

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

**Fahéjalkohol-dehidrogenázt kódoló gén expressziójának vizsgálata a
vegetáció folyamán *Rhodiola rosea* növényben**

Könye Rita
Mezőgazdasági biotechnológus MSc. II. évfolyam

Témavezető: Dr. György Zsuzsanna, egyetemi adjunktus

Budapest, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK	4
1. BEVEZETÉS	6
2. CÉLKITŰZÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. <i>A RHODIOLA ROSEA JELLEMZÉSE</i>	<i>8</i>
3.1.1. <i>Bevezetés</i>	<i>8</i>
3.1.2. <i>Rendszertani besorolása és rokonsága.....</i>	<i>9</i>
3.1.3. <i>Botanikai leírás</i>	<i>9</i>
3.1.4. <i>Származása és elterjedése</i>	<i>10</i>
3.1.5. <i>A rózsagyökér hatóanyagai</i>	<i>11</i>
3.1.6. <i>Farmakológiai hatása</i>	<i>13</i>
3.1.7. <i>A fahéj-alkohol glikozidok bioszintézis útja a rózsagyökérben.....</i>	<i>14</i>
3.1.8. <i>Fahéjalkohol-dehidrogenáz (CAD)</i>	<i>15</i>
3.2. <i>POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ (PCR).....</i>	<i>16</i>
3.3. <i>VALÓS IDEJŰ PCR.....</i>	<i>17</i>
3.3.1. <i>Valós idejű PCR során használatos referenciagének</i>	<i>18</i>
3.4. <i>A MUNKA KÖZVETLEN ELŐZMÉNYEI</i>	<i>19</i>
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	20
4.1. <i>NÖVÉNYANYAG</i>	<i>20</i>
4.2. <i>A MINTÁK HPLC VIZSGÁLATA.....</i>	<i>20</i>
4.3. <i>GÉNEXPRESSZIÓS VIZSGÁLATOK VALÓS IDEJŰ PCR-REL</i>	<i>21</i>
4.3.1. <i>RNS kivonás.....</i>	<i>21</i>
4.3.2. <i>DNáz kezelés</i>	<i>22</i>
4.3.3. <i>Reverz transzkripció – cDNS szintézis</i>	<i>22</i>
4.3.4. <i>Primerek.....</i>	<i>23</i>
4.3.5. <i>Valós idejű PCR.....</i>	<i>23</i>
5. EREDMÉNYEK.....	26
5.1. <i>A MINTÁK HPLC VIZSGÁLATA.....</i>	<i>26</i>

5.2. GÉNEXPRESSZIÓS VIZSGÁLATOK VALÓS IDEJŰ PCR-REL	27
5.2.1. RNS kivonás.....	27
5.2.2. DNáz kezelés	28
5.2.3. Reverz transzkripció – cDNS szintézis	29
5.2.4. Valós idejű PCR.....	30
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	33
7. ÖSSZEFOGLALÁS	35
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	37

FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

18S rRNS	18S riboszómális RNS
4CL	hidroxi-fahéj CoA ligáz
ACT	β -aktin
bp	bázispár
CAD	fahéjalkohol-dehidrogenáz
CCR	fahéj-CoA reduktáz
cDNS	„copy” DNS
CTAB	hexadeciltrimethylammónium bromid
DEPC	dietilpirokarbonát
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxinukleozid-trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GAPDH	glicerinaldehyd-3-P-dehidrogenáz
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IAA	izoamil-alkohol
MQ	Milli Q
mRNS	hírvivő RNs
OSD	Octadecyl silane
PAL	fenilalanin-ammónia-liáz
PCR	polimeráz láncreakció
PDA	Photodiode Array (fotodióga soros detektor)
PVP	polivinilpirrolidon
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
<i>R.</i>	<i>Rhodiola</i>
RNS	ribonukleinsav
RP	RNS-polimeráz
rpm	fordulat/perc
rRNS	riboszómális RNS
SSTE	nátrium dodecil szulfát-tris-HCl-EDTA
TBE	tris-bórsav-EDTA
TEF	transzlációs elongációs faktor
TOP	take off point, áttörési ciklusszám

Tris-HCl	tris-hidroximetil-aminometán és hidrogén-klorid
UBQ	ubikvitin
UV	ultraibolya

1. BEVEZETÉS

A *Rhodiola rosea* a *Crassulaceae* családba tartozó gyógynövény. Magyar neve: illatos rózsás varjúháj, de röviden csak rózsagyökér (Priszter, 2003). A tradicionális gyógyászat már évszázadok óta használja, azonban a modern orvoslásban csak az elmúlt néhány tíz évben terjedt el. Klinikai vizsgálatok bizonyítják a növény adaptogén hatását, illetve számos tanulmány készült hatóanyagairól. A gyógyhatásért felelős hatóanyagok a fahéj-alkohol glikozidok: a rozin, rovin és a rozarin, illetve egy fenolglykozid: a szalidrozin.

A rózsagyökérből készült termékek iránti megnövekedett igény miatt a növény vadon élő populációkat túlgyjötték, így a természetes állományok védelme érdekében több országban is védetté nyilvánították (Brown *et al.*, 2002).

A gyógyászatilag fontos hatóanyagok csak a gyökérben és a rizómában halmozódnak fel, azonban a felhalmozódott hatóanyagok mennyisége nagymértékben függ a növény korától. A fiatal, 2-3 éves növény sokkal kevesebbet tartalmaz, mint a betakarításra érett, 4-5 éves növény gyökere és rizómája (Galambosi, 2008). Ennek következtében a növény termesztése és a hatóanyagok felhalmozódása hosszadalmas folyamat.

Az utóbbi években áthelyeződött a figyelem a növény teljes extraktumáról az egyes hatóanyagokra, elsősorban a szalidrozinra és a fahéj-alkohol glikozidokra, melyeket összefoglaló néven rozavineknek is neveznek.

Kutatásunk fő célja a fahéj-alkohol glikozidok bioszintézisében szerepet játszó fahéj-alkohol-dehidrogenáz kódoló gén expressziós vizsgálata különböző vegetációs időpontokban.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja a fahéj-alkohol glikozidok bioszintézisében résztvevő CAD (fahéjalkohol-dehidrogenáz) gén expressziójának vizsgálata volt *Rhodiola rosea* növényben. Ezzel párhuzamosan a vegetációs periódus során a hatóanyag felhalmozódást is vizsgáltuk HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) segítségével. Munkánk fontos célja volt a fahéjalkohol-dehidrogenáz gén kifejeződése és a rozavinek felhalmozódása közötti összefüggés vizsgálata.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A *Rhodiola rosea* jellemzése

3.1.1. Bevezetés

A *Rhodiola rosea* (illatos rózsás varjúháj, aranygyökér, rózsagyökér vagy sarki gyökér) tradicionális gyógyászatban való alkalmazása évszázados hagyományokra tekint vissza Skandinávia, Oroszország, illetve Kelet-Európa egyes területein. A nyugati népek számára hosszú időn keresztül ismeretlen növény csak a XX. század második felétől található meg a tudományos irodalomban.

Az első feljegyzések a rózsagyökérről Dioszkoridésztől származnak, i.u. 77-ből. Ő még rodia riza névvel illette a növényt. Később – a XVIII. században – Linné is tanulmányozta és tőle származik a ma használatos tudományos elnevezése is. Emellett számos gyógyhatásáról is beszámolt. Ezek közé tartozik a vérzéscsillapító hatás és a fejfájás kezelése. 1755-ben az első svéd gyógyszerkönyv már említi a rózsagyökeret (Brown *et al.*, 2002).

Mongóliában évszázadokon keresztül csak kevesen tudták, hol található a rózsagyökér, illetve, hogyan nyerhető ki belőle a hatóanyag. Orvosaik ezt tuberkulózis és különböző rákos sebek gyógyítására használták (Khaidae *et al.*, 1978).

Más népek is tradicionális gyógyszerként alkalmazták többek közt állóképesség fokozására, magashegyi betegség ellen, kimerültség, depresszió, vérszegénység, impotencia, fertőzések illetve gyomor-, és bélrendszeri betegségek kezelésére, valamint magas életkor elérése érdekében. A grúz hegyvidéki falvakban szokás volt házasságkötés előtt rózsagyökeret ajándékozni a termékenység fokozása, illetve egészséges, életerős gyermek születése érdekében. Szibériaiak titkos ősi ösvényeken szállították a Kaukázus hegységbe, ahol többek közt grúz gyümölcsre és mézre cserélték az értékes gyógynövényt (Brown *et al.*, 2002).

A rózsagyökeret Skandináviában és Oroszországban évtizedeken keresztül intenzíven vizsgálták. Egy orosz kutató – Lazarev – a *Rhodiola rosea*-t adaptogén növényekhez sorolta. Adaptogén hatását az elérhető szakirodalom is alátámasztja (Kelly, 2001, Brown *et al.*, 2002, Panossian *et al.*, 2010). A Szovjetunióban az 1940-es évektől tanulmányozták és olimpikekon, illetve űrhajósokon tesztelték. A kutatások

rávilágítottak arra, hogy a növény fokozza a szervezet stresszre adott válaszát (Vastag, 2007).

Az 1960-as évektől kezdve végzett farmakológiai, fitokémiai és klinikai vizsgálatok száma meghaladja a 180-at, azonban az eredmények jelentős részét szláv, illetve svéd nyelven publikálták. Ez is közrejátszhatott, abban, hogy bár számos gyógyhatása ma már alátámasztott, hazánkban mégis a kevésbé ismert gyógynövények közé sorolhatjuk (Brown *et al.*, 2002).

3.1.2. Rendszertani besorolása és rokonsága

A *Rhodiola rosea* rendszertani besorolását az elmúlt évszázad során többször is változtatták, a második világháborút követően a *Sedum* nemzetség *Rhodiola* alnemzetségéhez tartozott (Brown *et al.*, 2002), ma a *Crassulaceae* család *Rhodiola* nemzetségéhez tartozik (Ohba, 1989). 1963-ban Hegi azonosított több mint 50 *Rhodiola* fajt és sorolta őket külön nemzetségbe (Brown *et al.*, 2002). Mára már több mint 200 különböző *Rhodiola* fajt ismerünk és ebből több mint 20-at Ázsiában alkalmaznak is a tradicionális gyógyászatban. Ide tartozik a *R. alternata*, *R. brevipetiolata*, *R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*, *R. sachalinensis* és a *R. sacra* (Khanum *et al.*, 2005). Nem figyelhető meg éles morfológiai különbség a különböző fajok között, így még ma is sokszor vitatott, hogy egy-egy egyed a *Rhodiola* nemzetség melyik fájához tartozik. Ennek ellenére nem keverendők össze a *Rhodiola rosea*-val, mivel annak hatóanyag összetétele eltér a többi fajétól (Brown *et al.*, 2002).

3.1.3. Botanikai leírás

A rózsagyökér (1. ábra) 30 cm magas lágyszárú, évelő növény (Asdal *et al.*, 2006), de bizonyos élőhelyeken elérheti a 70 cm-es magasságot is (Brown *et al.*, 2002). A növény morfológiailag nagyfokú változatosságot mutat, sokszor egy populáción belül is. Virágai általában egyivarúak, azonban előfordulnak kétivarú egyedek is. Színüket tekintve a legjellemzőbb a sárga virágszín, azonban a színskála a zöldessárgától a pirosig terjedhet. Szára minden esetben elágazásmentes, amelyet sűrűn borítanak az élénkzöld levelek. A levelek lehetnek hosszúkasak, tojásdadok, illetve elliptikusak, azonban a levélalap minden esetben széles. A levélszél lehet fűrészes, illetve sima (Asdal *et al.*, 2006).



