia PCR során felszaporított fragmentumok gélelektroforézisének részlete látható. Összesen 106 kolóniát ellenőriztünk polimeráz-láncreakcióval, majd a gélelektroforézis alapján választottuk ki a megfelelő mintáinkat. A gélkép alapján határozottan elkülöníthetőek a fragmentumokat tartalmazó, illetve az azokat nem tartalmazó minták. Az A4, A7, A8, A9, A11, A14, A19, A20, A24, A25, A26, A28, A29, A30-as minták feltételezhetően valójában tartalmaztak $(CA)_n$ ismétlődésű mikroszatellit régiókat.

6.2.4. Plazmid izolálás

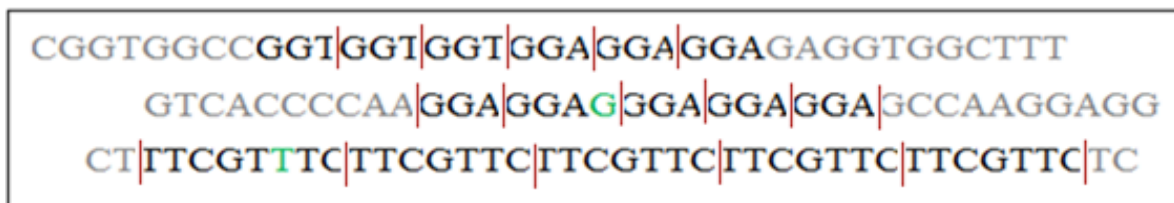
A kolónia PCR során a pozitív mintákból plazmidot izoláltunk. Ezt a lépést NanoDroppal ellenőriztük. Ezen eredményeket a 2. mellékletben tüntettük fel. A megfelelő koncentrációjú plazmidjainkat meghasítottuk, hogy a beépült inzertünket láthatóvá tegyük. A 15. ábra a hasítás utáni gélelektroforézis eredményét szemlélteti. Ahol valóban megtörtént a hasítás azokat a klónokat szekvencia-analízisre küldtük Szegedre, a Baygen Intézetbe.



15. ábra: A plazmid izolálás után végzett hasítás ellenőrzése. A gélképen látható, hogy feltételezéseink szerint az összes minta tartalmazza a beépült inzertet. A képen 3000 bp körül láthatóak a plazmidok, míg alattuk a kihaladt inzertek. 44 mintát küldhettünk szekvencia analízisre. A gél bal oldalán 1 kb-s Gene Ruler (Fermentas) létra, jobb oldalt 50 bp-s (Fermentas) létra segíti a méretek meghatározását.

6.2.5. Szekvencia-analízis

A minták szekvencia-analízisének eredményét szemlélteti a 16. ábra. Jól láthatóak a talált ismétlődő régiók. A megszekvenált 44 mintából mindössze 3 tartalmazott valójában tandem-ismétlődésű motívumokat és ezekben sem a várt (CA)_n mikroszatelliteket találtuk.



16. ábra: A szekvencia-analízis alapján ezen mikroszatellit régiókat találtuk a fragmentumokban. Ezekre az ismétlődésekre történt a primer fejlesztés, melyet számítógép által végeztünk.

