

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Genetika és Növénynevelés Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

A szalidroizid bioszintézisben résztvevő *tirozin dekarboxiláz* gén variabilitása

Molnár Bence

Kertészmérnök BSc, III. évf.

Konzulens: György Zsuzsanna PhD, egyetemi adjunktus

Budapest, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzés	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. A <i>Rhodiola rosea</i> jellemzése	6
3.1.1. Bevezetés.....	6
3.1.2. Rendszertan és rokon fajok	6
3.1.3. Botanika	7
3.1.4. Származás, elterjedés	8
3.1.5. Hatóanyagai.....	9
3.1.6. Farmakológiai hatás	11
3.1.7. Szalidroزيد bioszintézis.....	12
3.1.8. <i>Tirozin-dekarboxiláz</i> gén.....	15
4. Anyag és módszer	18
4.1. Növényanyag	18
4.2. DNS kivonás.....	18
4.3. PCR vizsgálat	18
4.4. SSCP.....	21
4.4.1. Az SSCP gél öntésének és előhívásának folyamata.....	21
4.4.2. Az SSCP gél értékelése	22
4.5. Ligálás, klónozás	22
4.5.1. Ligálás	22
4.5.2. Transzformálás	22
4.5.3. Szekvenálás	24
4.5.4. Szekvenciák bioinformatikai vizsgálata.....	24
5. Eredmények és megvitatásuk	25
5.1. PCR.....	25
5.2. SSCP.....	25
5.3. Adatértékelés	26
5.4. 5 svájci populáció elemzése	30
5.5. Szekvenciaillesztés	30
5.6. Saját szekvencia eredmények	32
6. Összefoglalás.....	34
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	35
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	41

Rövidítések jegyzéke

APS	ammónium-peroxo diszulfát
bp	bázispár
cDNS	komplementer dezoxiribonukleinsav
cds	teljes DNS szekvencia
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleozid-trifoszfátok
FDE	80 % formamid tartalmú festék
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanin
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	teljes leolvasási keret
PCR	polimeráz láncreakció
SNP	egyponos nukleotid polimorfizmus
SSCP	egyszálú konformációs polimorfizmus
ssDNS	egyszálú dezoxiribonukleinsav
TBE	tris-bórsav-EDTA
TEMED	tetrametil-etilén-diamin
TyrDC, TYDC, TyDC	tirozin-dekarboxiláz
UV	ultraibolya

1. BEVEZETÉS

A *Rhodiola rosea* a *Crassulaceae* családba tartozó tradicionális gyógynövény. A modern orvostudomány adaptogén növényként ismeri (Kelly, 2001). Többféle gyógyhatást tulajdonítanak neki: többek között serkenti a központi idegrendszer működését (Kurkin és Zapesochaya, 1986), jótékonyan hat a hosszú távú memóriára és a koncentrációs képességre (Furmanova *et al.*, 1999), többféle jótékony hatást gyakorol a szívre (Kelly, 2001; Lishmanov *et al.*, 1993; Lishmanov *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), illetve szerepe lehet a rák leküzdésében (Bocharova *et al.*, 1995).

Adaptogén hatását fő hatóanyagainak, a szalidrozidnak és a rozavineknek tulajdonítják (Furmanova *et al.*, 1995), ezek főként a gyökérben és a rizómában halmozódnak fel. A növényben felhalmozódó szalidrozid tartalom széles skálán változik, irodalmi adatok alapján a termőhelyi adottságok is befolyásolják (Tasheva és Kosturkova, 2012; Malnoe *et al.*, 2009).

A tirozin-dekarboxiláz gén variabilitás vizsgálatához egy, a Tanszéken folyó munka eredménye adta az alapot. Iman Mirmazloun PhD hallgató megfigyelte, hogy amennyiben más populációból származó egyedek DNS-ét használta a *TyrDC* gén szekvenciájának meghatározásához, kis mértékben, de eltérő szekvenciákat kapott. Jelen kutatás a szekvenálási hibák kizárását célozta. Sok különböző termőhelyről származó *Rhodiola rosea* egyed DNS-éből amplifikáltuk a *TyrDC* gén ORF-jét és az egy pontos nukleotid polimorfizmusok kimutatására kiválóan alkalmas SSCP technikával vizsgáltuk valóban több eltérő szekvenciáról van-e szó.

A tirozin-dekarboxiláz enzim a szalidrozid bioszintézis egyik kulcseleme, a tirozint tiraminná redukálja (György, 2006). Feltételezhető, hogy a tirozin-dekarboxiláz felelős lehet a különböző termőhelyeken talált nagyon eltérő szalidrozid tartalomért, ezért érdemes megvizsgálni a különböző populációkból származó rózsagyökér minták tirozin-dekarboxiláz génjeit, és regisztrálni a különbségeket, illetve, hogy hány génváltozat létezik. A minták közül háromnak a szekvenciáját is meghatároztuk, és bioinformatikai programokkal összehasonlítottuk egymással illetve a Génbankból letöltött más szekvenciákkal. Emelett megvizsgáltuk az NCBI adatbázisban fellelhető többi tirozin-dekarboxiláz szekvenciát is, azzal a céllal, hogy lássuk előfordul-e más fajokon belül is, hogy több szekvenciaváltozata van ennek a génnek.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk célja a *tirozin-dekarboxiláz* gén variabilitásának felmérése volt. A primereket a tanszéken folyó előzetes kutatás alapján a *TyrDC* gén teljes ORF-jére terveztük.

Célunk egymástól távol eső populációkból származó minél több egyed vizsgálata volt SSCP technikával, továbbá néhány minta esetében a szekvencia meghatározása is.

- A munka során PCR-rel amplifikáltuk a tirozin dekarboxiláz enzimet kódoló ORF-et. Összesen 142 *Rhodiola rosea* egyed DNS-ét használtuk fel.
- Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az amplifikáció sikerességét.
- SSCP technika alkalmazásával vizsgáltuk a szekvencia variabilitását.
- Néhány minta esetében meghatároztuk a *TyrDC* gén szekvenciáját és ezeket összehasonlítottuk egymással.
- Letöltöttük és elemeztük az NCBI Génbankban elérhető növényi *TyrDC* szekvenciákat.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A *Rhodiola rosea* jellemzése

3.1.1. Bevezetés

A *Rhodiola rosea* jótékony hatásait sok évszázaddal ezelőtt felfedezték. Dioscorides ókori görög orvos már i.sz. 77-ben leírta alkalmazási módjait a *De Materia Medica* című művében (Brown *et al.*, 2002). Franciaországban és Svédországban már a XVIII-XIX. században gyógyászati céllal alkalmazták. Izlandon és Németországban a népgyógyászati felhasználása ismert. Főként agyi teljesítmény növelésére és erős fejfájás enyhítésére ajánlották (Shevtsov *et al.*, 2003). Először a volt Szovjetunióban kezdték el komolyan kutatni a gyógyhatásait, de ezeket a kutatásokat katonai titoknak minősítették, így az eredményeknek csak kis részét publikálták. A nyugati világ jócskán lemaradva, csak a 90-es évektől foglalkozik a *Rhodiola rosea* tanulmányozásával (Vastag, 2007).

3.1.2. Rendszertan és rokon fajok

A *Rhodiola rosea* (1. ábra) a *Crassulaceae* család tagja. Hivatalos magyar neve illatos rózsás varjúháj (Priszter, 1998), de az angol neve alapján legtöbbször csak aranygyökér vagy rózsagyökér néven emlegetik. 1963-ig *Sedum rosea* néven a *Sedum* nemzetségbe tartozott. Ekkor Hegi több mint 50 *Rhodiola* faj azonosítása után egy külön nemzetségbe sorolta őket (Brown *et al.*, 2002). Mára kétszáznál is több fajt azonosítottak a nemzetségben, a *Rhodiola rosea*-n kívül. Hagyományos gyógyászati jelentőségük miatt legismertebbek a *R. alternata*, *R. brevipetiolata*, *R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. quadrifida*, *R. sachalinensis* és a *R. sacra* (Kelly, 2001).



1. ábra. *Rhodiola rosea* (fotó: Iman Mirmazloum).