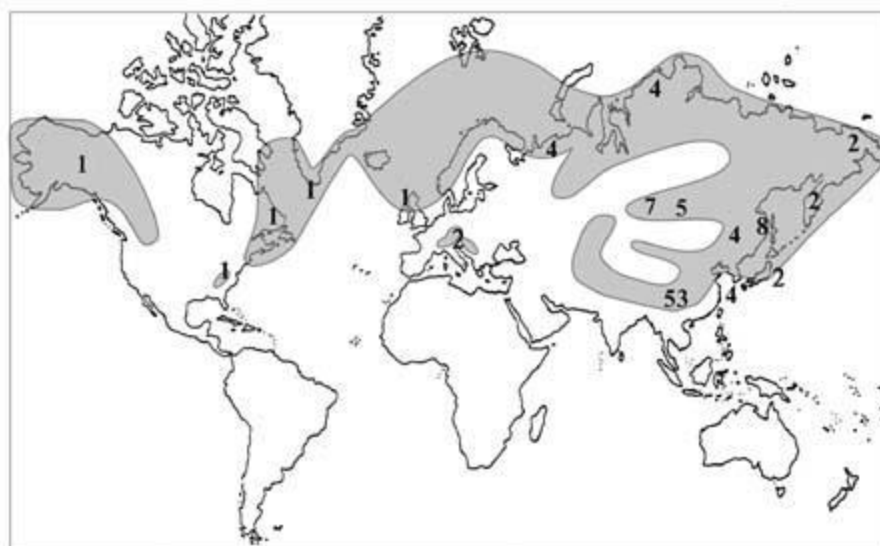
1. ábra. *Rhodiola rosea* (foto: Iman Mirmazloun).

Másodlagos anyagcseretermékei révén a mostohább körülményeket is jól tűri. A téli -30 , -40°C -os hidegeket és a nyári 30 - 35°C -os melegeket is bírja. Vastag rizómája és pozsgás levelei miatt az átmeneti szárazságot is elviseli (Galambosi, 2008). Sziklás területeken jól alkalmazkodik a sekély talajréteghez, azonban ilyen körülmények között fokozottabban igényli a viszonylag egyenletes csapadék-utánpótlást. (Asdal *et al.*, 2006).

A *Rhodiola rosea* diploid növény, 22 kromoszómával rendelkezik ($2n=22$) (Lid & Lid, 2005).

3.1.4. Származása és elterjedése

Feltehetően Délnyugat-Kína hegyvidéki területeiről, illetve a Himalájából származik. A *Rhodiola rosea* cirkumpoláris elterjedésű faj, azonban az északi félgömb területén, a délebbre fekvő magashegységekben is fellelhető. Ázsiai elterjedését tekintve az Altáj hegységtől Mongólián át Szibéria egyes területéig találhatók meg populációi, míg Európában Izlandtól Skandinávián át, illetve a magashegységekben: a Pireneusokban, az Alpokban, a Kárpátokban és a Balkán-hegység magas fekvésű területein honos. Emellett számos *Rhodiola* faj található Észak-Amerika területén többek között Alaszkában, Kanadában és az Egyesült Államok hegységeiben (2. ábra) (Furmanowa *et al.*, 1995, Brown *et al.*, 2002).



2. ábra A *Rhodiola rosea* elterjedése (Ohba *et al.*, 1989)

Sziklarepedésekben és tenger közelében is megél, hiszen jól tolerálja a rossz talajszerkezetet, a gyenge tápanyag-ellátottságot illetve a sós vizet (Galambosi, 2008).

3.1.5. A rózsagyökér hatóanyagai

A gyógyászatilag hasznos másodlagos anyagcseretermékeket a gyökér és a rizóma halmozza fel.

Orosz kutatók ezekből izoláltak először flavonoid típusú vegyületeket, rodionint, rodiozint és rodilint. A föld feletti részekben is találtak flavonoid vegyületeket, azonban ezek nem rendelkeznek gyógyászati jelentőséggel (Kurkin *et. al.*, 1984). Későbbi kutatások eredményei bizonyították, hogy a *Rhodiola rosea* gyökerének kémiai összetétele valóban különbözik a többi *Rhodiola* fajétól (Kurkin és Zapesohnaya, 1986a).

Rohloff (2002) szerint a szárított rizóma 0,05% illóolajat tartalmaz, melyből 75 összetevőt azonosított. A két legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponens a decanol és a geraniol, amelyek a gyökér rózsasillatát adják.

A különböző fitokémiai vizsgálatok hat különböző kémiai csoport jelenlétét mutatták ki a növény gyökerében (Brown *et al.*, 2002). Ezek az aktív anyagok a következő kémiai osztályokba sorolhatók: fenilpropanoidok, feniletanol-származékok, monoterpének, flavonoidok, kumarinok és szerves savak. Ezek közül a kémiai összetevők közül fenilpropanoidokhoz tartozó fahéj-alkohol glikozidok – rozin, rozarin és a rozavin – egyedülállóak (Dascaliuc *et al.*, 2008) és a *Rhodiola* nemzetségben belül csak a *R. rosea*-ban találhatók meg (Kurkin *et. al.*, 1985). A fahéj-alkohol glikozidok és egyéb

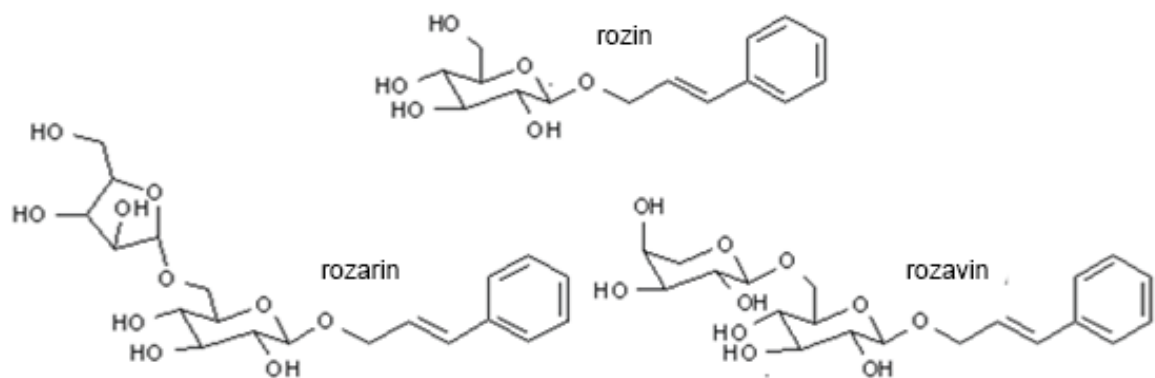
fenilpropanoidok magas koncentrációjú jelenléte csak a rózsagyökérre jellemző (Kurkin *et al.*, 1986, Kurkin és Zapesochnaya, 1986a).

A feniletanol-származékokhoz sorolt szalidroزيد (Brown *et al.*, 2002) először Troshchenko és Kutikova (1967) izolálta a növény gyökeréből, azonban ők tirozolként és ennek glikozidjaként, rodolizidként azonosították. Később a rodolizodit szalidroزيدként írták le (Thieme, 1969). Az 1970-es években a szalidroزيدot tartották a gyógyhatásért felelős összetevőnek (Kurkin *et al.*, 1986, Saratikov *et al.*, 1987, Saratikov, 1974), amit először *Salix triandrá*ból izoláltak 1926-ban. A szalidroزيد elnevezés a *Salix* nemzetség nevéből származik (Brigel és Beguin, 1926). Később *Vaccinium vitis-idaea*ból (Thieme, 1969), *Rhododendron ponticum* x *catawbiense*ből (Thieme *et al.*, 1969), *Betula platyphylla*ból (Shen *et al.*, 1999), *Phillyrea latifolia*ból (Lanza *et al.*, 2001), *Olea europa*éből (Ryan és Robards, 1998) és *Syringa vulgaris*ből (Kurkin *et al.*, 1990) is izoláltak szalidroزيدot. Bár a *Rhodiola* nemzetség fitokémiai összetétele fajfüggő (Kurkin *et al.*, 1986, Kurkin és Zapesochnaya, 1986a), a szalidroزيد a nemzetség összes fájában fellelhető (Ramazanov *et al.*, 1999), azonban mennyisége alacsonyabb, mint a fent említett növényekben (Brown *et al.*, 2002).

Kurkin és munkatársai (1984) különböző flavonoidokat izoláltak a rózsagyökérből (rodionint, rodiozint és rodolint). A későbbi évek folyamán (1986) további terpenoid típusú vegyületeket fedezték fel: roziridolt, roziridint, daukoszterolt és β -szitoszterolt.

Oshugi és munkatársai (1999), illetve Lee és munkatársai (2000) további hatóanyagokat izoláltak és azonosítottak a *R. rosea* és a rokon fajok gyökeréből. Ezek a hatóanyagok a különböző szerves savak, mint például a galluszsav, a kávéssav és a klorogénsav, illetve a flavonoidokhoz tartozó katechinek és proantocianidek. Az eddig felsorolt hatóanyagokon kívül még kumarinokat és laktonokat vontak ki a rózsagyökérből (Furmanowa *et al.*, 1995). A legutóbb leírt vegyület a lotausztralin (Agkul *et al.*, 2004).

Az eddigi kísérletek azt bizonyítják, hogy a fenilpropanoidok – rozin, rozavin, rozarin (3. ábra) – és a feniletanol-származékok – a szalidroزيد, tirozol – a gyógyhatásért leginkább felelős összetevők (Panossian és Wagner, 2005, Furmanowa *et al.*, 1995, Kurkin és Zapesochnaya, 1986a). A természetben a rozavinek és a szalidroزيد 3:1 arányban halmozódnak fel a rózsagyökér gyökerében. Ennek megfelelően szabványosították a kivonat hatóanyagtartalmát is, melynek minimum 3% rozavint és 0,8-1% szalidroزيدot kell tartalmaznia (Brown *et al.*, 2002).



3. ábra fahéj-alkohol glikozidok kémiai szerkezete.

3.1.6. Farmakológiai hatása

Orosz kutatók megfigyelései alapján a különböző stresszfaktorok ellen a szervezet ellenállóképessége növekszik a *Rhodiola rosea* kivonat fogyasztása következtében. Ezért a rózsagyökér az adaptogén növények közé sorolták csakúgy, mint az *Eleutherococcus senticosus*-t (szibériai ginzeng) és a *Panax ginseng*-et (koreai ginzeng). Az adaptogén kifejezést 1947-ben alkotta meg egy orosz kutató, Lazarev. Az ő nevéhez kötődik a definíció megalkotása is, mely szerint adaptogén az a növény, mely hatóanyagai fokozzák a szervezet nem-specifikus ellenálló képességét a különböző ártalmas fizikai, kémiai vagy biológiai stresszfaktorokkal szemben (Kelly, 2001). A későbbiekben pontosították az adaptogén növényekkel szemben felállított kritériumokat, melyek a következők:

- A növénynek teljes mértékben ártalmatlannak és nem-toxikusnak kell lennie a szervezetre nézve, ugyanakkor nem akadályozhatja a normális fiziológiai működését.
- Nem-specifikus hatással kell rendelkeznie és fenn kell tartania szervezet normális működését a szervezetet érő káros hatásokkal szemben.
- Normalizálnia kell a testi funkciókat a kóros állapotoktól függetlenül (Brekhman és Dardymov, 1969 idézte Brown *et al.*, 2002).