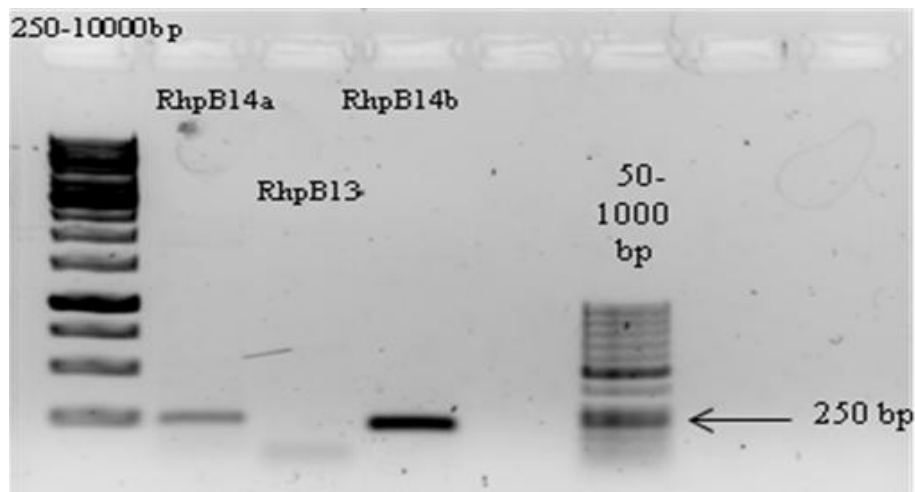
6.2.6. Primer-fejlesztés

A primerek a 16. ábrán látható tandem-ismétlődésű régiók felszaporítására lettek tervezve. Ezt az interneten szabadon elérhető Primer 3 Program segítette. A tervezett primerek szekvencia sorrendje az 1. mellékletben látható. A 3. mellékletben láthatjuk a számítógép által ajánlott az ötszörös ismétlődésű, 7 nukleotid hosszúságú mikrosatellitekre fejleszthető primer-párok lehetőségeit.

6.2.7. A kifejlesztett primerek működésének optimalizálása

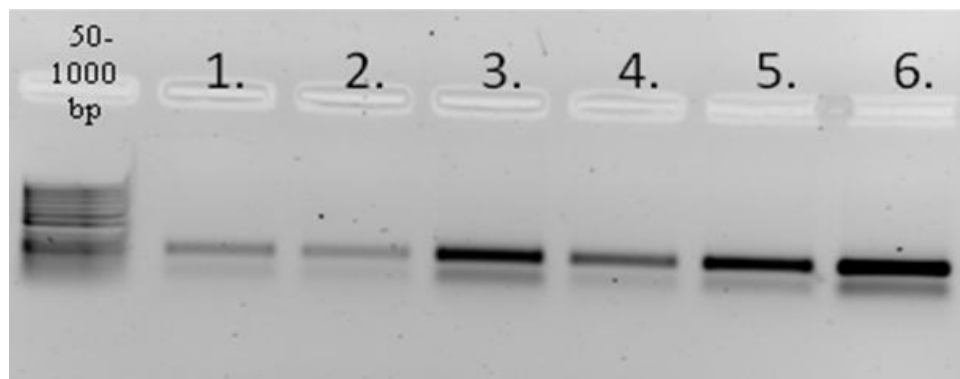
A primerek működését PCR-rel ellenőriztük. A polimeráz láncreakciót a B2-es, svájci *Rhodiola rosea* DNS-ével végeztük el 53°C-on. A 17. ábra szemlélteti az eredményeket. Ez alapján

megállapíthattuk, hogy a primerek működnek ezen a hőmérsékleten, de az RhpB14a- és az RhpB13 primer-párok esetében gyenge volt az amplifikáció, így további optimalizációt igényeltek.



17. ábra: A primerek működésének ellenőrzése. A gélképen 250 bp-nál láthatóak a felszaporított fragmentumok a várt méretben. Az RhpB13 és RhpB14a primereknek további PCR-ekkel optimalizáltuk a működésüket.

A 18. ábrán az RhpB14a gradiens polimeráz láncreakciója eredményeként kapott gélkép látható. A reakciót egyetlen, a V2 (olasz) DNS felhasználásával, különböző hőmérsékleteken végeztük el.



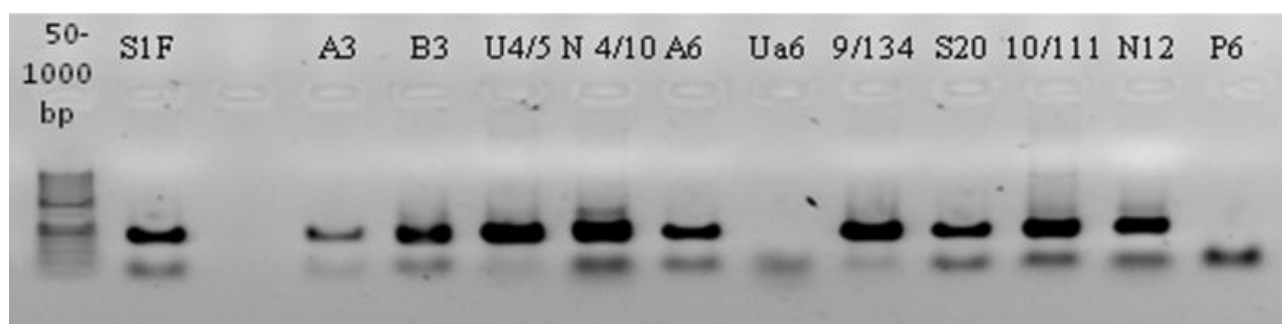
18. ábra: Az ábrán az RhpB14a primer gradiens PCR-e látható az olasz V2-es DNS felhasználásával. A képen látható számok különböző hőmérsékleteket jelölnek. 1. 53°C, 2. 55,8°C, 3. 57,3, 4. 59°C, 5. 61,5°C, 63°C. 250 bp-nál láthatóak a felszaporított fragmentumok és mivel ez 63°C-on is végbement, így az RhpB14a primer esetében ez lett a kiválasztott primer tapadási hőmérsékletének.