3.1.3. Botanika

A *Rhodiola rosea* lágy szárú, évelő, kétlaki növény (Parker és Malone, 2006). Magassága 30-70 cm között változik, tapasztalatok szerint függ a növény ivari jellegétől (Galambosi *et al.*, 2009), illetve a környezeti feltételek is befolyásolják (Brown *et al.*, 2002). A porzós egyedek általában magasabbak és nehezebbek, mint a termős egyedek (Galambosi *et al.*, 2009). Áttelelő szerve a vastag, több elágazással rendelkező, pikkelyes rizómája, melynek tömege átlagosan 70-400 g, de a 3,5 kg-ot is elérheti (Tasheva és Kosturkova, 2012). A rizóma rózsa illatú, ha megvágjuk (Khanum *et al.*, 2005), erről a karakterisztikus rózsa illatáról kapta a *rosea* nevet (Rholoff, 2001). A rózsagyökér szára nem elágazó, világoszöld húsos levelei sűrűn fedik (Asdal *et al.*, 2006). A levelek alakját tekintve nagyon sokszínű faj, a hosszúkástól a tojásdadig mindenféle változat megtalálható (2. ábra) (Tasheva és Kosturkova, 2012). A *Rhodiola rosea* virágai aktinomorfak, szíromlevelei szabadon állnak. Alapvetően egyivarúak, de ritkán találkozhatunk porzós és termős virágokkal is rendelkező egyedekkel (Asdal *et al.*, 2006). A porzós virágok általában nagyobbak, feltűnőbbek. Színük alapvetően sárga, ritkán pirosas elszíneződések tapasztalhatóak. A termős virágok színe a piros különböző erősségű árnyalatai között változik (Sandberg és Göthberg idézte Kylin, 2010). Skandináviában a *Rhodiola rosea* június – júliusban virágzik (Asdal *et al.*, 2006), ezzel szemben a bulgáriai populációkban április – augusztus közötti virágzásról számoltak be (Tasheva és Kosturkova, 2012). Az említett területek közötti eltérés a földrajzi elhelyezkedésükkel magyarázható. Vegetatívan és maggal is terjed (Aiken *et al.*, 2003).

A *Rhodiola rosea* diploid, kromoszómaszáma $2n=22$ (Lid és Lid, 2005).



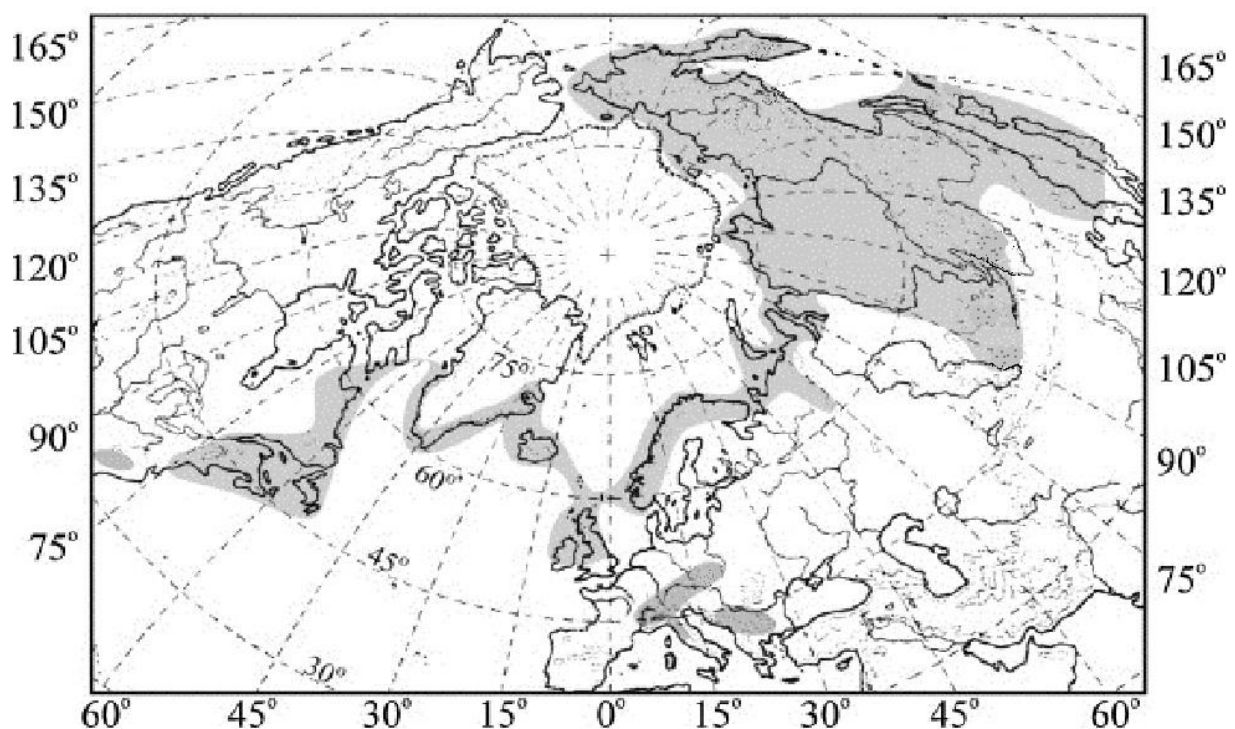
2. ábra. A *Rhodiola rosea* különböző alakú levelei (Asdal *et al.*, 2006).

3.1.4. Származás, elterjedés

A *Rhodiola* nemzetség valószínűleg Dél-Kína hegyvidéki területeiről és a Himalájából származik (Darbinyan *et al.*, 2000). Általában hasadékokban vagy sziklás hegyoldalakon nő Európa, Ázsia és Észak-Amerika sarkvidéki területein, illetve délebbi magashegységekben (3. ábra) (Panossian, 2010). Rohloff (2001) szerint akár 5000 m-es magasságig megtalálható a délebbi magashegységekben. A nemzetség ökológiai igényeinek megfelelően a *Rhodiola rosea* nem tolerálja a forró nyári hőmérsékletet, viszont magas páratartalom szükséges a megfelelő növekedéséhez (Elameen, 2008).

Európában Izlandon, Norvégiában, Svédországban és Finnországban viszonylag gyakori növény, Jotunheimen mellett 2280 m-es magasságig megtalálható a skandináv hegyekben (Asdal *et al.*, 2006). Kisebb populációi megtalálhatóak az Alpokban, a Kárpátokban, és egészen délen a Pireneusokban, a Balkán hegységben is (Brown *et al.*, 2002).

Ázsián belül legnagyobb mennyiségben Szibériában él, emellett számottevő mértékben elterjedt az Altáj-hegységben is. Az utóbbi terület a fő forrása a kereskedelmi forgalomban lévő gyökereknek és rizómáknak (3. ábra) (Pannossian, 2010).



3. ábra. A *Rhodiola rosea* elterjedési területe (Kozyrenko *et al.*, 2011).

3.1.5. Hatóanyagai

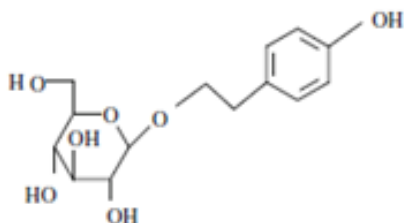
A *Rhodiola rosea* gyökere és rizómája többféle gyógyászatilag aktív másodlagos anyagsere terméket halmoz fel. Ezek különböző kémia csoportokba sorolhatók úgy, mint glikozidok, flavonoidok, terpenoidok, fenolsavak, kumarinok, laktonok (Mirmazloum és György, 2012).