Az adaptogén hatáson kívül számos egyéb sajátosságát írták le a rózsagyökérnek. A hagyományos gyógyászatban többek közt erősítőszernak, fáradtság ellen alkalmazták (Furmanowa *et al.*, 1995). Molokovsky és munkatársai (1989) kísérletei kimutatták, hogy a *R. rosea* extraktum csökkenti a vér glükózsintjét, így hatásos gyógymód lehet a cukorbetegségre.

A rózsagyökér hivatalos kivonata a kísérletek során tumorgátló és antimetastatikus hatást mutatott több különböző ráktípus esetén (Dementieva és Yaremenko, 1987,

Bocharova *et al.*, 1995). Későbbi kísérletek kimutatták, hogy a kivonat szelektíven gátolja a sejtburjánzást (Udintsev és Schakhov, 1991).

A rózsagyökérben felhalmozódó vegyületek megakadályozzák a koleszterol és a trigliceridek felhalmozódását (Hushbaktova *et al.*, 1989). A *Rhodiola rosea* és a *Panax ginseng* kivonatának immunstimuláns hatását Galaktyonov és munkatársai (1991) írták le. Antioxidánsként segíti az idegrendszer szabadgyökök elleni védelmét, a stressz miatti, illetve az idő múlásával fellépő memóriazavar enyhítését. Az adrenalin, dopamin és szerotonin szint szabályozásával növeli a kognitív funkciókat, illetve serkenti a memóriát (Furmanowa *et al.*, 1998, Durany *et al.*, 1999, Joseph *et al.*, 1999). Az esetek többségében csökkenti a fáradtságot, az ingerlékenységet, dekoncentrálttságot, fejfájást, gyengeséget és egyéb vegetatív szimptomákat (Krasik *et al.*, 1970 idézte Brown *et al.*, 2002, Darbinyan *et al.*, 2000).

Számos egyéb gyógyhatását bizonyították, mint például:

- fokozza a fizikai erőnlétet és javítja az általános közérzetet (Spasov *et al.*, 2000 a,b)
- megelőzi a stressz-indukált szívproblémákat (Maslova *et al.*, 1994)
- stresszoldó (Brown *et al.*, 2002, Kelly, 2001)
- antidepresszáns (Brichenko *et al.*, 1986 idézte Brown *et al.*, 2002, Brown *et al.*, 2002, Kelly, 2001).

3.1.7. A fahéj-alkohol glikozidok bioszintézis útja a rózsagyökérben

A fahéj-alkohol glikozidok a fenilpropanoid anyagcsere úton a sikimin-sav ciklusból származtathatók a fenilalaninon keresztül. Ezt a folyamatot az 4. ábra mutatja.

Első lépésként a fenilalanin fahéjsavvá alakul a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) enzim segítségével. Ezen a ponton különül el a bioszintézis út a kumarinokhoz, flavonoidokhoz, ligninekhez és lignánokhoz vezető úttól annak ellenére, hogy azonos típusú enzimek vesznek részt a fahéj-alkohol glikozidok szintézisében is. A fahéjsav fahéj-CoA észterré alakul hidroxifahéj CoA ligáz (4CL) segítségével, majd ezt az észtert fahéj-CoA redukáz (CCR) fahéj-aldehiddé redukálja. Következő lépésként a fahéj-aldehid fahéjalkohol-dehidrogenáz (CAD) segítségével tovább redukálódik fahéjalkohollá, majd egy vagy több cukormolekula kapcsolódásával létrejönnek a fahéj-alkohol glikozidok. Egy cukormolekula kapcsolódásával rozin jön létre, majd ehhez attól függően, hogy arabinóz vagy arabinofuranóz kapcsolódik, kialakulhat rozavin vagy rozarin. (György, 2006).

2009). Sibout és munkatársai (2003) cDNS vizsgálatokkal kimutatták, hogy a CAD enzimnek több izozimje létezik, tehát nem egy enzim képes kötni a különböző fahéj-aldehydeket. Az Arabidopsis genomból 9 ilyen CAD-homológot tudtak azonosítani, azonban ezek közül csak három vesz részt a monolignol bioszintézisben. A többi izoforma funkciója még nem meghatározott (Ma, 2010), azonban az izoformák változatossága függ továbbá a fejlődési szinttől és a szövettípustól (Mirmazloun és György, 2012).

Az enzim mindezek mellett pH-függő, illetve hőmérséklet érzékenységet mutat (Ma, 2010).

3.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A molekuláris biológia fejlődésével lehetőségünk nyílt a sejtekben végbemenő DNS-sokszorosítást *in vitro* körülmények között leutánozni. A PCR (Polimerase Chain Reaction = polimeráz láncreakció) technika a különböző nukleinsavak meghatározott szakaszainak sokszorosítására alkalmas módszer. Az eljárást 1986-ban Kary Mullis fejlesztette ki. Találmányát 1993-ban Nobel-díjjal jutalmazták.

A módszer lényege, hogy egy tetszőleges DNS-mintáról (templát) DNS-polimeráz és az iniciációhoz szükséges két egyszálú oligonukleotid molekula (primer) segítségével, rövid idő alatt korlátlan számú másolatot készíthetünk. A primerpár közrefogja az amplifikálni kívánt szakaszt, majd a polimeráz enzim hatására megindul a replikáció.

A folyamat három fő lépésre osztható: denaturáció, primer tapadás és elongáció. A denaturáció során a DNS két szála a magas hőmérséklet hatására (90-95 °C) elválík egymástól, majd a primerek a DNS-szálak megfelelő részéhez hibridizálnak a számukra optimális hőmérsékleten (45-65°C). Az utolsó lépésben a hőmérséklet emelkedik 72°C-ra, melyen a polimeráz enzim a primerektől kiindulva megkezdí az új szálak szintetizálását (György, 2009).

A fent említett három fő lépés egy folyamat során 30-40 ismétlésben zajlík le. Ez alatt a polimeráz enzim az újonnan szintetizált szálakat is templátként használja, így a kópiák száma exponenciálisan nő. Megfelelő számú ciklus után a kópiák száma elérí azt a mennyiséget, mely gélelektroforézis során már szabad szemmel láthatóvá válík. Egy pikogrammnyi DNS-ből 30-40 ciklust követően, néhány óra leforgása alatt mikrogrammnyi mennyiséget lehet előállítani (Hajósné, 1999).

A polimeráz láncreakció alkotóelemei:

- Templát DNS: a vizsgálandó DNS minta, mely tartalmazza a felszaporítani kívánt szakaszt.
- DNS polimeráz: hőstabil enzim, mely végzi a DNS-szál szintézisét.
- Oligonukleotid primerek: 2 darab egyszálú molekula, melyektől elindulva a polimeráz enzim a meglévő templát mentén új DNS szálakat szintetizál 5' → 3' irányban.
- dNTP mix: szabad nukleotidok, melyeket a polimeráz enzim az általa szintetizált DNS-láncokba épít be.
- Puffer, MgCl₂: biztosítják az enzim működéséhez szükséges körülményeket (György, 2009).

A módszer ma már széles körben alkalmazott többek között gének izolálására, nukleinsav-analízisre, mutációk és transzgénikus élőlények azonosítására, bakteriális és vírusos fertőzések kimutatására, illetve a génsebészet egyik alapvető módszere (Hajós, 1999).

3.3. Valós idejű PCR

A valós idejű vagy kvantitatív polimeráz láncreakció feltalálásának eredeti célja a hagyományos PCR technika kinetikájának megfigyelése volt. Csak alkalmazása során figyeltek fel a módszerben rejlő egyéb lehetőségekre, például génexpressziós vizsgálatokra (Higuchi *et al.*, 1992). Ennek következtében a valós idejű PCR az utóbbi években a DNS és RNS mennyiségi meghatározásnak és vizsgálatnak vezető eszközévé vált. A módszer a hagyományos PCR technikán alapul, azonban a valós idejű PCR során a DNS-szálak szintézise ciklusról ciklusra, valós időben figyelhető meg. A PCR termékhez adott fluoreszcens festékekkel tudjuk nyomon követni a folyamatot. A megnövekedett fluoreszcens jel egyenesen arányos az amplifikált PCR termékek számával, tehát az adatok valójában nem a DNS mennyiséget mutatják, hanem a fluoreszcens jelből számított értékek. Ha a szekvenciaregionok bőségesen voltak jelen a mintában, akkor az amplifikációs görbe korábbi ciklusban kezd emelkedni, míg ha kevés a DNS minta, később.

A reakcióelegyhez adott fluoreszcens festéket egy fényforrás gerjeszti, majd az így keletkezett fluoreszcens fényt és ennek intenzitását egy detektor érzékeli. Ez a folyamat minden ciklusban végbemegy, majd a PCR készülékkel összekötött számítógép diagramon

ábrázolja a különböző ciklusokban kapott adatokat. A reakciót egy exponenciális görbével írhatjuk le (Anonymus, 2012).

3.3.1. Valós idejű PCR során használatos referenciagének

A valós idejű PCR technika folyamán a génexpresszió pontos mennyiségi meghatározásához számos kísérleti változót kell figyelembe venni, mint például a kiinduló anyagok mennyiségét és minőségét, az inhibitorok (gátlók) jelenlétét a különböző mintákban, a primer tervezést, és az RNS kivonás és a reverz transzkripció hatásfokát. A kapott adatok megfelelő kiértékeléséhez döntő fontosságú a megfelelő kontroll stratégia kiválasztása (Ginzinger, 2002, Huggett *et al.*, 2005). A leggyakrabban alkalmazott kontroll módszer a valós idejű PCR során a riboszómális RNS-ek (rRNS) és a hírvivő RNS-ek (mRNS) referenciagénekként való használata. Ezekkel szűrik a kísérletek során esetlegesen megjelenő hibákat a génexpresszió meghatározásnál (Tong *et al.*, 2009). Az ilyen referencia géneket háztartási géneknek is nevezik (Chervoneva *et al.*, 2010).

Az ideális referenciagének állandó szinten kell kifejeződnie különféle környezeti feltételek és bármilyen kísérleti körülmények között, mint például a különböző fejlődési állapotok és szövet típusok (Tong *et al.*, 2009). Emellett megfelelő mennyiségben rendelkezésre kell állnia és szabályozása nem eshet egybe a célgén szabályozásával és minimális természetes változékonysággal szabad csak rendelkeznie (Chervoneva *et al.*, 2010).

A különböző vizsgálatok azt mutatják, hogy a legáltalánosabban alkalmazott referenciagéneket, mint például a 18S riboszómális RNS-t (18S rRNS), a β -aktint (ACT) és a gliceraldehyd-3-foszfátot (GAPDH) körültekintően kell alkalmazni kontrollként, ugyanis ezek a gének különböző kísérleti körülmények között eltérő tulajdonságokat mutattak (Dheda *et al.*, 2004, Suzuki *et al.*, 2000, Bas *et al.*, 2004, Yperman *et al.*, 2004, Barber *et al.*, 2005, Nicot *et al.*, 2005).