Mivel a PCR 63°C-on is megfelelően működött, a populációk vizsgálatához az RhpB14a primertapadási hőmérsékletének ezt választottuk. A másik 2 primerrel ugyanígy jártunk el. Az

RhpB14b primer optimális tapadási hőmérsékletének az 53°C bizonyult. Az RhpB13 primer estében nem tudtunk tökéletes tapadási hőmérsékletet megállapítani.

6.2.8. A molekuláris marker variabilitásának ellenőrzése (fragmentumhossz-analízis)

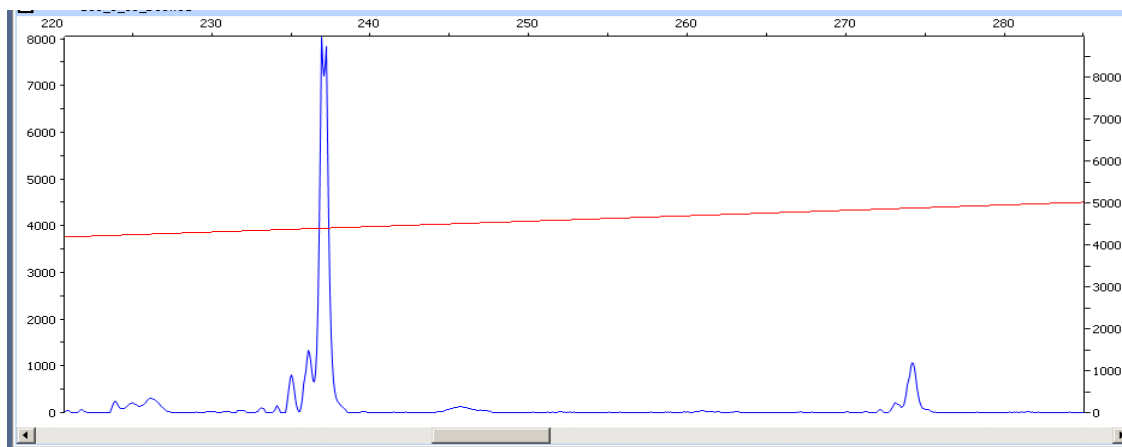
Munkánk végezetéül számos, különböző elterjedési területről származó *Rhodiola rosea* fajt vizsgáltunk meg. A 19. ábrán a vizsgált populációk RhpB14b primerrel történő PCR termékeinek gélelektroforézise látható.



19. ábra: A gélképen szlovén (S1, S20), norvég (N4/10, 9/134, 10/ 111), svájci (B3, Ua6, N12, P6) osztrák (A3, A6) és orosz (U4/5) *Rhodiola rosea* DNS-einek PCR utáni gélelektroforézisének eredménye látható az RhpB14b primerrel. 250 bp-nál láthatóak az amplifikált DNS-szakaszok. Az Ua6 és a P6 svájci minta esetében a primer nem működött.

A 19-es ábra alapján az RhpB14b primer által felszaporított termékeink közül az Ua6 és a P6 (svájci) minták kivételével a többit fragmentumhossz-analízisre küldtük. A másik két primer esetében ugyanígy jártunk el.

A kapott eredmények alapján pontos következtetéseket vonhattunk le a kifejlesztett molekuláris markerek polimorfizmusáról. Az eredményeket kromatogram formájában kaptuk meg. A 20. ábrán erre láthatunk egy példát. A fragmentumhossz-analízis alapján az RhpB14a primer-pár működött a legjobban, de az általuk felszaporított DNS szakaszok nem mutattak variabilitást, az RhpB14b esetében 2 szekvencia között megfigyelhetőek eltérések. Ugyanez a primer 3 fragmentumot amplifikált, de a 214-es szakaszoktól eltekinthetünk, mert a vizsgált populációk esetében változatlan, így ezt kizárhatjuk a kiértékelés során. Az RhpB13 primer által felszaporított ötszörös, 7 nukleotidot tartalmazó mikroszatellit régió több allélváltozatot eredményezett, a lókuszt tehát polimorf.