Megfigyelések szerint a hatóanyagtartalom és -összetétel nagymértékben függ az adott populáció származási helyétől (Tasheva és Kosturkova, 2012). Egy bulgáriai felmérés szerint a Rila-hegységből származó gyökér minták szalidrozyd tartalma a legmagasabb a bulgáriai populációk közül (1,55 %), a legalacsonyabb szalidrozyd tartalmat pedig a Pirin-hegységből gyűjtött gyökök esetében mérték (0,72 %) (Revina és Evstatieva idézte Tashaeva és Kosturkova, 2012). Malnoe és munkatársai (2009) ennél is nagyobb heterogenitást találtak öt svájci populációból (Mattmark, Binntal, Unteralp, Piano dei Canali, Val de Nomnom) gyűjtött 93 egyed rizómájának vizsgálata során. 2006-ban az öt populáció átlagos szalidrozyd tartalma 1,49 % volt. A legalacsonyabb értékeket az unteralpi növények produkálták (0,66 %), a legnagyobb átlagos szalidrozyd tartalom a mattmarki egyedekre volt jellemző (2,51 %). A kettő közötti különbség majdnem négyszeres. A mattmarki és binntali populációkból 2007-ben is mintákat vettek. A mattmarki populációban átlagosan 3,27 %-os szalidrozyd tartalmat regisztráltak, olyan egyedet is találtak, ahol a rizóma szalidrozyd tartalma az 5 %-ot is meghaladta (5,02 %). Ezek az értékek az előző évi kiugróan magas eredményekhez képest is jelentős növekedést mutatnak. A binntali növények szalidrozyd tartalmában nem volt változás. Kimutatták azt is, hogy az azonos élőhelyről származó porzós és termős egyedek szalidrozyd tartalma között nincs jelentős különbség.

A *Rhodiola rosea* két legfontosabb hatóanyaga a szalidrozyd és a rozavinek, főként ezeknek tulajdonítják a gyógyhatását (Furmanova *et al.*, 1995). A szalidrozyd a *Rhodiola* nemzetség több fájában is megtalálható, például a *Rhodiola sachaliensis*-ben is (Zhang *et al.*, 2011). Ebből következik, hogy a szalidrozyd nem megfelelő a különböző *Rhodiola* fajok elkülönítésére, sem a *Rhodiola rosea* kivonatok hitelesítésére. A szalidroziddal szemben a rozavinek csak a *rosea*-ban vannak jelen, így ezek kémiai markerként alkalmazhatóak. A klinikai kísérleteknél használt kivonatokban a szalidrozyd és a rozavin tartalmat 3:1 arányban szokták beállítani, mert a *Rhodiola rosea* rizómájában természetes módon is ilyen arányban halmozódnak fel (Brown *et al.*, 2002, Khanum *et al.*, 2005).

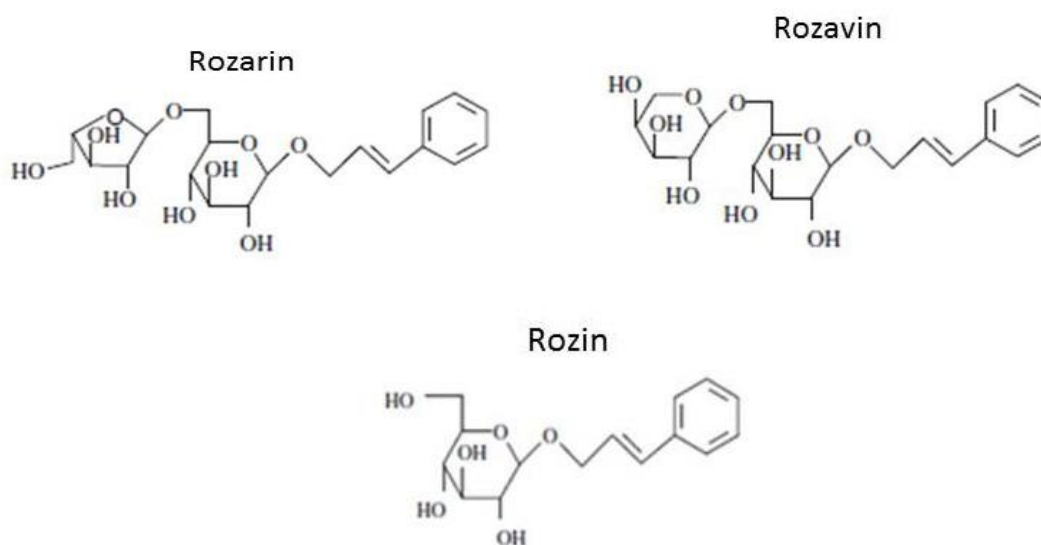
Kezdetben a fenolglukozid rodolozidnak és a p-tirozolnak tulajdonították a növény adaptogén hatását. A rodolozidról később kiderült, hogy szerkezetileg azonos a

szalidrozzal (4. ábra) (Kelly, 2001), ami a tirozol 8-O- β -D-glikozidja (Kurkin *et al.*, 1984). A szalidrozzid neve a *Salix* nemzetség nevére utal, mert Brigel és Beguin 1926-ban *Salix triandra*-ból izolálta (idézte Brown *et al.*, 2002). Később más növényekben is megtalálták ezt a vegyületet, például *Olea europea*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Rhododendron ponticum* $\times$ *catawbiense*, *Syringa vulgaris* és *Phillyrea latifolia* fajokban (Mirmazloum és György, 2012). A rózsagyökér esetében főként a földalatti szervekben (gyökér és rizóma) halmozódik fel.



4. ábra. A szalidrozzid kémiai szerkezete (Panossian *et al.*, 2010).

A növényben található három legfontosabb fenilpropanoid glikozidot Zapesochnaya és Kurkin fedezte fel a nyolcvanas évek elején. Ezek a rozin, a rozavin és a rozarin, együttesen rozavinek (5. ábra). Mindhármát a fahéjalkohol glikozidjaként azonosították (Zapesochnaya és Kurkin, 1983). Egy finn tanulmány vizsgálta a *Rhodiola rosea* gyökerek rozavin tartalmát. Eszerint az élő gyökerek 2,03 %-ban tartalmazták a rozavineket három észak-lappföldi populációban. A legnagyobb arányban a rozavin halmozódott fel (1,37 %), kisebb mennyiséget mértek a rozarinból (0,43 %), a legkevesebbet pedig rozinból (0,22 %) találtak (Galambosi *et al.*, 2007).



5. ábra. Rozarin, rozavin, és rozin kémiai szerkezete (Panossian *et al.*, 2010).

Kurkin és munkatársai publikálták a *Rhodiola rosea* flavonoid tartalmát bizonyító első kutatásokat a nyolcvanas évek közepén (Kurkin *et al.*, 1984), eredményeik szerint legfontosabbak a rodilin, a rodionin, a rodiozin, az acetilrodalgin, és a tricin.

Ugyancsak Kurkin és munkatársai írtak elsőként a *Rhodiola rosea* terpén szerkezetű vegyületeiről, amiket a flavonoidok kutatása közben azonosítottak (idézte Mirmazloum és György, 2012). Monoterpének közé tartozik a roziridol és a rozaridin, míg a triterpének közé tartozik a daukoszterol és a β -szitoszterol (Brown *et al.* 2002). Rohloff 2001-ben vizsgálta a *Rhodiola rosea* szárított rizómájának illóolaj tartalmát. Az eredményei alapján a szárított rizóma 0,05 % illóolajat tartalmaz. Sikerült 75 összetevőt azonosítani, amik közül a legnagyobb arányban dekanol, geraniol, 1,4-p-menthadien-7-ol, limonén, α -pinén és a dodekanol fordult elő.

A felsorolt anyagcseretermékek mellett említést kell még tennünk a *Rhodiola rosea*-ban található fenolsavakról, például a galluszsavról (Brown *et al.*, 2002), ezenkívül a kumarinokról, és a laktonokról (Furmanova *et al.*, 1995).

3.1.6. Farmakológiai hatás

A *Rhodiola rosea* a modern orvostudományban adaptogén növényként ismert. Lazarov 1947-es megállapítása szerint ezek a növények ellensúlyozzák a fizikai, kémiai és biológiai stressz hatásokat nem specifikus rezisztencia kialakításával. Ezt az állítást fejlesztette tovább 1969-ben Brekhman és Dardymov, amikor meghatározták az adaptogén növény három kritériumát:

- 1) Egy adaptogén növény semmiféle kárt nem okozhat a szervezetben, és csak minimális zavart kelthet az élettani funkciókban.
- 2) Az általa kiváltott hatásnak nem-specifikusnak kell lennie. Növelnie kell az ellenállást a kedvezőtlen fizikai, kémiai és biológiai hatások széles tartományával szemben.
- 3) Rendelkeznie kell normalizáló hatással, függetlenül a megelőzendő kóros változások irányától. Ha a testet jellemző valamilyen paraméter értéke magasabb, mint a normális, lecsorítja a megfelelő mértékben, míg ha valamely paraméter alacsonyabb az egészségesnél, akkor megemeli azt a kellő mennyiségben (Kelly, 2001).