A fent említett referenciagének változékonyságát az magyarázza, hogy ezek a gének valószínűleg nemcsak az alapvető sejtfunkciókban vesznek részt, hanem az egyéb, sejtekben lejátszódó folyamatokban is (Ishitani *et al.*, 1996, Singh *et al.*, 1993). A megfelelő kontroll gén kiválasztása függ a területtől és az elvégzett kísérletek jellegétől (Thellin *et al.*, 1999).

Dheda és munkatársai (2004) szerint, ha a kiválasztott háztartási gén expressziója véletlenszerűen ingadozik, a célgének közötti apró különbségek el fognak veszni, illetve ha

a kísérleti körülmények miatt változik, akkor az újabb normalizációnál fog hibás eredményt okozni. Éppen ezért egy stabil referenciagén kiválasztása kritikus pontja a valós idejű PCR-rel végzett mennyiségi génexpressziós vizsgálatoknak (Dheda *et al.*, 2004, Tong *et al.*, 2009).

3.4. A munka közvetlen előzményei

Korábbi, szakdolgozatomhoz végzett kísérletek során a fenilpropanoid bioszintézis út első enzimét, a fenilalanin-ammónia-liázt (PAL) vizsgáltuk. Az enzimet kódoló gén szekvenciájából egy 532 bp-os szekvenciárésztet határoztunk meg, mely 71,6-85,1%-ban homológ a primer tervezéséhez használt fajokéval.

Emellett hat különböző referenciagént vizsgáltunk (18S rRNS: 18S riboszómális RNS, ACT: β -aktin, GAPDH: glicerinaldehid-3-P-dehidrogenáz, RP-II: RNS-polimeráz II, TEF-II: traszlációs elongációs faktor II és UBQ10: ubikvitin 10), melyek közül expressziós mintázatuk alapján kiválasztottuk a PAL gén vizsgálatához leginkább megfelelő gént. A vizsgálatok során a hat háztartási gén közül a 18S rRNS kifejeződése bizonyult a legstabilabbnak.

Habár korábbi munkánk során a 18S rRNS-t használtuk referenciagénként (Könye, 2012), annak expressziója a valós idejű PCR során a jelenlegi célgénéhez képest sokkal korábban jelentkezett. Ennek értelmében a fahéjalkohol-dehidrogenáz expressziós vizsgálataink során, a célgén kifejeződéséhez közelebb álló, szintén stabil expressziót mutató β -aktint használjuk.

A tanszéken folyó kutatások során a CAD (fahéjalkohol-dehidrogenáz) gén egy 1405 bp hosszú darabját izolálták, mely szintén nagyfokú hasonlóságot mutat más fajokból izolált CAD szekvenciákhoz. A fahéjalkohol-dehidrogenáz gén expressziós vizsgálatához alkalmazott primerpárt az izolált szekvencia alapján terveztük (Mirmazloum *et al.*, 2013)

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

2013. júniusában az ausztriai Hochkar hegyről gyűjtöttünk rizóma dugványokat. Ezeket elültettük tőzeg, virágföld, perlit 1:1:1 arányú keverékébe, majd fitotronba helyeztük. A fitotron beállítása 16/8 órás fény/sötét ciklus volt és 17°C nappal, 12°C éjszaka, 70%-os páratartalom mellett.

3 hetente mintát vettünk a növényekről: levél, gyökér és rizóma mintát. Ezeket gyors tisztítás után előbb száraz jégre, majd -70°C-ra tettük a későbbi vizsgálatokig.

A HPLC vizsgálatok során 7 növény, két szövetének (gyökér és rizóma), öt különböző időpontban gyűjtött mintájának (Jún. 7., Jún. 27., Júl. 18., Aug. 9., Aug. 28.) hatóanyagtartalmát vizsgáltuk, míg a génexpressziós kísérletekhez csak 1 növény szövetét (levél, gyökér és rizóma) alkalmaztuk. A génexpressziós vizsgálatokhoz gyűjtött növényi szövetek a HPLC vizsgálattal megegyező időpontokból származnak.

4.2. A minták HPLC vizsgálata

Az öt különböző időpontban szedett *Rhodiola rosea* minta glikozid (rozin, rozavin, rozarin és szalidrozyd) tartalmát HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) technikával vizsgáltuk.

A mintákat egy éjszakán keresztül 50°C-on szárítottuk, majd további előkészítésük a következő protokoll alapján zajlott: 0,05 g szövetet 1,5 ml metanolban 30 percen keresztül ultrahangos szonikátorban extraháltuk. Ezt követően 10 percig centrifugáltuk 12000 rpm fordulatszámon, majd a felülúszót szűrtük és a szűrletből 100 µl-t HPLC csőbe pipettáztunk és 400 µl metanollal hígítottuk.

A HPLC kivitelezése Martonvásáron, a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági Intézetében Waters 1525 készüléken bináris pumpával, 717 autosampler fiolákban, 2998 PDA detektorral történt. Állófázis Thermo Hypersil ODS 250x4,6 5 µm-es oszlop, míg a mozgófázis MQ víz és acetonitril volt, melynek térfogatárama 1,0 ml/min. A folyamat 40°C-on zajlott, a detektálás 205 és 254 nm-en UV detektorral történt. A retenciós idő és a spektrális adatok összevetésére a *Rhodiola rosea* Standard Kit-et (ChromaDex) alkalmaztuk. A mennyiségi meghatározást a csúcsok területéből végeztük. A meghatározott komponensek mennyiségét mg-ban határoztuk meg 100 g száraz tömegre vonatkoztatva.

4.3. Génexpressziós vizsgálatok valós idejű PCR-rel

4.3.1. RNS kivonás

A fahéjalkohol-dehidrogenáz enzim expressziós vizsgálatához öt időpontban (Jún. 7., Jún. 27., Júl. 18., Aug. 9., Aug. 28.) szedett, három különböző növényi szövetből (levél, gyökér, rizóma) izoláltunk RNS-t a következő protokoll alapján:

1. A folyékony nitrogénnel eldörzsölt növényanyagot mintánként legalább 4 darab 2 ml-es Eppendorf csőbe osztjuk szét.
2. Minden egyes csőbe 700 µl 65°C-ra előmelegített extrakciós puffert (2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), 2% PVP (polyvinylpyrrolidone, Mol. WT 360,000), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2.0 M NaCl, 0,5 g/L spermidine) adunk. Ezután 10 percig 65°C-on inkubáltuk a mintákat, miközben néhányszor vortexeltük a megfelelő homogenizáció elérése érdekében.
3. Ezután rámérünk 700 µl kloroform:izoamil-alkohol (IAA) keveréket (24:1), majd szobahőmérsékleten centrifugáltuk 3 percig 13000 rpm fordulatszámon.
4. A kloroform:izoamil-alkoholos tisztító lépést megismételtük.
5. A felülúszót tiszta Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd ¼ mennyiségű 10 M-os lítium kloridot mértünk rá és óvatosan összekevertük és egy éjszakára 4°C-ra helyeztük.
6. A mintákat 4°C-on 20 percig centrifugáltuk 15000 rpm fordulatszámon, majd a felülúszót leöntöttük.
7. A csapadékot 500 µl 70% jéghideg etanollal mostuk (10 perc, 13000 rpm). Ezt a lépést megismételtük.
8. A tiszta RNS csapadékot 100 µl SSE lúgban oldottuk vissza. Az azonos mintákat egy Eppendorf csőbe összesítettük.
9. A csövekben lévő mintákra azonos mennyiségű fenol:kloroform:IAA keveréket (25:24:1) mértünk majd 13000 rpm fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk és a felülúszót tiszta csőbe vittük át.
10. Kétszeres mennyiségű jéghideg abszolút etanolt adtunk a felülúszóhoz, majd fél órára -70°C-ra helyeztük.

11. Végül 4°C-on 20 percig centrifugáltuk 15000 rpm fordulatszámon, majd a csapadékot jéghideg 300 µl 70%-os etanollal mostuk. A mosott mintákat vákuum centrifugában szárítottuk 5 percig, majd az RNS-t 30 µl DEPC-vízben oldottuk vissza.

Az RNS minták mennyiségi meghatározását és minőségi ellenőrzését Nanodroppal illetve 1%-os TBE agaróz gélen való gélelektroforézissel végeztük.

4.3.2. DNáz kezelés

A DNáz kezelést Thermo Scientific DNase I RNase-free (Fermentas, Biocenter, Szeged) segítségével végeztük. Az RNS minták DNS mentesítéséhez a korábbi NanoDropos mérés alapján 1,5 µg RNS-t, 3 µl 10x reakciópuffert (10x reaction buffer with MgCl₂), 3 µl DNase I-t mértünk össze PCR csövekbe majd ezt a reakcióelegyet 30 µl végtérfogatra egészítettük ki DEPC vízzel. A reakcióelegyet 37°C-on 30 percig inkubáltuk, majd 3 µl 50 mM EDTA hozzáadásával további 10 percig inkubáltuk 65°C-on, melynek következtében a reakció leállt.

A kezelést követően a minták RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzését Nanodroppal és gélelektroforézissel végeztük el.

4.3.3. Reverz transzkripció – cDNS szintézis

Reverz transzkripció során az izolált, DNS-mentes RNS-ből egyszálú cDNS-t szintetizáltunk RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase-zal (Fermentas, Biocenter, Szeged). A cDNS szintézist minden esetben random hexamer primerrel végeztük.

A reakcióelegyet PCR csövekbe mértük össze a következő protokoll alapján: 12 µl végtérfogatba 0,5 µg RNS-t, 1 µl primert és ezt kiegészítettük nukleáz-mentes vízzel 12 µl-re. Ehhez a mixhez adtuk hozzá az alábbi táblázatban felsorolt összetevőket (1. táblázat).

1. táblázat. A cDNS szintézis reakcióelegyének további összetevői.

5x reakciós puffer	4 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl
Σ	20 µl

A reakcióelegyet összekevertük, majd inkubáltuk először 5 percig 25°C-on, majd 60 percig 42°C-on, végül pedig 5 percig 70°C-on.

A minták mennyiségi és minőségi ellenőrzését 1%-os TBE agaróz gélelektroforézissel végeztük el. Az elektroforézist 60 V-on 5 percig végeztük, hogy a cDNS éppen csak kilépett a zsebből. A Quantity One programban a Density at Box funkcióval ellenőriztük a sávok jelerősségét, és az azonos cDNS koncentráció elérése érdekében, szükség esetén hígítottuk a mintákat.

A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

4.3.4. Primerek

A valós idejű PCR kísérletek során a fahéjalkohol-dehidrogenáz (CAD) enzim kifejeződését vizsgáltuk különböző *Rhodiola rosea* szövetekből készített cDNS mintákon. Referenciagénként a β-aktin (ACT) háztartási gént használtuk. Az alkalmazott primerek mindkét esetben a tanszéki tervezésűek voltak.

A primerek bázissorrendjét a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. A génexpressziós vizsgálatok során alkalmazott primerek nukleotidsorrendje.

Primer neve	Primer szekvenciája
CAD F	CTCAGACGCAGCTAGGATG
CAD R	TTCAAAAGCGAAATGTACGACTC
ACT-F	GTGCCTGCCATGTATGTTGCCA
ACT-R	CAGTGGTGGTGAACATGTACCCYC

4.3.5. Valós idejű PCR

A valós idejű PCR-t Corbett Research gyártmányú Rotor Gene 6000 (6 csatornás QIAGEN) készülékben végeztük, mely a kvantitatív analízis mellett jó felbontású olvadáspont-analízis („Melting Analysis”) funkcióval is rendelkezik.