20. ábra: A fragmentumhossz-analízis eredményének egyike. Az ábrán az RhpB13 primer S5-ös, szlovéniai mintával történő amplifikációjának kromatogramja látható.

Az RhpB13 primernél a fluoreszcens jelölésű primert beleszámítva 239, az RhpB14a primernél 250 és az RhpB14b primer esetében 218 a várható fragmentum-hossz. A kromatogramok alapján kiértékelt eredményeket, a primer által felszaporított DNS szakaszok nagyságát (a leolvasható csúcsokat) a 14. táblázat tartalmazza.

14. táblázat: A fragmentumhossz-analízis eredményei.

DNS	RhpB13 primer (bp)		
N1/65	237	223	272
U4/5	216	223	258
S10		223	258
S5	237	223	272
U4/5	151	223	160
U2/1	216	223	
DNS	RhpB14a primer (bp)		
9/134	247	238	
B2	247	238	
S19	247	238	232
Ua2	247	238	229
P2	247	238	229
N2	247	238	
DNS	RhpB14b primer (bp)		
9/134	180	214	244
A3	209	214	
B3	180	214	189
S20	203	214	248
U4/5	180	214	197
10/111	203	214	

A fragmens-hossz analízis eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy az RhpB14a primer monomorf, az RhpB14b primer esetében megfigyelhető variabilitás, így ezzel a primerrel a jövőben további vizsgálatokat kell majd végeznünk. Mivel a *Rhodiola rosea* egy diploid, idegentermékenyülő növény, általában nagy a heterozigóták aránya, ezért feltételezhetően 2 különböző hosszúságú fragmentum amplifikációja várható. A 14. táblázatban látható, hogy néhány minta esetében 3 fragmentum méretet detektáltunk. Ez azt jelenti, hogy a primer multi-lókusz, azaz több helyre is beköt. A minden esetben azonos csúcsoktól eltekinthetünk a kiértékelés során.

Mivel az RhpB13 primer tapadási hőmérsékletét nem tudtuk tökéletesen optimalizálni, így a tervezett molekuláris markerünk további fejlesztésekre szorul. A fragmentumhossz-analízisre küldött termékeink a kísérletezések alkalmával (különböző hőmérsékleteken: 45°C, 48°C 51°C) keletkeztek, ugyanis a reakció végbement, csak nem a kívánt megbízhatósággal. Kutatásunk ezen szakaszában azonban ez elegendőnek tekinthető, ugyanis elsődlegesen meg kellett győződnünk a lókusz polimorfizmusáról. Mivel a genetikai variabilitás alapja az, hogy a lókusz variábilis legyen, ennek megbizonyosodására ezekkel is elvégeztettük a fragmentum-hossz analízist.

7. MEGVITATÁS

Az elért eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a *Rhodiola rosea* genomjában fellelt mikroszatellit (TTGATTC)₅ és a (GGT)₃(GGA)₃ ismétlődéssel megvalósítottuk a munkánk kezdetén kitűzött célokat. A továbbiakban ezeket a motívumokat határoló régiókra újabb primereket fogunk tervezni.

A molekuláris marker fejlesztése során problémát jelentett, hogy a szekvencia-analízisre küldött 44 minta közül mindössze 3 tartalmazott valójában mikroszatellit régiót. Mivel minden ellenőrzőpont a várakozásoknak megfelelő eredményt mutatott, így elméletileg az összes mintának kellett volna tandem-ismétlődésű motívumot tartalmaznia.

Az említett várakozásnak látszólag ellentmondó eredmény oka az lehet, hogy a mágneses szelekció során a biotin-jelölt (GT)₅ oligonukleotid túl rövid, így olyan szakaszokhoz is hozzáhibridizálódhatott, amelyek nem tartalmazták a kívánt (CA)_n régiót. A probléma áthidalására megoldást jelenthetne egy hosszabb biotin-jelölt szakasz alkalmazása. Kutatásunk során azért próbálkoztunk mégis az ötszörös ismétlődésű biotin-jelölt oligonukleotiddal, mert feltételeztük, hogy ennek rövid komplementer szakasza nagyobb valószínűséggel fordul elő a *Rhodiola rosea* genomjában. Emellett egy hosszabb szakasz alkalmazásának hátulütője lehet, hogy a genom jóval kisebb arányban tartalmazza a kívánt fragmentumokkal komplementer hosszúságú szakaszokat, így a hibridizáció esetlegesen nem is következhetett volna be.