A *Rhodiola rosea* mellett a legismertebb bizonyítottan adaptogén hatású növények az *Eleutherococcus senticosus*, a *Schizandra chinensis* és a *Panax ginseng* (Molinos, 2013).

A *Rhodiola rosea* klinikai vizsgálatainál mind embereknél, mind állatoknál a növény gyökerének és rizómájának alkoholos-vizes kivonatát használták (Kucinskaite *et al.*, 2004). A klinikai tapasztalatok rendkívül sok jótékony hatásról számolnak be. Adaptogén hatásai közül

legfontosabbak a központi idegrendszerre, szívre, agyra, immunrendszerre gyakorolt pozitív hatásai, de mindenképpen meg kell említenünk a rák elleni, regeneráló, és antidepresszáns, hatását is.

A rózsagyökér kivonat serkenti a központi idegrendszer működését az olyan biogén monoaminok termelésének fokozásával, mint a szerotonin vagy a dopamin (Kurkin és Zapesochneya, 1986). Jótékonyan hat a hosszú távú memóriára és a koncentrációs képességre (Furmanova *et al.*, 1999). Ezt a hatását bizonyította később Perfumi és Mattioli (2007) is. Cao és munkatársai (2005, 2006) megállapították, hogy megvédi a tenyésztett idegsejteket a nátrium-azid és a glutamát okozta sérülésektől.

Kimutatták, hogy mérsékli a szív- és érrendszer stressz által kiváltott károsodását (Kelly, 2001). Lishmanov és munkatársai (1993) feltételezték, hogy jelentős anti-arrithmiás hatása összefüggésben van az opioid peptidek bioszintézisével. Ugyancsak Lishmanov és munkatársai (1997) írták egy későbbi közleményükben, hogy a *Rhodiola rosea* kivonat javítja a szívkoszorúér rugalmasságát. Wang és munkatársai (2009) kísérlete szerint a rózsagyökér kivonat rendelkezik antivirális aktivitással a Cocksackie B vírussal szemben, ezért szerintük alkalmazható lenne a vírusos szívizomgyulladás kezelésére. Zhang és munkatársai (2009) eredményeik alapján arra következtettek, hogy megvédi a szívizomsejteket az oxigénhiányos állapot okozta apoptózistól és nekrozistól.

Saratikov és munkatársai (1968) tapasztalták, hogy normalizálja a stressz miatt megemelkedett vagy lecsökkent glükóz szintet a vérben. Darbinyan és munkatársai (2007) kutatásuk során arra jutottak, hogy a rózsagyökér kivonat megfelelő mennyiségben alkalmazva potenciális antidepresszáns. Hatására hosszantartó, megerőltető izommunka után gyorsabban regenerálódik a szervezet (Furmanova *et al.*, 1999). Szerepe lehet a rák elleni küzdelemben, a rákos sejtek szaporodását lassítja (Bocharova *et al.*, 1995).

Az említett hatásain kívül pozitív eredmények igazolják az immunrendszer ellenálló képességét növelő, magashegyi betegséget megelőző és szexuális diszfunkciókat javító hatását is (Brown *et al.*, 2002).

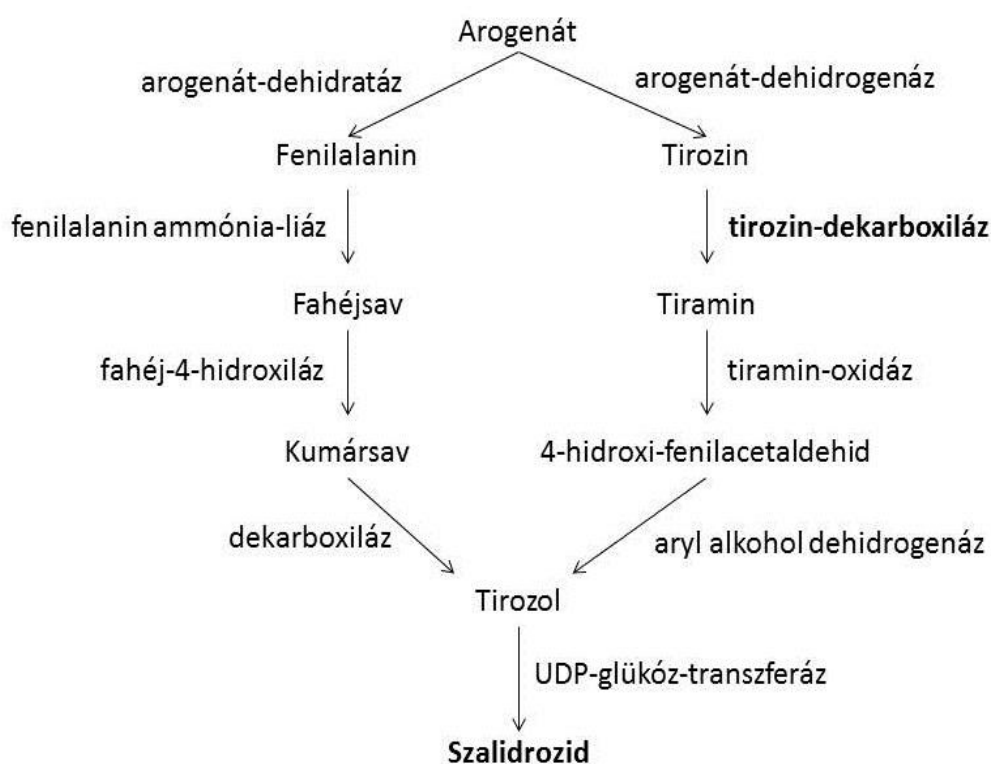
3.1.7. Szalidroizid bioszintézis

A szalidroizid bioszintézisének elméletben két útja létezik, melyeket a 6. ábrán mutatunk be (Mirmazloum és György 2012).

Az egyik elképzelés szerint az arogenátot az arogenát-dehidrogenáz enzim tirozinná alakítja. Az így létrejött tirozint a tirozin-dekarboxiláz enzim tiraminná redukálja. A tiramint a tiramin-oxidáz enzim tovább oxidálja, ekkor 4-hidroxi-fenilacetaldehid jön létre. Ebből az

arilalkohol-dehidrogenáz enzim von el hidrogént, így létrejön a tirozol. Azt már mindenki elfogadja, hogy a szalidroزيد bioszintézis utolsó lépése a tirozol glikolizációja, amit az UDP-glükóz-transzferáz enzim katalizál (György, 2006).

A másik elképzelés szerint az arogenátból az arogenát dehidratáz enzim segítségével fenilalanin képződik vízkilépéssel. A fenilalanint a fenilalanin-ammónia-liáz enzim tovább alakítja fahéjsavvá. A fahéjsavhoz a fahéj-4-hidroxiláz enzim egy -OH csoportot kapcsol, így kumársav jön létre. A kumársav tirozollá redukálódását egy eddig ismeretlen dekarboxiláz aktivitású enzim katalizálja. A tirozol a már ismert úton az UDP-glükóz-transzferáz segítségével alakul szalidroزيدdá (Zhang *et al.*, 2011).



6. ábra. A szalidroزيد bioszintézis két lehetséges útvonala (Zhang *et al.*, 2011 után újrarajzolva)

Az először részletezett elképzelés kutatási adatokkal is alátámasztható. György és munkatársai (2009) vizsgálták a *tirozin-dekarboxiláz* gén aktivitását mind levélben, mind gyökérben egy nagy és egy kis szalidroزيدtartalmú *Rhodiola rosea* genotípus esetében. Eredményeik szerint a *tirozin-dekarboxiláz* gén a levélben és a gyökérben is expresszálódik, habár a gyökérben sokkal jelentősebb mértékben. Ez alátámasztja a mérési tapasztalatokat, amik szerint a földalatti részekben halmozódik fel nagy mennyiségben a szalidroزيد. Az

expresszállódás mértéke a nagy és kis szalidrozidtartamú genotípusok között eltért, a nagy termelékenységű vonalak javára. Következtetésként levonták, hogy a tirozin-dekarboxiláz enzimnek döntő szerepe van a szalidrozid bioszintézisben.