Viszsgálataink során a SensiMix™ SYBR No-ROX Kit-et (Bioline, Csertex, Budapest) alkalmaztuk.

Munkánk során az előző pontban kapott cDNS-eket 4x-es hígításban használtuk a valós idejű PCR vizsgálathoz, illetve egy minta esetében 16x-os és 64x-es hígítást is alkalmaztunk. A qPCR-hez használt reakcióelegy összetételét a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. A qPCR-reakcióelegy összetétele.

2x SensiMix™ SYBR No-ROX Mastermix	6,2 µl
forward primer (10 mM)	0,5 µl
reverse primer (10 mM)	0,5 µl
cDNS-templát	2,2 µl
Steril MilliQ-víz	2,4 µl

A reakciók során alkalmazott primer-kombinációkat a 4.3.4. pont tartalmazza. A felhasznált cDNS-ek az alábbi növényi szövetekből kerültek izolálásra: levél, gyökér és rizóma. A kísérletek három ismételtsben történtek szövettípusonként, minden esetben negatív kontroll használata mellett.

A qPCR paraméterei a 4. táblázatban láthatóak illetve az olvadáspont analízis paraméterei a következőképp alakultak: felfűtés 66 °C-tól 99 °C-ig, 0,5 °C-onként, majd 90 másodperc várakozás az első „melt” lépés előtt, illetve 2 másodperc várakozás minden lépés után. A vizsgálat 40 ciklust tartalmazott, illetve a választott csatorna: Melt A on Green.

4. táblázat. A qPCR paraméterei.

DNS-polimeráz aktivitása	95 °C	10 perc
Denaturáció	95 °C	30 mp
Primer tapadás	59 °C	1 perc
Polimerizáció	72 °C	1 perc

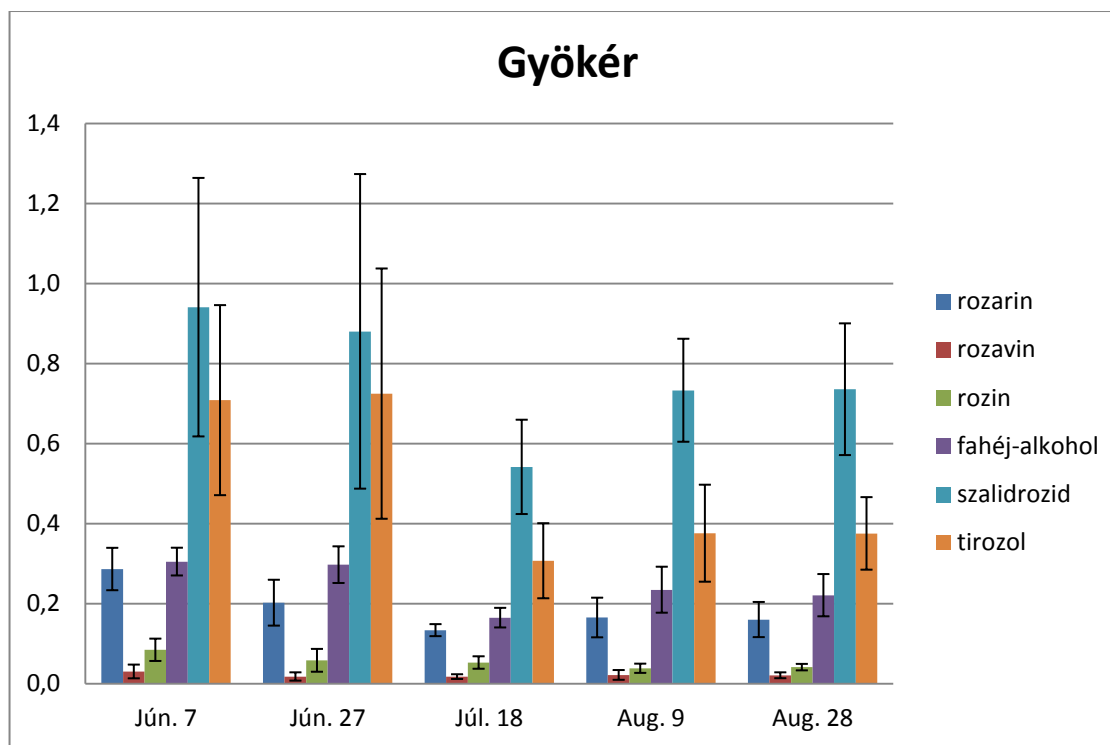
Az amplifikációs görbék elemzése során nemcsak minőségi, hanem mennyiségi elemzést is végeztünk. Ezt az információt az áttörési ciklusszám vagy más néven a „take off pont” (TOP) adja meg. Ez az érték annak a ciklusnak a száma, ahol a detektált fluoreszcens jel exponenciálisan kezd növekedni.

A relatív expressziós értékek számítását REST (Pfapfl *et al.*, 2002) szoftver segítségével végeztük el.

5. EREDMÉNYEK

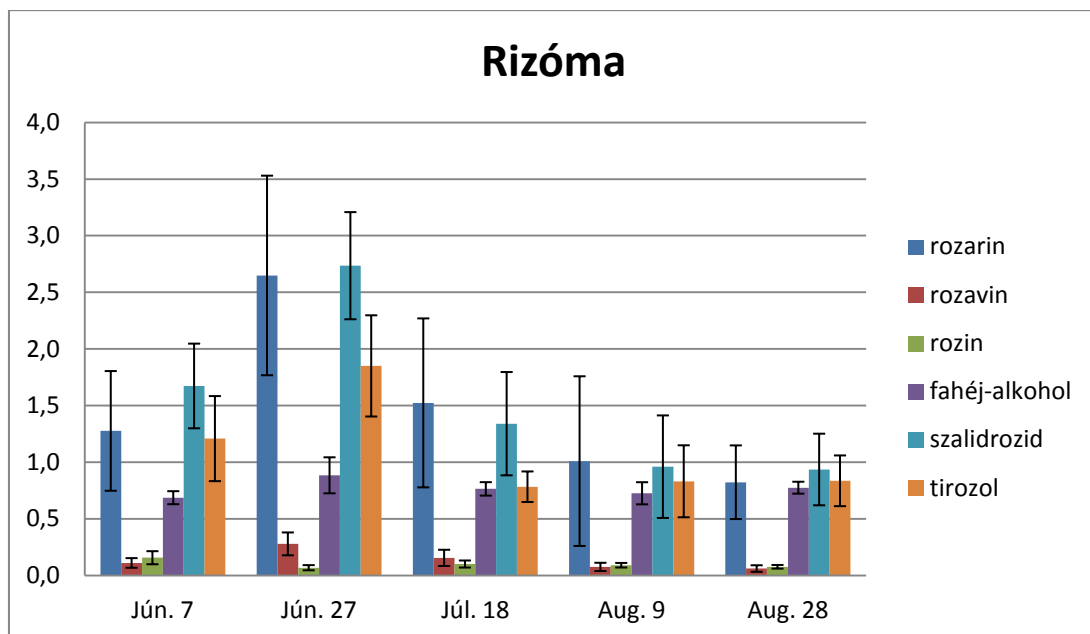
5.1. A minták HPLC vizsgálata

A HPLC vizsgálat eredményeit a 5. és az 6. ábra szemlélteti. A diagram a 7 növényegyed hatóanyag mennyiségének átlagos értékeit mutatja.



5. ábra A gyökérben található hatóanyagok mennyisége a vegetációs periódus során (mg/100g szárazanyag).

A gyökér hatóanyagfelhalmozása során megfigyelhető a különböző hatóanyagok mennyiségének változása a vegetációs ciklus alatt, azonban a hatóanyagtartalom összetétele megközelítőleg azonos marad. Megfigyelhető továbbá egy tendencia, mely szerint a nyár eleji mintákban detekthatók a legnagyobb mennyiségben a különböző hatóanyagok, nyár közepén, a júliusi mintákban a legalacsonyabb a szintjük, majd ezt követően ismét növekedés figyelhető meg. Minden vizsgálati időpontban a szalidroزيد és a tirozol tartalom mennyisége a legszámottevőbb, míg rozavin és a rozin ezekhez viszonyítva csekély mértékben van jelen gyökérben.



6. ábra A rizómában található hatóanyagok mennyisége a vegetációs periódus során (mg/100g szárazanyag).

A rizóma hatóanyag tartalmában jelentősebb eltérések detektálhatók a különböző vegetációs fázisok során, mint a gyökérben, azonban az egyes komponensek minden esetben nagyobb mennyiségben voltak kimutathatók. A másodlagos anyagcseretermékek felhalmozódása eltérő tendenciát mutat. Kezdetben növekszik (jún. 7. és jún. 27. között), majd ezt követően számottevő csökkenés figyelhető meg. A gyökérrel ellentétben, rizómában a szalidrozyd és a tirozol mellett számottevő a rozarin-tartalom is. Több időpontban is a rozarin volt legnagyobb mennyiségben detektálható komponens. A rozavin és a rozarin is nagyobb mennyiségben mutatható ki rizómából, mint gyökérből, míg a fahéjalkohol-tartalom megközelítőleg állandó mennyiségben van jelen a vegetáció során az egyes szervekben.

5.2. Génexpressziós vizsgálatok valós idejű PCR-rel

5.2.1. RNS kivonás

Az izolált RNSek mennyiségi és minőségi ellenőrzését követően, az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kivonás minden mintában sikeres volt, azonban az RNS koncentráció több mintában nagymértékben eltért. A Nanodroppal mért adatokat a következő (5. táblázat) tartalmazza.

5. táblázat Az izolált RNS mennyiségi ellenőrzése.

Minta		ng/μl
Jún. 7	Levél	120,7
	Gyökér	1,9
	Rizóma	15,08
Jún. 27	Levél	215,7
	Gyökér	10,1
	Rizóma	18,5
Júl. 18	Levél	122
	Gyökér	105,4
	Rizóma	79,9
Aug. 9	Levél	145,2
	Gyökér	151,6
	Rizóma	114,1
Aug. 28	Levél	50,4
	Gyökér	121,3
	Rizóma	102,9

A táblázatban feltüntetett adatokból látszik, hogy a június 7-i és a 27-i mintából nem sikerült megfelelő mennyiségű RNS-t izolálnunk a későbbi munkák eredményes elvégzéséhez. Ezeket a mintákat a későbbiekben nem vizsgáltuk.

5.2.2. DNáz kezelés

Mindegyik RNS minta tartalmazott DNS szennyeződést, így a júliusi és az augusztusi mintákat DNáz kezeltük. A kezelés elvégzéséhez szükséges RNS mennyiséget az előző pontban ismertetett táblázat alapján számítottuk ki.

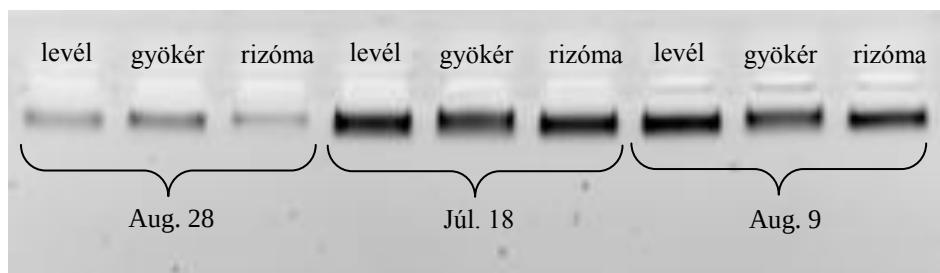
Az ismételt mennyiségi ellenőrzés eredményét az 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat A DNáz kezelt RNS minták mennyiségi ellenőrzése.