A következő hibaforrás feltételezhetően a mágneses szelekció folyamata, melyben az elkülönítés során biotin-jelölés mentes fragmentum is maradhatott a kiválasztott DNS-szakaszok között. Ennek megakadályozását indifferens PCR termék hozzáadásával próbáltuk kiküszöbölni.

Továbbá, mivel a szekvencia analízis rendkívül költséges, ezért szükséges lenne egy köztes lépés a nem kívánt szakaszok számának csökkentésére. Ez a lépés lehetne a plazmid izolálást követő Southern blotolás, lehetőség szerint radioaktívan jelölt próbával. A Southern blotolás egy hibridizáción alapuló eljárás, amelynek során a gélen elválasztott, információt hordozó fragmentumokat egy membránra viszik át, majd lúgos kezeléssel elválasztják a DNS 2 szálát. Ezt követően az egyszálú szakaszokhoz fluoreszcens jelölt, ismert génszakaszokat hibridizálnak. A jelölés alapján további szelekció végezhető a szekvenciák között. Laboratóriumunkban sajnos nincs lehetőségünk radioaktív vizsgálatokra.

Mivel a *Rhodiola rosea* esetében a genomméret ismeretlen, így nem tudunk biztos következtetéseket levonni munkánk eredményességét illetően. A FIASCO módszer alkalmazásával 50-95%-os eredményre számíhattunk.

A *Rhodiola rosea* esetében eddig csak Zini és mtsi. (2009) fejlesztettek mikroszatellit markereket. A FIASCO technika alkalmazásával 96 klónt szekvenáltak. Ezek közül csak 23 tartalmazott valójában mikroszatellit motívumot. Ezekre terveztek primereket, amelyek közül 8 nem működött, de a fennmaradó 15 amplifikálta a DNS-szakaszokat. A felszaporított fragmentumok elemzése után 8 lókuszbizonyult polimorfoknak. A Genetika és Növénytermesztés Tanszéken végzett kutatások alapján, a gyakorlatban ezek közül mindössze a fele működik megbízhatóan (György és mtsi., 2012a és 2012b).

Az általunk fejlesztett molekuláris markerek esetében 44 klónt szekvenáltunk és 3 primert fejlesztettünk. A kifejlesztett primerek mind működtek, közülük sajnos azonban 1 nem volt variábilis, de 2 mutatott különbségeket a vizsgált populációk között. Az RhpB13 és az RhpB14b lókuszbizonyult populációgenetikai vizsgálatokra történő felhasználásának alkalmazhatósága még tökéletesítésre szorul. Összességében Zini és mtsi (2009) 15%-os eredményt értek el, az általunk végzett kutatás 7%-os eredményességgel zárult.

Wuthisuthimethavee és mtsi. (2003) a *Panaeus monodon* (óriási tigrisrák) esetében 406 kiválasztott klónból 129-re fejlesztettek primert, amelyek közül 30 használható, amely azt jelenti, hogy a mikroszatellit marker fejlesztés során ők is 7 %-os eredményt értek el.

A kísérletet megismételtük az (AT)₅ oligonukleotidokkal, de a fragmentumhossz-analízis után 14 mintából egyik sem tartalmazott elegendő ismétlődésű mikroszatellit motívumot. A korábbi eredményeket figyelembe véve nem volt nagy a valószínűsége, hogy találunk megfelelő ismétlődésű régiókat. Azonban több, rövidebb ismétlődést mégis sikerült kinyernünk, de ezek sajnos nem elegendő hosszúságúak primer-fejlesztés céljából.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban ismertetett munkát a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszéken folyó *Rhodiola rosea* gyógynövénnel végzett kutatások alapozták meg. A populációgenetikai vizsgálatok DNS-alapú molekuláris markerekkel történnek. A rózsagyökér esetében eddig mindössze 8 faj-specifikus mikroszatellit markert publikáltak (Zini és mtsi., 2009), melyek közül a tanszéki tapasztalatok alapján csak 4 alkalmazható megbízhatóan (György és mtsi. 2012a és 2012b). Célunk a mikroszatellit markerek számának gyarapítása volt.