Ma és munkatársai (2007) izoláltak *Rhodiola sachalinensis*-ből egy vélt UDP-glükóziltranszferáz cDNS-t, aminek az UGT73B6 nevet adták. Az izolált cDNS hossza 1598 bp volt, ami 480 aminosavat kódolt és tartalmazott egy konzervált UDP-glükóz-kötött domént. A genomi DNS Southern blot technikával való vizsgálata után megállapították, hogy egy egy kópiás génről van szó. Northern blot technika segítségével megállapították, hogy az UGT73B6 transzkriptumai megtalálhatóak a gyökerekben, szárban és a kalluszban, de nem találhatóak meg a levelekben. A 35S promóterrel, és a kifejeződés sebességét kétszeresére gyorsító fragmentumokkal ellátott UGT73B6-os gént az *Agrobacterium tumefaciens* segítségével transzformálták *Rhodiola sachalinensis*-be. PCR-rel és Southern-blot technikával kimutatták, hogy a módosított gén beépült a növény és a kallusz genomjába is. Northern-blot technika segítségével megállapították, hogy a beépült transzgénről transzkriptum is képződik. Ezután HPLC vizsgálatot végeztek, ami megmutatta, hogy a beépített transzgén túlexpresszállása a szalidrozid tartalom jelentős növekedését eredményezi. Az eredményekből következtetésként levonták, hogy a tirozol szalidroziddá alakítása szabályozható az UGT73B6-os génnel. Ez volt az első klónozott glükóziltranszferáz-függő szalidrozid bioszintézis. Megállapították azt is, hogy az UGT73B6-os gén expressziója alig detektálható a levelekben normál növekedésnél, ennek ellenére minimális szalidrozid tartalma volt a leveleknek. Ebből arra következtettek, hogy a *Rhodiola sachalinensis*-ben más aktív UDP-k is létezhetnek.

Yu és munkatársai (2011) további két vélt UDP-glükóziltranszferáz cDNS-t izoláltak *Rhodiola sachalinensis* gyökérből és metil-jázmonáttal kezelt sejt kultúrákból (UGT72B14 és UGT74R1). Northern blot technika segítségével megállapították, hogy az UGT72B14 transzkriptumai a gyökérben nagy mennyiségben vannak jelen. Ezzel szemben az UGT74R1 kalluszban expresszállódik, a gyökérben nagyon alacsony a transzkriptumainak a szintje. A *Rhodiola* termesztés és a kémiai szintézis együttesen is csak korlátozott mennyiségű szalidrozid előállítását teszi lehetővé (Ma *et al.*, 2007) Ezt a problémát sikerült kiküszöbölni kínai kutatóknak (Bai *et al.*, 2014) egy új „kombinációs” szalidrozid bioszintézis út kidolgozásával. Az *Escherichia coli* baktériumban sikerült szalidrozidot előállítaniuk. Elsőként a tirozolit tervezték meg a bioszintézis utat. Az *Escherichia coli* baktériumban megtalálható a 4-hidroxifenilpiruvát, a tirozol bioszintézisének egyik intermediere. Ennek a vegyületnek a továbbalakítására építették be a *Saccharomyces cerevisiae* ARO10-es piruvát-

dekarboxiláz génjét, ami 4-hidroxifenilacetaldehidé alakítja a 4-hidroxifenilpiruvátot. A 4-hidroxifenilacetaldehid-et az *Escherichia coli* különböző alkohol-dehidrogenázai oxidálják tirozollá. Később a tirozol termelést fokozták egyfelől a bioszintézis útban résztvevő gének túlexpresszáálásával, másfelől a kompetitív utak és a visszacsatolós gátlás kiiktatásával. Utolsó lépésként a *Rhodiola sachaliensis* glikoziltranszferáz aktivitást mutató UGT73B6-os génjéről expresszáladott fehérje tirozolból szalidrozidot állított elő. A hozam 56,9 mg/L szalidrozid volt.

3.1.8. Tirozin-dekarboxiláz gén

A tirozin-dekarboxiláz enzim által katalizált tirozin dekarboxilációja feltételezhetően a növények birodalmának egészére jellemző folyamat. Ezen felül a TyrDC enzim létfontosságú szerepet játszik több másodlagos anyagcsere útban (Lehmann és Pollmann, 2009). A tirozin-dekarboxiláz enzimet az E4.1.1.25-ös kódszám alatt találjuk meg a KEGG adatbázisban. A gén és fehérje nevének többféle rövidítése is elfogadott (TyrDC/TYDC), mindenhol átvettük az éppen idézett cikkben használt jelölést.

A dekarboxilálást végző tirozin-dekarboxiláz enzim az L-aminosav dekarboxilázok közé tartozik (Facchini *et al.*, 2000). Facchini és munkatársai (1998) feltételezése szerint minden növényben a tirozin szolgáltatja a prekuzort a patogének támadásakor önvédelmi válaszként kialakuló anyagcsere termékekhez. A tiraminból és különböző hidroxifahéjsav származékokból szintetizálódnak a sejtfalba beépülő és azt megerősítő aminok (Negrel és Martin, 1984; Negrel *et al.* 1995). Facchini és munkatársai (1998) feltételezését bizonyítja, hogy a TYDC mRNS felhalmozódik olyan fajokban, amelyek nem halmoznak fel tirozinból származtatott alkaloidokat, mint a petrezselyem vagy a lúdfű. Nagy érdeklődés övezi azért is, mert a farmakológiai szempontból fontos monoterpén indol alkaloidok illetve a benzilizokinolin alkaloidok bioszintézisében kritikus szerepet játszik (Facchini *et al.*, 2000). Szerepe van a *Syringa vulgaris* esetén a hidroxifeniletanol és verbaszkozid (Ellis, 1983), *Hordeum vulgare* esetén az egyszerű alkaloid fitoalexin és hordinin bioszintézisében (Leete és Marion, idézte Facchini *et al.*, 2000). A benzilizokinolin alkaloidokat tekintve részt vesz többek között a *Papaver somniferum* morfin, kodenin és papaverin, a *Colchicum autumnale* kolchicin vagy a *Chondodenron tomentosum* tubokurarin hatóanyagának bioszintézisében (Facchini *et al.*, 2000).

Régóta folynak kutatások a TyrDC géncsaláddal kapcsolatban különböző növényekben. Kawalleck és munkatársai (1993) számoltak be arról, hogy sikerült 4 TyrDC gént azonosítaniuk petrezselyemben. Ezekről a génekről gombás fertőzés hatására nagyon

gyorsan, nagy mennyiségben képződtek mRNS-ek majd fehérjék, de csak átmenetileg. Arról is írtak, hogy ezek közül a fehérjék közül legalább három izoenzim. Marques és Brodelius (1988) bizonyította, hogy a petrezselyem esetében a tirozin-dekarboxiláz enzim elfogadja a tirozint és kisebb mértékben az L-DOPA-t, de nem fogadja el a triptofánt és a fenilalanint szubsztrátként.

Landtag és munkatársai 2002-ben a petrezselyem *TyrDC*-2-es génjét *Agrobacterium tumefaciens* segítségével beépítették burgonya növénybe. Patogénnel való kezelésre való válaszként a petrezselyem reakciójához hasonlót vártak, vagyis nagy mennyiségű tiramin képződését. A tiraminnak a továbbiakban a sejtfalba beépülő és azt megerősítő anyagokká kellett volna alakulnia. A várt hatás azonban elmaradt, sem a tiramin, sem a sejtfalat megerősítő származékai nem halmozódtak fel nagyobb mennyiségben, viszont új oldott anyagok jelentek meg a sejtekben. Fő alkotóelemként a tirozin-glikozidot, más néven szalidrozidot azonosították, amit ezelőtt soha nem találtak burgonyában. Ebből egyfelől arra következtettek, hogy a tirozin-dekarboxiláz enzim más anyagcsere utat katalizál a burgonyában, mint a petrezselyemben, másfelől pedig arra, hogy az enzimnek fontos szerepe van a szalidrozid bioszintézisben.

Facchini és De Luca (1994) azonosított 4 *TYDC* gént mák estében. Feltételezésük szerint a mákban - a petrezselyemmel ellentétben - a *TYDC* géncsoport legalább 10-14 gént tartalmaz. Szekvencia hasonlóság alapján az azonosított géneket két alosztályba sorolták. A mákból izolált aromás aminosav dekarboxilázok voltak az első enzimek növények esetében, amik szubsztrátként előnyben részesítették az L-DOPA-t a tirozinnal szemben. Viszont a petrezselyem tirozin-dekarboxiláz enzimeihez hasonlóan a mákban felfedezettek sem fogadják el a triptofánt és a fenilalanint szubsztrátként. A legmagasabb állandó *TyrDC* transzkriptum szintet a kifejlett növényekben a gyökérben és a szárban regisztrálták.