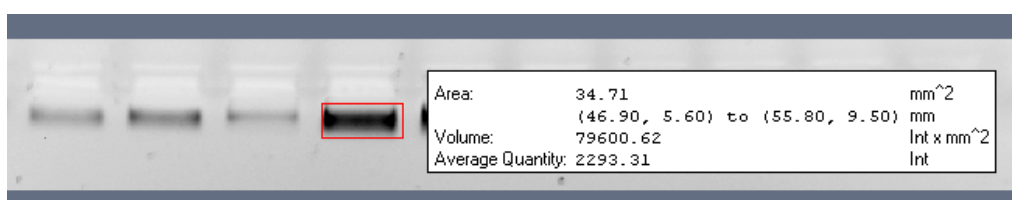
Minta		ng/μl
Júl. 18	Levél	94,8
	Gyökér	84,2
	Rizóma	49,1
Aug. 9	Levél	94,6
	Gyökér	98,1
	Rizóma	43,7
Aug. 28	Levél	37,1
	Gyökér	35,1
	Rizóma	27,9

5.2.3. Reverz transzkripció – cDNS szintézis

A reverz transzkripció után ismételt mennyiségi és minőségi ellenőrzésre került sor, gélelektroforézis segítségével. A minták koncentrációja – ahogy a gélképen is jól látszik – nem volt azonos (7. ábra), így a Quantity One program Density at box funkciójával, megmértük a sávok erősségét. Ezt szemlélteti a 8. ábra.



7. ábra A 3 időpontban gyűjtött szövetekből izolált cDNS-ek.



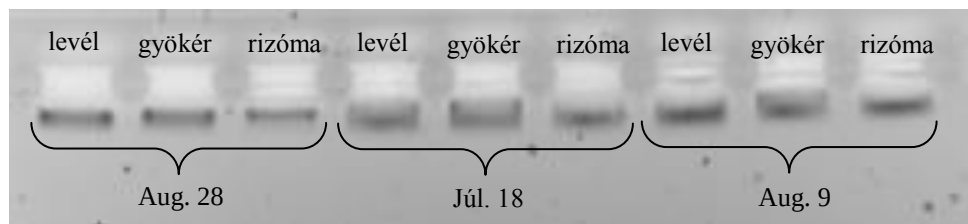
8. ábra A program Density at box funkciója

Az így kapott eredményéből (Average Quantity) számítottuk ki az azonos koncentrációhoz szükséges hígítás mértékét. A mért adatokat a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat Average Quantity értékek

Minta		Average Quantity
Júl. 18	Levél	3364
	Gyökér	3207
	Rizóma	3889
Aug. 9	Levél	4040
	Gyökér	2724
	Rizóma	3484
Aug. 28	Levél	1232
	Gyökér	1750
	Rizóma	1294

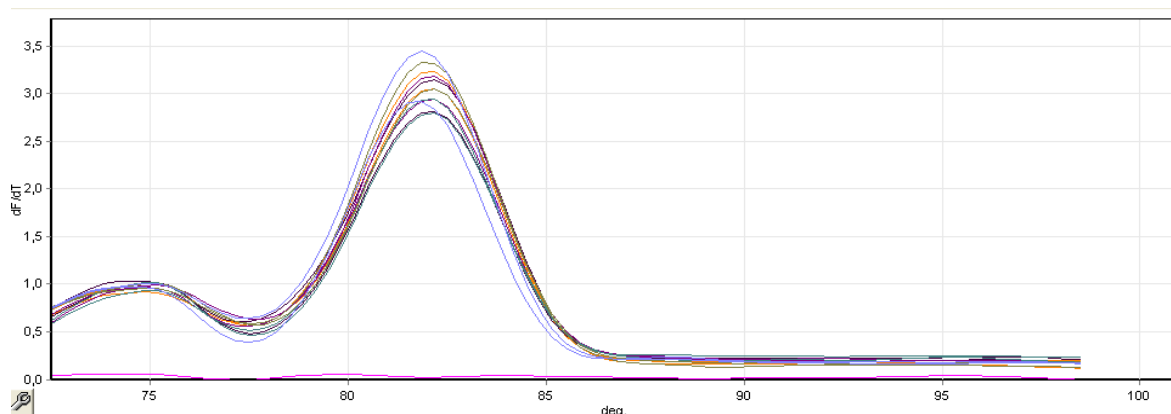
A minták koncentrációja a hígítási folyamat után azonosnak tekinthető (9. ábra). A későbbiekben ezeket a hígított cDNS-eket alkalmaztuk a valós idejű PCR alapjául.



9. ábra Az izolált RNS minták hígítás után.

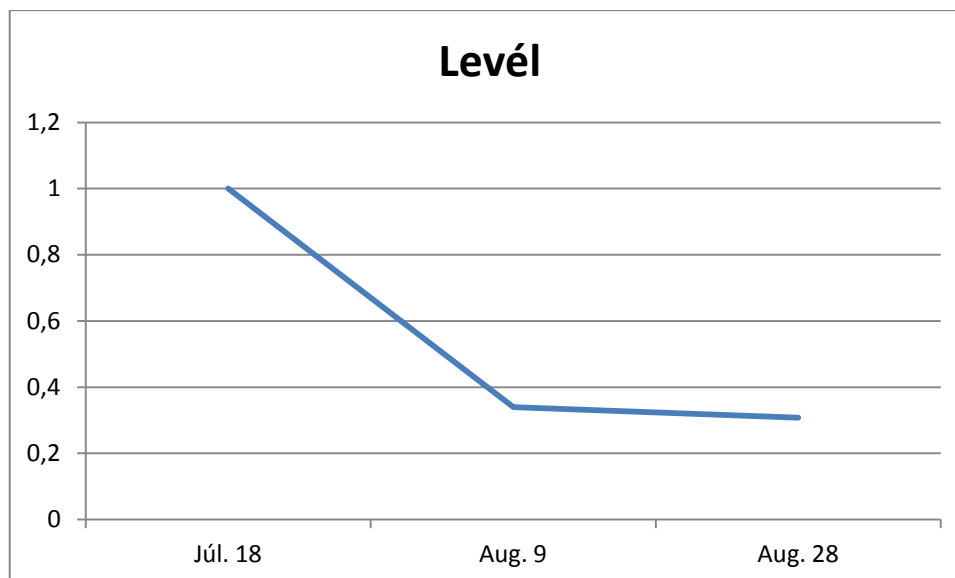
5.2.4. Valós idejű PCR

A valós idejű PCR reakció során egy 102 bp-os fragmentum amplifikálódott. A reakció 90%-os amplifikációs hatékonyságot ért el minden egyes ciklus során. Az olvadási görbe megerősítette (10. ábra) a PCR termék specifitását. A negatív kontrollokban nem volt detektálható amplifikáció.

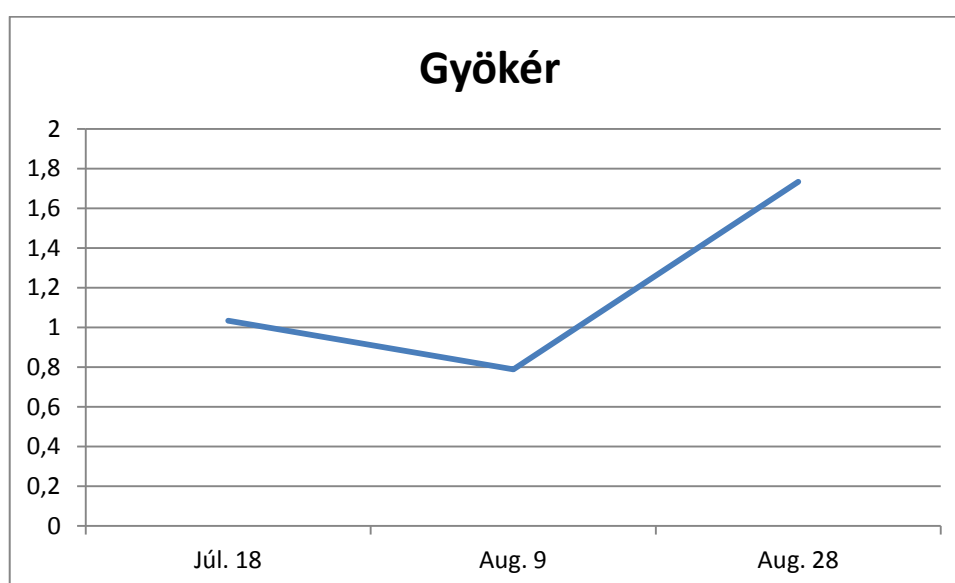


10. ábra Az amplifikált termékek olvadás görbéje. A készülék minden esetben 82 fokon detektálta a csúcsot.

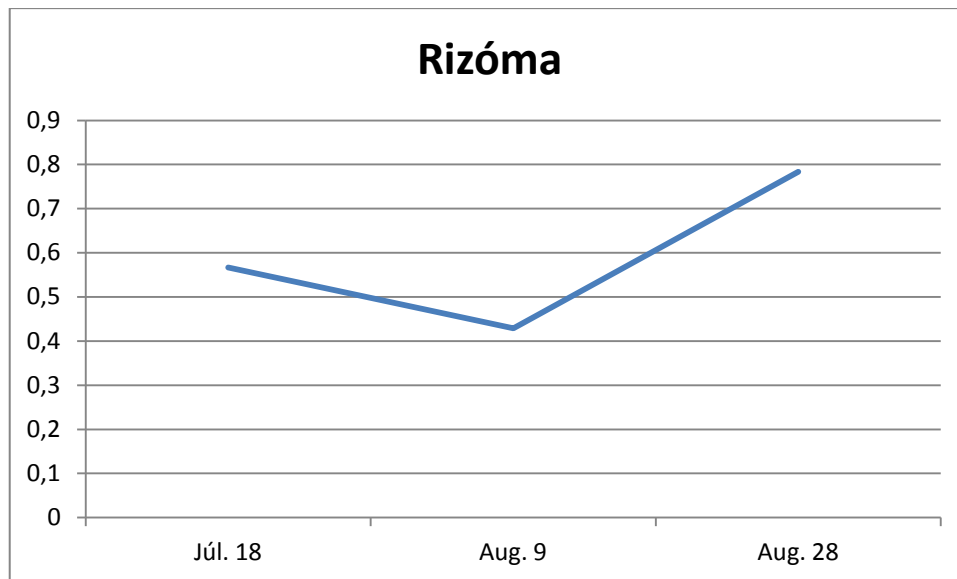
A CAD gén relatív génexpressziós értékeit az alábbi ábrákon szemléltetjük (11., 12., és 13. ábra).



11. ábra A CAD gén relatív génexpressziós változása levélben.



12. ábra CAD gén relatív génexpressziós változása gyökérben.



13. ábra CAD gén relatív génexpressziós változása rizómában.