A munka első lépéseként mikroszatellit (SSR) régiókat kerestünk a *Rhodiola rosea* genomjában. A *TruI* restrikciós enzim segítségével feldaraboltuk a rózsagyökér genomját. A keletkezett DNS-fragmentumokhoz adaptereket ligáltunk, amelyek lehetővé tették a keletkezett DNS-szakaszok PCR-rel történő felszaporítását.

A következő lépésben a keletkezett DNS-fragmentumokat szelektálva, a mikroszatelliteket tartalmazó, illetve az azokat nem tartalmazó DNS-darabok elkülönítéséhez mágneses szelekciót alkalmaztunk a biotin-sztreptavidin kapcsolaton alapuló hibridizáció segítségével (Bloor és mtsi., 2001).

A szelektált fragmentumokat - amelyek feltételezhetően már csak a mikroszatellit motívumokat tartalmazták - plazmidba klónoztuk, majd *E. coli* sejtekben felszaporítottuk. A kolónia PCR-rel ellenőriztük az inzertek beépülését és plazmid izolálás után a megfelelő mintáinkat szekvencia-analízisre küldtük. 44 szekvenált minta közül 3 tartalmazott valójában olyan mikroszatellit ismétlődést, amelyekre primereket tudtunk fejleszteni.

A primerek tervezését követően ellenőriztük azok alkalmazhatóságát. Egymástól távoli *Rhodiola rosea* populációk egyedein teszteltük működésüket, illetve megvizsgáltuk a PCR során felszaporított fragmentumok variabilitását. Az általunk fejlesztett RhpB14a primer-pár nem, míg a másik kettő polimorfnak mutatkozott, de további fejlesztéseket igényelnek. Az RhpB14b és az RhpB13 primer-pár által felszaporított DNS-szakasz esetében kijelenthető, hogy találtunk variábilis mikroszatellit lókuszokat a *Rhodiola rosea* genomjában.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki munkámban illetve dolgozatom elkészítésében segítségemre volt.

Elsősorban hálás köszönetemet fejezném ki Dr. Pedryc Andrzej Tanszékvezető Úrnak, aki mindvégig támogatott és lehetőséget biztosított kutatásaim elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom témavezető konzulensemnek, Dr. György Zsuzsannának, aki szakmai tudásával és tapasztalatával hozzájárult kísérleteim megvalósításához. Közreműködése nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá a Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynemesítési Tanszék dolgozóinak és PhD hallgatóinak, köztük Szikriszt Bernadettnek és Lendvay Bertalannak, akik segítőkészségükkel és tanácsaikkal megkönnyítették munkámat.

Lendvay Bertalannak külön köszönöm, hogy végig kísérte, tudásával és szakértelmével segítette munkám véghezvitelét, laboratóriumi gyakorlatom megszerzését, valamint a kutatás során alkalmazott módszerek elsajátítását.

10. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Agarwal, M., Neeta, M., Shrivastava, H. P. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27:617-631.
2. Behera, T. K., Gaikward, A. B., Singh, A. K. és Staub, J. E. 2008. Short Communication Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88:733-737.
3. Blomkvist, J., Taube, A., Larhammar, D. 2009. Perspective on Roseroot (*Rhodiola rosea*) Studies. *Planta medica*. 75(11):1187-1190.
4. Bloor, P. A., Barker, F. S., Watts, P. C., Noyes, H. A., Kemp, S. J. 2001. Microsatellite Libraries by Enrichment. Animal Genomics Laboratory, University of Liverpool. pp.1-14. <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/genomics.html>.
5. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. és Davis, R. W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*. 32(3):314-331.
6. Brown, R. P., Gerbarg, P. L. és Ramazanov, Z. 2002. *Rhodiola rosea* - A Phytomedicinal Overview. *HerbalGram*. 56:40-52.
7. Chiorghita, G., Hartan, M., Maftai, D. E., Nicuta, D. 2011. Some considerations regarding the In Vitro culture of *Rhodiola rosea*. *Romanian Biotechnological Letters*. 16(1):5902.
8. Cifarelli, R. A., Gallitelli, M., Cellini, F. 1995. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Research*. 23:3802-3803.
9. Darbinyan, V., Kteyan, A., Panossian, A., Gabrielian, E., Wikman, G. és Wagner, H. 2000. *Rhodiola rosea* in stress induced fatigue –A double blind cross-over study of a standardized extract SHR-5 with a repeated low-dose regimen on the mental performance of healthy physicians during night duty. *Phytomedicine*. 7(5):365–371.
10. Elameen, A., Klemsdal, S. S., Dragland, S., Fjellheim, S., Rognli, O. 2008. Genetic diversity in a germplasm collection of roseroot (*Rhodiola rosea*) in Norway studied by AFLP. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36(9):706–715.