Maldonado-Mendoza és munkatársai 1996-ban felfedezték egy új tagját a mák *tirozin-dekarboxiláz* géncsaládjának, a *TyDC5*-öt. Ez a gén nagyfokú hasonlóságot mutat a Facchini és De Luca (1994) által felfedezett *TyDC1*-es génnel, ezért feltételezték, hogy egy génalcsaládba tartoznak. Ennél a fehérjénél is megállapították, hogy szubsztrátként főként a tirozint és kisebb mértékben az L-DOPA-t fogadja el. A kifejlett növények esetében főként a gyökérben expresszálódik. Felfedezték, hogy a csírázás folyamán is van egy maximuma az expresszálódásnak, pontosan a gyököcske megjelenésével egy időben. Ezzel megegyező eredményeket regisztráltak transzgenikus dohány esetében, ha a *TyDC5*-ös promóterét kapcsolták a β -glükuronidáz riporter génhez (GUS). Arra következtettek, hogy a *TyDC5*-ös

gén expresszáldása transzkripcionálisan szabályzott, és fontos szerepet játszik az mák gyökerének és csírázó magjának alkaloid szintézisének prekursor ellátásában.

Trezzini és munkatársai (1993) állapították meg az előzőleg petrezselyemből Somssich és munkatársai (1989) által izolált *ELI* 5-ös gén tirozin-dekarboxiláz funkcióját. A megállapítást követően felfedezték az *ELI* 5-ös gén *Arabidopsis thaliana*-ban meglévő változatát. A lúdfű nem halmoz fel a tirozin dekarboxilációjából származó alkaloidokat, így ez az eredmény is bizonyította, hogy nem csak az alkaloidok bioszintézisében játszik szerepet a TYDC enzim (Facchini *et al.*, 2000). Lehmannnak és Pollmannak (2009) sikerült újabb *TyrDC* gént felfedeznie az *Arabidopsis thaliana*-ban. A TyrDC mRNS mennyisége szárazság stressz, sebzés, és legjelentősebb mértékben sóstressz hatására nőtt meg. Megállapították, hogy a felfedezett génről expresszáldó fehérje csak a tirozint fogadja el szubsztrátként. Elsőként prezentáltak tudományos bizonyítékot a TyrDC citoplazmikus elhelyezkedésére és az enzim tetramer-formációjára vonatkozóan.

Zhang és munkatársai (2011) egy tirozin-dekarboxilázt kódoló cDNS-t azonosítottak *Rhodiola sachalinensis*-ből. Az eredményként kapott cDNS-t a *RsTyrDC* jelöléssel látták el. Northern-blot technika segítségével megállapították, hogy a növényen belül főként a gyökerekben vannak jelen az erről a génről átíródott RNS-ek, emellett kallusz kultúrában is magas transzkriptum szintet regisztráltak. Eredményeik szerint a rekombináns *RsTyrDC*-nak a tirozin a legjobb szubsztrátja. Az *RsTyrDC* túlexpresszáldásával jelentősen megnőtt a tirozol és a szalidrozyd tartalom. Következtetésként levonták, hogy az *RsTyrDC* tudja szabályozni a tirozol és szalidrozyd bioszintézist, valószínűleg fontos szerepe van a szalidrozyd bioszintézis út kezdeti szakaszában.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Növényanyag

A növényanyag a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszéken található *Rhodiola rosea* génbankból származik. Összesen 28 populációt vizsgáltunk, amik 11 ország területéről származtak. Minden populációból 1-8 egyedet emeltünk ki. A földrajzi elhelyezkedésüket és jelölésüket a 1. táblázat foglalja össze.

4.2. DNS kivonás

A DNS minták nagy részét a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszék által létrehozott génbank biztosította, de néhány mintából a Pirttilä és munkatársai által 2001-ben kidolgozott protokoll szerint újra ki vontuk a DNS-t.

4.3. PCR vizsgálat

A PCR vizsgálathoz a primereket a BCE Genetika és Növénynevelés Tanszéken folyó kutatás eredményei alapján terveztük a *Rhodiola rosea*-ból izolált TyrDC gén teljes ORF-jének elejére és végére. A forward primer szekvenciája 5'-ATGGGCAGCTTGTCTTC-3' míg a reverz primer szekvenciája 5'-CTAAGACACGATGCTTTGAG-3' volt.

A PCR-t 25 µl végtérfogatban mértük össze; a PCR mix tartalmazott kb. 20-80 ng DNS-t, 10 × PCR puffert, 0,2 mM dNTP-t, 0,4 µM-t az adott primerekből és 0,5 U DreamTaq DNS-polimerázt (Fermentas, Szeged, Magyarország). A reakciót Swift™ MaxPro (Esco Micro Pte. Csértex, Budapest, Magyarország) típusú készülékben végeztük az 2. táblázatban látható hőmérsékleti profilt használva.

1. táblázat. A vizsgálatba vont növényanyag jelölései és származási helyei.

Minta kódja	Származási helye	Ország
CP5	Grau Roig - Pireneusok	Andorra
VI4	Juclar - Pireneusok	Andorra
HK1; HK4; HKR	Hochkar - Alpok	Ausztria
P40; P5; P55; P30; P75; P80; P100	Präbichl - Alpok	Ausztria
Z13	Zirbitzkogel - Alpok	Ausztria
AA6	Ala Archa	Kirgizisztán
W6	Snowdonia - Wales	Nagy-Britannia
1/31	É-Skandivánia	Norvégia
N2/182	É-Skandinávia	Norvégia
CB1	Col Bricon - Dolomitok	Olaszország
E12	Erdemolo - Dolomitok	Olaszország
F14; F15; F2; F5	Fedaiasee - Dolomitok	Olaszország
PG1; PG12; PG14; PG17; PG18	Passo Gavia - Dolomitok	Olaszország
To4	Tonale - Dolomitok	Olaszország
V6F; V8F	Val Fredda - Dolomitok	Olaszország
U4/4	Novaya Zemlja	Oroszország
V11; V16	Kola-félsziget	Oroszország
Fog4	Fogarasi-havasok - Kárpátok	Románia
Ke4	Kelemen-havasok - Kárpátok	Románia
B6; B8	Binntal - Alpok	Svájc
M1; M10; M13	Mattmark - Alpok	Svájc
N1; N10; N13; N4	Val de Nomnom - Alpok	Svájc
P12; P2; P6	Piano dei Canali - Alpok	Svájc
Ua2	Unteralp - Alpok	Svájc
CHP1; CHP10; CHP12; CHP2; CHP21; CHP23; CHP4; CHP7	Chopok, Alacsony-Tátra	Szlovákia
Lo6	Lominici-csúcs - Kárpátok	Szlovákia
MD13; MD19; MD26; MD3	Mengus-völgy - Kárpátok	Szlovákia
S11; S18; S2	Triglav - Alpok	Szlovénia

2. táblázat. A DreamTaq polimeráznál alkalmazott PCR program hőmérsékleti profilja.

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusok száma
1. Elődenaturáció	94	5	1
2. Denaturáció	94	1	
3. Primerek kötődése	53	1,5	30
4. Lánchosszabbítás	72	1,5	
5. Extra lánchosszabbítás	72	5	1
6. Lehűtés	4	∞	

Mivel célunk a szekvenciák lehetséges eltéréseinek detektálása volt ezért hibajavító aktivitással rendelkező polimeráz enzimmel is összemértük a reakciókat. Ehhez a Phusion High Fidelity PCR Master Mix-et (Thermo Scientific, Biocenter, Magyarország) használtuk. A 30 µl végtérfogatban összemért PCR 15 µl 2x Phusion MasterMix-et, 0,2 µM primer-t, 20-80 ng DNS-t tartalmazott. A reakciót a DreamTaq-os PCR-hez hasonlóan az Swift™ MaxPro (Esco Micro Pte. Csertex, Budapest, Magyarország) készülékben végeztük (3. táblázat).

3. táblázat. A Phusion polimeráz esetén alkalmazott PCR program hőmérsékleti profilja.