A három időpontban gyűjtött, három növényi szövet génexpressziós profilja alapján elmondhatjuk, hogy rizómában és gyökérben a fahéjalkohol-dehidrogenáz gén expressziója hasonló volt, míg levélben ettől eltérő, ellentétes irányú kifejeződést detektáltunk. Levélben a relatív expressziós értékek augusztusra számottevően lecsökkentek és ezt követően megközelítőleg azonos szinten maradtak. Gyökér és rizóma esetében is megfigyelhető ugyan csökkenés, azonban a vizsgált időszak végére az expressziós értékek ebben a két szervben a vizsgált időszak végére ismét növekedő tendenciát mutattak. Az expressziós értékek, illetve a növekedés mértéke gyökérben nagyobb mértékű volt, mint rizómában.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az elvégzett munka eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a HPLC vizsgálat során sikeresen meghatároztuk a *Rhodiola rosea* szöveteinek hatóanyagtartalmát, illetve a valós idejű PCR során alkalmazott primerek megfelelőnek bizonyultak a génexpresszió elemzésére, melynek következtében a fahéjalkohol-dehidrogenáz gén expressziós mintázatát vizsgálhattuk a vegetáció során.

A glikozidok felhalmozódásáról csak korlátozott mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Bozhilova (2011) a szalidrozyd tartalom változását vizsgálta egy vegetációs perióduson belül. Szerinte a szalidrozyd tartalom két maximummal rendelkezik, a vegetációs periódus elején és végén, míg mennyisége a virágzás alatt számottevően lecsökken. A rozavinokra vonatkozóan irodalmi adat nem áll rendelkezésünkre (Mirmazloun *et al.*, 2013). A HPLC-vel végzett kísérleteink során a gyökér szöveteiből meghatározott összglikozid-tartalom a Bozhilova által leírt tendenciát mutatja, azonban a rizómából nyert glikozidok felhalmozódása nem az irodalmi adat szerint alakult. A hatóanyag-tartalom virágzásig emelkedik, azt követően jelentős mértékben csökken, majd az általunk vizsgált időszak végéig megközelítőleg azonos szinten marad.

Sibout és munkatársai (2003) *Arabidopsis*-ban 2, míg Barakat és munkatársai (2009) *Populus*-ban 13 CAD izoenzimet vizsgáltak. A kísérletek során az izozimek szövetenként eltérő expressziós szintet mutattak. Kísérleteinkben a relatív expressziós értékek szintén szövetenként eltéréseket mutattak. A dolgozat alapját képező kísérletek során csak egy izoformát vizsgáltunk, azonban tanszéken további formák azonosítására és vizsgálatára vonatkozó kísérletek már megkezdődtek.

Kezdetben, gyökérben és levélben azonos, míg rizómában alacsonyabb szintű expresszió volt megfigyelhető, azonban a virágzás után az expresszió számottevőbb mértékben csökkent a levélben, mint a gyökérben vagy a rizómában. Ezt követően a levélben ismét csökkenés, míg a gyökérben és a rizómában növekedő expressziót detektáltunk. Ennek mértéke gyökérben jelentősebb volt.

Habár a gyökér relatív génexpressziós profilja szintén csökkenést mutat, azonban a glikozid-tartalom csökkenése a virágzás kezdetére, míg a génexpressziós csökkenés a virágzás végére tehető. Rizómában azonban míg a CAD gén expressziójában a vegetáció végére ismételt emelkedés figyelhető meg, addig a hatóanyag-tartalom a virágzástól folyamatosan csökkenő profilt mutat.

A hatóanyagtartalom meghatározás során detektált komponensek összetétele a vegetációs periódus során gyökér esetében az irodalmi adatok alapján alakult, míg rizómában nem. A génexpressziós vizsgálat során tapasztalt relatív expressziós értékek szövetenkénti polimorfizmusát az irodalmi adatok szintén alátámasztják (Bozilova, 2011).

A fahéjalkohol-dehidrogenáz gén működése és a hatóanyagfelhalmozódás között összefüggést nem találtunk. Ennek hátterében feltételezhetően a különböző izozimek jelenléte áll, melyeket a későbbi kutatások során szeretnénk vizsgálni.

.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Rhodiola rosea* adaptogén hatású gyógynövény, melynek jótékony hatásait évszázadok óta ismerik és alkalmazzák a tradicionális gyógyászatban. Hatóanyagainak és gyógyhatásainak vizsgálatáról számos irodalmi adat és klinikai vizsgálat áll rendelkezésünkre. Mára már a modern orvostudomány is elfogadja a szervezetre gyakorolt jótékony hatását. A legfontosabb hatóanyagainak a fahéj-alkohol glikozidokat (rozin, rozavin, rozarin) és a szalidrozyd tartják. Ezek bioszintézisének egyik enzime a fahéjalkohol-dehidrogenáz (CAD), mely a fahéj-aldehidet fahéjalkohollá alakítja. A lignin bioszintézisben aktívan kutattott ezim, azonban a fahéjalkoholok bioszintézisében játszott szerepéről kevés információ áll rendelkezésünkre.

Munkánk során ennek a génnek az expresszióját vizsgáltuk valós idejű PCR-rel *Rhodiola rosea* növény különböző szöveteiben, a vegetáció során. Ezzel párhuzamosan HPLC (Hight Pressure Liquid Chromatography) technikával a vegetációs periódus során felhalmozódó hatóanyag-tartalmat vizsgáltuk, majd összevetettük a CAD gén expressziós mintázatát a hatóanyagtartalom-változással.

A valós idejű PCR vizsgálat során alkalmazott primer pár korábbi tanszéki kutatások eredménye. A fahéjalkohol-dehidrogenáz expressziója minden egyes növényi szövetben (levélben, gyökérben és rizómában) kimutatható volt. A kapott expressziós adatokból REST szoftverrel relatív génexpressziós értékeket határoztunk meg. A kapott értékek alapján a levélben az expresszió virágzás után lecsökkent, majd tartósan alacsony szinten maradt. Gyökérben és rizómában szintén megfigyelhető volt a virágzás utáni expressziós csökkenés, azonban ez a vegetáció végére ismét növekvő tendenciát mutatott.

A hatóanyagtartalom meghatározás során a komponensek mennyiségét mg/100g szárazanyagban határoztuk meg. Gyökérben a hatóanyagmennyiség meghatározásakor két maximumot detektáltunk: az elsőt a vegetációs periódus kezdetén, a másodikat pedig vegetáció végén. Virágzáskor a hatóanyagtartalom jelentősen lecsökken, azt követően azonban ismét növekvő tendenciát mutatnak az értékek. Rizómában azonban csak egy maximum volt megfigyelhető közvetlenül a virágzási periódus előtt. Virágzáskor a hatóanyagtartalom szintén számottevően lecsökkent, azonban rizóma esetén tartósan ezen a szinten maradt.

A fahéjalkohol-dehidrogenáz gén expressziója és a hatóanyag-változás összevetése során megállapítottuk, hogy a gén relatív kifejeződése és a hatóanyagtartalom változása között nem volt detektálható összefüggés.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkám során, valamint szakdolgozatom elkészítésében segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom Dr. Pedryc Andrzej Tanszékvezető Úrnak, aki lehetőséget biztosított dolgozatom elkészüléséhez.

Áldozatos munkájáért hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. György Zsuzsannának, aki idejét és energiáját nem sajnálva segítette munkámat dolgozatom elkészítését.

Köszönetemet szeretném kifejezni Iman Mirmazloumnek a munkám során nyújtott segítségéért.

Továbbá köszönettel tartozom Genetika és Növénynemesítés Tanszék munkatársainak a támogatásáért.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Akgul, Y., Ferreira, D., Abourashed, E.A., Khan, I.A. (2004) Lotaustralin from *Rhodiola rosea* roots. *Fitoterapia*, 75:612-614.
2. Anonymus (2010) Real Time PCR – From Theory to Practice. Invitrogen Corp.
3. Asdal, A., Galambosi, B., Olsoon, K., Wedelsback Bladh, K., Porvaldsdóttir, E. (2006) Spice- and Medicinal Plants in the Nordic and Baltic Countries. *Conservation of Genetic Resources*, p.94-104.
4. Barakat, A., Bagniewska-Zadworna, A., Choi, A., Plakkat, U., DiLoreto, D.S., Yellanki, P., Carlson, J.E. (2009) The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: phylogeny, organization, and expression. *BMC Plant Biology*. 9:26.
5. Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J. (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, 21(3):389-395.
6. Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., Hammarstrom, M.L. (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59(6):566-573.
7. Blanco-Portales, R., Medina-Escobar, N., López-Ráez, J.A., González-Reyes, J.A., Villalba, J.M., Moyano, E., Caballero, J.L., Munoz-Blanco, J. (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany*. 53:1723-1734.
8. Bocharova, O.A., Matveev, B.P., Baryshnikov, A., Figurin, K.M., Serebriakova, R.V., Bodrova, N.B. (1995) The effect of a *Rhodiola rosea* extract on the incidence of recurrences of a superficial bladder cancer (experimental clinical research). *Urologiia I Nefrologiia*, 2:46-47.
9. Bozhilova, M. (2011) Salidroside content in *Rhodiola rosea* L., dynamics and variability. *Botanica Serbica*. 35(1):67-70.
10. Brigel, M., Beguin, C. (1926) Isolation of rutoside, asparagines and a new glycoside, hydrolysable by emulsion, salidroside from *Salix triandra* L. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*, 183:321-323.

11. Brill, E.M., Abrahams, S., Hayes, C.M., Jenkins, C.L., Watson, J.M. (1999) Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology*. 41:279-291.
12. Brown, R.P., Gerbarg, P.L., Ramazanov, Z. (2002) *Rhodiola rosea* :A Phytomedicinal Overview. *HerbalGram*, 56:40-50.
13. Chervoneva, I., Li, Y., Schulz, S., Croker, S., Wilson, C., Waldman, S.A., Hyslop, T. (2010) Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics*, 11:253.
14. Darbinyan, V., Kteyan, A., Panossian, A., Gabrielian, E., Wikman, G., 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.
15. Dascaluc, A., Calugaru-Spatatu, T., Ciocarlan, A., Costica, M., Coscita, N., Krajewska-Patan, A., Dreger, M., Mscisz, A., Furmanowa, M., Mrozikiewicz, P.M., (2008) Chemical composition of folden root (*Rhodiola rosea* L.) rhizomes of Carpathian origin, *Herba Polonica*, 54(4):17-27.
16. Dementieva, L.A., Iaremenko, K.V. (1987) Effect of a *Rhodiola* extraxt on the tumor process in an experiment. *Voprosy Onkologii*, 33(7):57-60.
17. Deng, W.W., Zhang, M., Wu, J.Q., Jiang, Z.Z., Tang, L., Li, Y.Y., Wei, C.L., Jiang, C.J., Wan, X.C. (2013) Molecular cloning, functional analysis of three cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes in the leaves of the plant, *Camellia sinensis*. *Journal of Plant Physiology*. 170:272-282.
18. Dheda, K., Huggett, J., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 37:112-119.
19. Durany, N., Munch, G., Michel, T., Riederer, P. (1999) Investigations on oxidative stress and therapeutical implications in dementia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249(3):68-73.
20. Furmanowa, M., Oledzka, H., Michalska, M., Sokolnicka, I., Radomska, D. (1995) *Rhodiola rosea* L. (Roseroot): In vitro regeneration and the biological activity of roots. *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 33, Medicinal and Aromatic Plants VIII*: 412-426.