11. Galambosi, B., György, Z. 2008. Rózsagyökér: A Téliapó rózsája. Kertészet és szőlészet. 57(1):6-9.
12. Gupta, P. K., Balyan, H. S., Sharma, P. C. és Ramesh, B. 1996. Microsatellites in plants: A new class of molecular markers. Current Science. 45(1):45-54.
13. Gupta, P.K., Roy, J. K. és Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphism: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in Current Science. 80(4):525-535.
14. György, Z., Derzsó, E., Pedryc, A. és Galambosi, B. 2012a. Genetic Diversity of Finnish *Rhodiola rosea* Populations Based on SSR and ISSR Analysis. Proceedings of the International Symposium on Medicinal, Aromatic & Nutraceutical Plants from Mountainous Areas. Acta Horticulturae. 955:197-199.
15. György, Z., Szabó, M., Bacharov, D., Pedryc, A. 2012b. Genetic Diversity Within and Among Populations of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) Based on Molecular Markers Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 40(2): 266-273.
16. Hajósné dr. Novák M. 1999. Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Budapest. Mezőgazda Kiadó. pp.42-49.
17. Heszky, L., Fésűs, L. és Hornok, L. 2005. Mezőgazdasági Biotechnológia. Budapest. Agroinform Kiadó. pp.199.
18. Hou, Y., Lou, A. 2011. Population Genetic Diversity and Structure of a Naturally Isolated Plant Species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). PLoS ONE 6(9):1-10.
19. Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., Van deWiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. és Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding. 3:381-390.
20. Kelly, G. S. 2001. *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. Alternative Medicine Review. 6(3):293-302.
21. Khanum, F., Singh, A. B., és Singh, B. 2005. *Rhodiola rosea*: A Versatile Adaptogen. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 4(3):55-62.
22. Kozyrenko, M. M., Gontcharova, S. B., Gontcharov, A. A. 2011. Analysis of the genetic structure of *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) using inter-simple sequence repeat (ISSR)

- polymorphisms. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 206(8):691-696.
23. László, É. 1999. Polimeráz láncreakció a géntechnológia nélkülözhetetlen eszköze. *Műszaki Szemle*. 2(7-8):11-15.
 24. Lawley, R. 2010. *Food Safety and Traceability Strategies*. Business Insight. pp.88
 25. Lei, Y., Gao, H., Tsering, T., Shi, S. és Zhong, Y. 2006. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats. *Genetics and Molecular Biology*. 29(2):339-344.
 26. Panossian, A., Wikman, G., Sarris, J. 2010. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*. 17(7):481-493.
 27. Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C., Fuerst, P. A. 1998. What Molecules Can Tell Us about Populations: Choosing and Using a Molecular Marker. *Ecology*. 79(2):361-382.
 28. Patov, S. A., Punegov, V. V. és Kuchin, A. V. 2006. Synthesis of the *Rhodiola rosea* glycoside rosavin. *Chemistry of Natural Compounds*. 42(4):397-399.
 29. Perfumi, M., és Mattioli, L. 2007. Adaptogenic and Central Nervous System Effects of Single Doses of 3% Rosavin and 1% Salidroside *Rhodiola rosea* L. Extract in Mice. *Phytotherapy Research*. 21(1):37-43.
 30. Pleschenk, A. 2012. A *Rhodiola rosea* előfordulási területei. Szóbeli közlés
 31. Priszter, Sz. 1998. *Növényneveink*. Budapest. Mezőgazda Kiadó. pp.479.
 32. Richardson, T., Cato, S., Ramser, J., Kahl, G., Weising, K. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*. 23:3798-3799.
 33. Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*. 18:233-234.
 34. Tasheva, K. és Kosturkova, G. 2012. The Role of Biotechnology for Conservation and Biologically Active Substances Production of *Rhodiola rosea*: Endangered Medicinal Species. *The Scientific World Journal*. 2012:1-13.
 35. Twyman, R. M. 2005. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques—An Overview. In: Fuchs, J. és Podda, M. (eds) *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. Marcel Dekker Inc. New York. (2):1202-1207.