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Idő (másodperc)	Ciklusok száma
1. Elődenaturáció	98	30	1
2. Denaturáció	98	5	
3. Primerek kötődése	56	10	25
4. Lánchosszabbítás	72	25	
5. Extra lánchosszabbítás	72	180	1
6. Lehűtés	4	∞	

A PCR-termékeket 1 %-os TBE agaróz gélben választottuk szét (20 min, 80 V) és etidium-bromidos festéssel, UV-fénnyel átvilágítva tettük láthatóvá. A fragmentumok méretének megállapításához Gene Ruler 1 kb-t (Thermo Scientific, Biocenter, Magyarország) használtunk.

4.4. SSCP

4.4.1. Az SSCP gél öntésének és előhívásának folyamata

Az SSCP gél összetevőit az 4. táblázatban ábrázoltam. Az akrilamid, 10x TBE és desztillált víz oldatot szűrőpapír (Schleicher és Schnell, Németország) segítségével leszűrtük, majd egyszerre adtuk hozzá a 354,3 µl ammónium-peroxo-diszulfát-ot és 148,6 µl tetrametil-etilén-diamin-t. Ezt az oldatot gyorsan két üveglap közé öntöttük, amik egy fólia tasakban álltak. 30 perc alatt polimerizálódott a gél. Ezután a fólia tasakot levettük az üveglapokról, a széleit megtisztítottuk és behelyeztük az elektroforézis készülékbe (Bio-Rad Magyarország Kft.). A készüléket pufferrel a megfelelő mértékben feltöltöttük, majd 30 percen keresztül előfuttattuk 4°C-os hideg szobában. Ez alatt 15 µl PCR-terméket és a hozzáadott azonos mennyiségű FDE festéket valamint az 5 µl Gene Ruler 1kb-t (Thermo Scientific, Biocenter, Magyarország) és a hozzáadott 5 µl FDE-t 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd azonnal jégre helyeztük. A denaturálás után a mintákat pipetta segítségével felvittük a gélre. Több futási időt (30-35-40 h) és elektromos feszültséget (200-300 V) is kipróbáltunk.

4. táblázat. A natív akrilamid gél összetevői.

Összetevők	Mennyiség
Akril-amid (29:1, 40%-os)	20,57 ml
10x TBE	3,43 ml
desztillált víz	56,43 ml
APS (100 mg/ml)	354,3 µl
TEMED	148,6 µl

A futtatás után a gélen ezüsfestéssel tettük láthatóvá az egyszálú DNS fragmentumokat. Az ehhez alkalmazott oldatokat, alkalmazási módjukat és azoknak az idejét az 5. táblázatban ismertetjük. Az előhívott akrilamid gél két négyzet alakú 12%-os glicerolba áztatott celofán lap közé tettük, majd 48 órán keresztül kifeszítve, szobahőmérsékleten szárítottuk.

5. táblázat. Az SSCP gél előhívásának lépései.

Lépések	Időtartam
1. áztatás 10%-os etanolban	20 perc
2. áztatás 1%-os salétromsavban	5 perc
3. mosás kétszer desztillált vízzel	10 másodperc
4. áztatás 0,2%-os ezüst-nitrát oldatban	30 perc
5. mosás kétszer desztillált vízzel	10 másodperc
6. áztatás előhívó oldatban (30 g nátrium-karbonát, 0,7 ml formaldehid, 1000 ml desztillált víz)	5 perc
7. áztatás 5 %-os esetsav oldatban (STOP-oldat)	30 másodperc
8. mosás kétszer desztillált vízzel	1 perc

4.4.2. Az SSCP gél értékelése

A celofánlapok között megszáritott akrilamid gélre fólialapokat tettünk, ezekre alkoholos filctollak segítségével átmásoltuk a szabad szemmel jól látható ssDNS-eket, amiket az abc különböző betűivel jelöltük. A fólialapok segítségével össze tudtuk hasonlítani az 5 akrilamid gél, így pontosan meghatároztuk az egy pozícióban lévő ssDNS szakaszokat. A fólialapokon megállapított betűket bevittük MS Excell táblázatba és ott tovább elemeztük őket. Egy haplotípusnak tekintettük az azonos fragmentum kombinációval jellemzett mintákat.

4.5. Ligálás, klónozás

4.5.1. Ligálás

A ligálás szobahőmérsékleten 5 perc alatt 20 µl végtérfogatban történt: 20–50 ng PCR-termék (1 µl), 5 U T4 DNS-ligáz, 50 ng pJET 1.2/blunt Vector, 2x puffer (Thermo Scientific, Biocenter, Magyarország) hozzáadásával, desztillált vízzel kiegészítve.

4.5.2. Transzformálás

A klónozott fragmentumokkal DH5α kompetens sejteket transzformáltunk. A ligációs elegyből 7 µl-t 50 µl –70°C-on tárolt kompetens baktérium-szuszpenzióval elegyítettünk, majd 20 percen át jégen tartottuk, azután 50 másodpercig 42°C-os termosztátban sokkoltuk, és

azonnal jégre tettük 2 percre. 400 µl 37°C-os folyékony, antibiotikum mentes LB táptalajt (6. táblázat) adtunk hozzá, és 30 percig ráztuk 37°C-on, 150 rpm fordulatszámmal. Ezután 80 µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk ampicillin-tartalmú LB szilárd táptalajra. A szélesztett baktériumokat fejfelé 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

6. táblázat Az LB táptalaj összetétele.

Összetevők	Mennyiség
Bacto-tripton	10 g/l
Bacto-élesztőkivonat	5 g/l
NaCl	10 g/l
agar	7 g/l
ampicillin pH=7	100 µg/ml

Az alkalmazott plazmid felépítése miatt elvileg minden kinőtt baktérium telep tartalmazza az inzertet. A ligálás és transzformálás sikerességét kolónia PCR-rel ellenőriztük. Minden plate-ről több különálló telepet oltottunk le steril pipettahegy segítségével, melyet először egy masterplate-hez érintettünk, majd a PCR mixbe áztattuk. A kolónia PCR mixet 10 µl végtérfogatban mértük össze, ami 1 µl 10x puffert, 1 µl MgCl₂-t, 0,1 µl dNTP-t, 0,2-0,2 µl forward (pJET 1.2/blunt Vector F) és a reverz (pJET 1.2/blunt Vector R) primert, 0,05 µl Taq polimeráz enzimet (Fermentas, Szeged, Magyarország) és 7,45 µl desztillált vizet tartalmazott. A kolónia PCR hőmérsékleti profilját a 7. táblázatban ábrázoltuk.

7. táblázat. A kolónia PCR-nél alkalmazott program hőmérsékleti profilja.

Folyamat	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)	Ciklusok száma
1. Elődenaturáció	95	3	1
2. Denaturáció	94	0,5	
3. Primerek kötődése	60	0,5	30
4. Lánchosszabbítás	72	2	
5. Extra lánchosszabbítás	72	5	1
6. Lehűtés	4	∞	

A reakció után 1 %-os etídium-bromiddal festett TBE agaróz gélen ellenőriztük a transzformáció sikerességét. A pozitív telepek közül 3-3-at 2 ml folyékony ampicillin-tartalmú LB táptalajban szaporítottuk fel egy éjszakán át 37°C-on 250 rpm fordulaton rázatva. A masterplate-en az eredeti telepeket szaporítottuk fel egy éjszakán át 37°C-on.

A plazmidokat az EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Kit-tel (Biocenter, Szeged, Magyarország) izoláltuk, majd NanoDrop készülékkel (Bioscience, Budapest, Magyarország) ellenőriztük a koncentrációjukat.

4.5.3. Szekvenálás

Szekvenciájuk meghatározása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) automata DNS-szekvenátorral történt az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Baygen Genomikai Egységében.