21. Furmanowa, M., Skopinska-Rozewska, E., Rogala, E., Malgorzata, H. (1998) *Rhodiola rosea* in vitro culture – phytochemical analysis and antioxidant action. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(1):69-73.
22. Galaktyonov, S.G., Nikolaychik, V.V., Yurin, V.M., Birger, P.S., Kozlovskaya, E.V., Mihneva, L.M., Mazur, L.I. (1991) isledovaniye protektorov moduliruyushchih povrezdayushcheje deystviye peptidov gruppy „srednih molekul” na kletki krovi. *Khimiko-farmaceuticheskiy Zhurnal*, 11:8-10.
23. Galambosi, B., György Zs. (2008) Rózsagyökér: a Téliapó rózsája. *Kertészet és Szőlészet*, 57(1):6-9.
24. Ginzinger, D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6):503-512.
25. György, Zs. (2006) Glycoside production by in vitro *Rhodiola rosea* cultures. Doktori (PhD) értekezés, Finnország, Oulu Egyetem.
26. György, Zs. (2009) Markerezés In: Pedryc, A., (szerk) A genetika és növénynevelés alapjai (egyetemi jegyzet). Budapest, Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék. p.94-97.
27. Hajósné Novák, M. (szerk) (1999) Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
28. Halpin, C., Knight, M.E., Grima-Pettenati, J., Goffner, D., Boudet, A., Schuch, W. (1992) Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco stems. *Plant Physiology*. 98:12-16.
29. Hawkins, S.W., Boudet, A.M. (1994) Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* Hook. *Plant Physiology*. 104:75-84.
30. Hegi, G. (1963) *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Második, javított kiadás. IV/2:99-102.
31. Hibino, T., Shibata, D., Chen, J.Q., Higuchi, T. (1993) Cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Aralia cordata*: cloning of the cDNA and expression of the ene in lignified tissues. *Plant and Cell Physiology*. 34:659-665.

32. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10:413-417.
33. Hugett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity*, 6(4):279-284.
34. Hushbaktova, Z.A., Syrov, V.N., Kuliev, Z. (1989) Issledovan'ye gipolipidemicheskikh svoystv polimernykh proantocyanidonov iz rasteniy ispolizuyemykh v narodnoy medicinie. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 9:1111-1115.
35. Ishitani, R., Sunaga, K., Hirano, A., Saunders, P., Katsube, N., Chuang, D.M. (1996) Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neuron in culture. *Journal of Neurochemistry*, 66(3):928-935.
36. Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J.J., Bickford, P.C. (1999) Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, and strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*, 19(18):8114-8121.
37. Kelly, G.S. (2001) *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. *Alternative Medicine Review*, 6(3):293-302.
38. Khaidayev Z., Menshikova T.A. (1978) *Medicinal Plants in Mongolian Medicine*. Ulan-Bator Mongolia.
39. Khanum, F., Singh Bawa A., Singh B., (2005) *Rhodiola rosea*: A Versatile Adaptogen, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4:55-61.
40. Könye, R. (2012) Előkísérletek *Rhodiola rosea* bioszintézis útjában résztvevő gének expressziójának valós idejű PCR-rel történő vizsgálatához. Szakdolgozat (BSc), Budapest, Budapesti Corvinus Egyetem.
41. Kurkin, V.A., Zapesochanaya, G.G., Gorbunov, Y.N., Nukhimovskii, E.L., Shreter, A.I., Shchavlinskii, A.N. (1986) Chemical investigations on some species of *Rhodiola* L. and *Sedum* L. genera and problems of their chemotaxonomy. *Rastitel'nye Resursy*, 22(3):310-319.
42. Kurkin, V.A., Zapesochanaya, G.G., Shchavlinskii, A.N. (1984) Flavonoids of the rhizomes of *Rhodiola rosea* III. *Chemistry of Natural Compounds*, 20(3):367-368.

43. Kurkin, V.A., Zapesochnaya, G.G. (1986a) Chemical composition and pharmacological properties of *Rhodiola rosea* L., Kihmiko Pharmatsevticheskii Zhurnal, 20:1231-1244.
44. Kurkin, V.A., Zapesochnaya, G.G., Grinenko, N.A., zolotarev, B.M. (1990) Phenolic compounds of the bark of *Syringa vulgaris*. Chemistry of Natural Compounds, 25 (4): 499-500.
45. Kurkin, V.A., Zapesochnaya, G.G., Shchavlinsky, A.N., Nukhimovsky, E.L., Vandyshev, V.V. (1985) Method of Determination of *Rhodiola-Rosea* Rhizomes Authenticity and Quality, Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal, 19(3):185-190.
46. Lanza, D.A.M., Martínez, A.M.J., Matellano, L.F., Carretero, C.R., Castillo, L.V., Sen, A.M.S., Benito, P.B. (2001) Lignan and Phenylpropanoid Glycosides from *Phyllireya latifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity, Planta Medica, 67:219-223.
47. Lee, M.W., Lee, Y.A., Park, H.M., Toh, S.H., Lee, E.J., Jang, H.D., Kim, Y.H., (2000) Antioxidative Phenolic Compounds from the Roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Archives of Pharmacal Research, 23:455-458.
48. Lid, J. & Lid, D.T. (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo, p. 378.
49. Ma, Q. H. (2010) Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat. Journal of Experimental Botany. 61(10):2735-2744.
50. Maslova, L.V., Kondratev, B., Maslov, L.N., Lishmanov, I. (1994) The cardioprotective and antiadrenergic activity of an extract of *Rhodiola rosea* in stress. Eksperimentalnaia I Klinicheskaia Farmakologiya, 57(6):61-63.
51. Melis, D.L.E., Whiteman, P.H., Stevenson, T.W. (1999) Isolation and characterisation of a cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Science. 143:173-182.
52. Mirmazloum, I., György, Z. (2012) Review of the molecular genetics in higher plants towards salidroside and cinnamyl alcohol glycosides biosynthesis in *Rhodiola rosea* L. Acta Alimentaria, 41:133-146.

53. Mirmazloum, I., Komáromi, B., Ladányi, M., Pedryc, A., György, Z. (2013) Glycoside content in *Rhodiola rosea* L.: dynamics and expression pattern of genes involved in the synthesis of rosavins. Book of Abstracts of the International Symposium on Medicinal Plants and Natural products. 17-19 June, 2013, Montreal, Quebec, Canada, p. 29.
54. Molokovsky, D.S., Davydov, V.V., Tulenev, V.V. (1989) The action of adaptogenic plant preparations in experimental alloxan diabetes. *Problemy Endokrinologii*, 35:82-87.
55. Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421):2907-2914.
56. O'Malley, D.M., Porter, S., Sederoff, R.R. (1992) Purification, characterization, and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L). *Plant Physiology*. 98:1364-1371.
57. Ohba, H. (1989) Biogeography of the Genus *Rhodiola* (*Crassulaceae*), with Special Reference to the Floristic Interaction between the Himalaya and the Arctic Region. in Ohba, H., Hayami, I., Mochizuki, K. (Eds), *Current Aspects of Biogeography in West Pacific and East Asian Regions* [M]. Tokyo, p.115-133.
58. Oshugi, M., Fan, W., Hase, K., Xiong, Q., Tezuka, Y., Komatsu, K., Namba, T., Saitoh, T., Tazawa, K., Kadota, S. (1999) Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *Journal of Ethnopharmacology*, 67:111-119.
59. Panossian, A., Wagner, H. (2005) Stimulating effect of adaptogens: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration. *Phytotherapy Research*, 19:819-838.
60. Panossian, A., Wikman, G., Sarris, J. (2010) Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*. 17:481-493.
61. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30(9):e36.
62. Priszter, Sz. (2003) *Növényneveink*. Budapest, Mezőgazda Kiadó, p.479.

63. Ramazanov, Z., Germano, C., Del Mar Bernal Suarez, M., (1999) Arctic root (*Rhodiola rosea*). Kensington Publishing Corp., New York.
64. Rohloff, J. (2002) Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L. *Phytochemistry*, 59:655-661.
65. Ryan, D., Robards, K., (1998): Critical review. Phenolic compounds in olives. *The Analyst*, 123(5):31-44.
66. Samaj, J., Hawkins, S., Lauvergeat, V., Grimma-Pettenati, J., Boudet, A. (1998) Immunolocalization of cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD 2) indicates a good correlation with cell-specific activity of CAD 2 promoter in transgenic poplar shoots. *Planta*. 204:437-443.
67. Saratikov, A. S., Krasnov, E. A. (1987). *Rhodiola rosea* is a valuable medicinal plant. Oroszország, Tomsk, Tomsk Állami Egyetem.
68. Saratikov, A.S., (1974) Golden Root (*Rhodiola rosea*), Tomsk Állami Egyetem, Tomsk-i Egyetemi Kiadó.
69. Shen, Y., Kojima, Y., Terazawa, M., (1999) Four glucosides of p-hydroxyphenyl derivatives from birch leaves. *Journal of Wood Science*, 45(4):332-336.
70. Sibout, R., Eudes, A., Pollet, B., Goujon, T., Mila, I., Ganier, F., Séguin, A., Lapiere, C., Jouanin, L. (2003) Expression Pattern of Two Paralogs Encoding Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and Characterization of the Corresponding Mutants. *Plant Physiology*. 132(2):848-860.
71. Singh, R., Green, M. (1993) Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science*, 259(5093):365-368.
72. Spasov, A.A., Mandrikov, V.B., Mironova, I.A. (2000) Effect of rhodaxon preparation on the psychophysiological and physical adaptations of students to learning load. *Eksperimentalnaia i Klinicheskaia Farmakologija*, 63(1):76-78.
73. Spasov, A.A., Wikman, G.K., Mandrikov, V.B., Mironova, I.A., Neumoin, V.V. (2000) A double-blind, placebo-controlled pilot study of the stimulating and adaptogenic effect of *Rhodiola rosea* SHR-5 extract on the fatigue of students caused by stress during an examination period with a repeated low-dose regimen. *Phytomedicine*, 7(2):85-89.
74. Suzuki, T., Higgins, P.J., Crawford, D.R. (2000) Control selection for RNA quantitation. *BioTechniques*, 29:332-337.

75. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75(2-3):291-295.
76. Thieme, H., (1969) On the identity of glucoside rhodiolide and salidroside, *Pharmazie*, 24(2):118-119.
77. Thieme, H., Walewska, E., Winkler, H.J., (1969) Isolation of salidroside from leaves of *Rhododendron ponticum* x *catawbiense*. *Pharmazie*, 24(12):783
78. Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., Zhang, Z. (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 10:71.
79. Troshchenko, A.T., Kutikova, G.A. (1967) Rhodiolide from *Rhodiola rosea* and *R. quadrifida*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 3(4):244-249.
80. Udintsev, S.N., Schakhov, V.P. (1991) Decrease of cyclophosphamide haemotoxicity by *Rhodiola rosea* root extract in mice with Ehrlich and Lewis transplantable tumors. *European Journal of Cancer*, 27:1182.
81. Van Doorselaere, J., Baucher, M., Feuillet, C., Boudet, A.M., Van Montagu, M., Inze, D. (1995) Isolation of cinnamyl alcohol dehydrogenase cDNAs from two important economic species: alfalfa and poplar. Demonstration of a high homology of the gene within angiosperms. *Plant Physiology and Biochemistry*. 33:105-109.
82. Vastag, B. (2007) Warming to a cold war herb. *Science news*, 172:184-189.
83. Yperman, J., De Visscher, G., Holvoet, P., Flameng, W. (2004) Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves. *Journal of Heart Valve Disease*, 13(5):848-853.