36. Tóth, G., Gáspári, Z., Jerzy, J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research*. 10:967-981.
37. Velich, I. 2001. *Növénygenetika*. Budapest. Mezőgazda Kiadó. pp.422.
38. Vignal, A., Milan, D., Sancristobal, M. és Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*. 34:275-305.
39. Wuthisuthimethavee, S., Lumubol, P., Vanavichit, A. és Tragoonrung, S. 2003. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture*. 224(1-4):39-50.
40. Yan, T. F., Zu, Y. G., Yan, X. F. és Zhou, F. J. 2003. Genetic structure of endangered *Rhodiola sachalinensis*. *Conservation Genetics*. 4:213–218.
41. Yanbaev, Y. A., Bairamgulov, N. R., Redkina, N. N. és Mullagulov, R. Y. 2007. Differentiation among Populations of the *Rhodiola iremelica* Boriss. (Grassulaceae) in the Southern Urals. *Russian Journal of Genetics*. 43(11):1314–1318.
42. Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R. és Day, I. N. M. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*. 29(17):1-8.
43. Zane, L., Bargelloni, L. és Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11(1):1-16).
44. Zini, E., Clamer, M., Passerotti, S., Vender, C., Vendramin, G. G., Komjanc, M. 2009. Eight novel microsatellite DNA markers in *Rhodiola rosea* L. *Conservation Genetics*. 10(5):1397–1399.

11. MELLÉKLETEK

1. melléklet: A primerek szekvenciasorrendjei:

Primer neve:	Primer szekvenciája:
RhpB13 forward:	5'GTAAAACGACAACCAGTCTCAGCCCGCT...GCT 3'
RhpB13 reverse:	5'TGTCGGAGAGATGAGTGGTG3'
RhpB14a forward:	5'GTAAAACGACGGCCAGTCAAGCTAGGTC...TCA 3'
RhpB14a reverse:	5'TAACCAAGGGAGGAACACCA3
RhpB14b forward:	5'GTAAAACGACGGCCAGTCAAGTGTCCCA...TTG3'
RhpB14b reverse:	5'GTGACCGGTTGACCTAGCTT3'
M13*primer:	5'GTAAAACGACGGCCAGT3'
True1 bottom:	5'TAGGTACGCAGTCTAC3'
True1 top:	5'CTCGTAGACTGCGTACC3'

2. melléklet: A plazmid izolálás után a NanoDrop által végzett nukleotid koncentráció méréseinek eredményei

Minta:	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
pA1	107,97	2,159	1,101	1,96	2,12
pA2	126,15	2,523	1,328	1,9	2,2
pA3	77,4	1,548	0,856	1,81	1,8
pA6	130,2	2,604	1,362	1,91	2,24
pA9	103,45	2,069	1,126	1,84	1,9
pA10	129,17	2,583	1,378	1,87	2,03
pA14	46,69	0,934	0,525	1,78	2,02
pA15	99,28	1,986	1,063	1,87	2,17
pA17	130,35	2,607	1,374	1,9	1,98
pA21	152,11	3,042	1,608	1,89	2,18
pA22	88,63	1,773	0,946	1,87	2,16
pA24	88,7	1,774	0,933	1,9	2,18
pA27	152,05	3,041	1,606	1,89	2,19
pA29	152,05	3,041	1,612	1,89	2,18
pA30	31,01	0,62	0,312	1,99	2,04
pA32	130,57	2,611	1,354	1,93	2,23
pB1	129,64	2,593	1,388	1,87	2,08
pB4	118,4	2,368	1,243	1,9	2,21
pB10	35,46	0,709	0,381	1,86	1,79
pB12	131,96	2,639	1,383	1,91	2,23
pB13	64,22	1,284	0,676	1,9	2,08
pB14	241,13	4,823	2,528	1,91	2,26
pB15	107,02	2,14	1,138	1,88	2,25
pB18	157,79	3,156	1,683	1,88	2,17
pB19	106,33	2,127	1,141	1,86	2,21

3. melléklet: Példa a számítógépes program által történő primer tervezésre. Az RhpB13 forward és reverz primer látható.

Primer3 Output

[illegible]