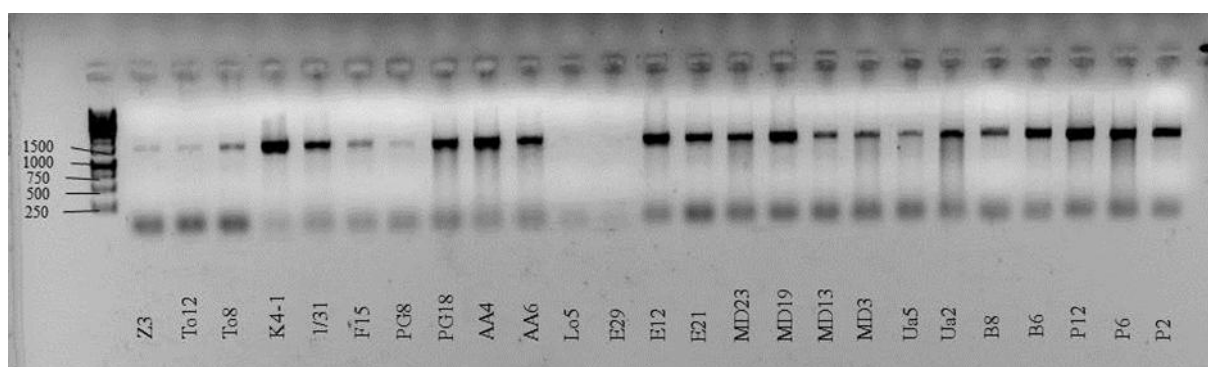
4.5.4. Szekvenciák bioinformatikai vizsgálata

Letöltöttük az NCBI génbanki adatbázisból az összes elérhető növényi *tirozin-dekarboxiláz* szekvenciát. Összevetettük őket, hogy lássuk a hasonlóságuk mértékét. A szekvenciák egymáshoz való illesztéséhez a BioEdit v.7.0.9.0 programban (Hall, 1999) integrált ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) algoritmust, illetve a MEGA 6 szoftvert (Tamura *et al.*, 2013). Az azonossági mátrix meghatározásához szintén a BioEdit v.7.0.9.0 programot alkalmaztuk. Saját szekvencia eredményeink elemzéséhez is a fenti programokat használtuk.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1. PCR

Összesen 142 DNS mintából próbáltuk PCR segítségével a *TyrDC* gént amplifikálni. A PCR-ek sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztünk. A mintáknak csak 66 %-ában, azaz 94 DNS minta esetén sikerült az amplifikáció. Ez valószínűleg a DNS kivonatok minőségével magyarázható (pl. a 7. ábrán bemutatott gélképen a Lo5 vagy E29 minták esetében nem történt meg az amplifikáció). Amint az a 7. ábrán is jól látszik azokban az esetekben ahol sikeres volt az amplifikáció, minden esetben a várt ~1500 bp-os fragmentumot kaptuk.

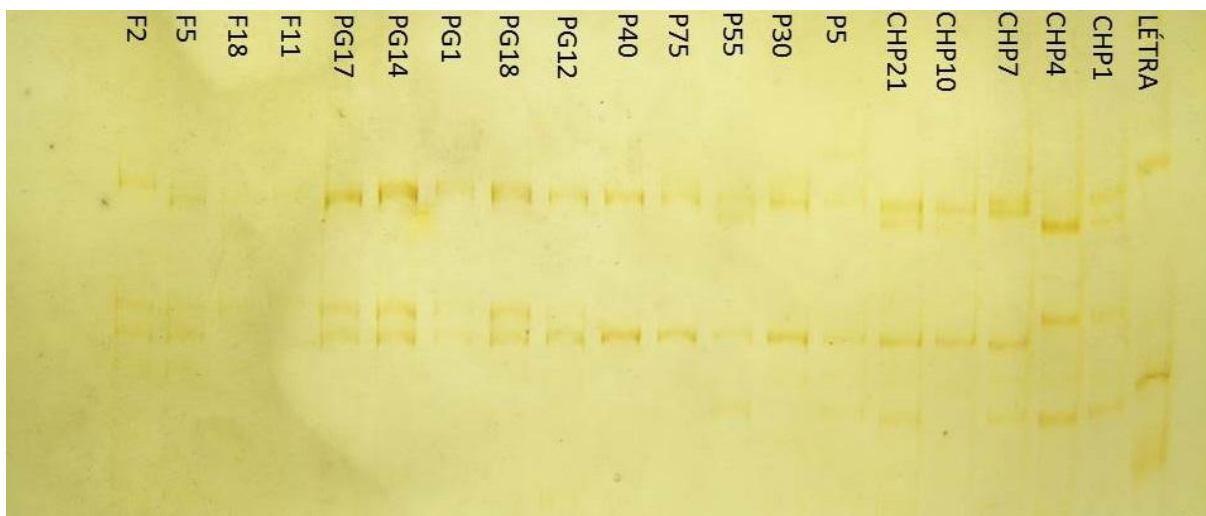


7. ábra. *Tirozin-dekarboxiláz* teljes ORF-re tervezett primerekkel amplifikált fragmentumok különböző termőhelyről származó *Rhodiola rosea* egyedekből 1 %-os TBE agaróz gélen.

5.2. SSCP

Az előkísérletek alapján az optimális elektromos feszültség / időtartam arányt, 300 V / 30 órában határoztuk meg. Csak az agaróz gélen sikeres amplifikációt mutató minták esetén végeztük el az elektroforézist az akrilamid gélen. Ennek ellenére is, a 94 db akrilamid gélre felvitt mintából, csak 65 db-ot tudtunk kiértékelni. A gélen megfigyelt DNS szakaszok száma 2 és 5 között váltakozott. A 65 értékelhető mintából 16-ról állapítottuk meg, hogy homozigóta, azaz a homológ kromoszómákon ugyanaz a szekvencia van jelen (2 csíkot láttunk a gélen). 21 db heterozigóta volt, azaz a két homológ kromoszómán eltérő szekvenciák voltak jelen (4 csíkot láttunk a gélen). Összesen 22 esetben 3 ssDNS-t regisztráltunk. Erre magyarázat lehet a felvitel előtti nem tökéletes denaturáció, vagy a nem elég hosszú futtatási idő, ami miatt az egyes DNS darabok nem tudtak egymástól elválni. Mivel 30 óras 300 V-on történő futtatás után kaptuk az első értékelhető géleket, így a későbbiekben, az összehasonlíthatóság érdekében, nem változtattunk ezeken az értékeken. Öt minta esetében 5 ssDNS-t azonosítottunk a gélen. Ez pszeudogének jelenlétére utalhat, de a pontos

magyarázathoz további kísérletekre van szükség. A 8. ábrán az egyik SSCP gél látható, megfigyelhető 2 csík (pl. P40), 3 csík (pl. F2, F5) és 4 csík is (pl. CHP1, CHP21).



8. ábra. *Tirozin-dekarboxiláz* teljes ORF-re tervezett primerekkel amplifikált fragmentumok különböző termőhelyről származó *Rhodiola rosea* egyedekből 8%-os natív akrilamid-gélen.

5.3. ADATÉRTÉKELÉS

Az adatokat értékeltük mintánként (8. táblázat) és fragmentumonként (9. táblázat) is, az egyes fragmentumokat az abc különböző betűivel jelöltük. A leggyakoribb fragmentumok a K (52 mintában), a J (52 mintában) és a C (30 mintában) voltak, a legritkébbakat pl: az I, az F, az S vagy az R fragmentumot csak egy-egy mintában regisztráltuk. Összesen 34 haplotípust tudtunk elkülöníteni (10. táblázat). A leggyakoribb haplotípusok az M, J, C, K, a J, C, K (10-10 mintában) és a J, K (9 mintában) fragmentumok kombinációi voltak. Ezzel szemben több haplotípus is csak 1 mintára volt jellemző, pl: a B, F, L, a B, C, vagy az A, W kombináció.

Néhány populáció esetében több egyed DNS-ét is megvizsgáltuk. Egyes populációkban csak egy féle fragmentum kombinációt regisztráltunk pl. az N, MD vagy a PG jelölésű populációkban. Ezzel szemben volt olyan populáció is, ahol több különböző kombinációt figyeltünk meg pl. a CHP, HK vagy az F jelölésű populációkban.

A 3.2.7-es pontban bemutatott Ma és munkatársai (2007) és Yu és munkatársai (2011) által publikált eredmények alapján a szalidroizid bioszintézis út más enzime (UDP-glükóziltranszferáz) esetén előfordul, hogy több génváltozat kódolja ugyanazt az enzimet és az egyes változatok más-más szövettípusokban expresszálnak. Ezek alapján lehetséges,

hogy a *tirozin-dekarboxiláz* génnek is vannak változatai, amelyek eltérő mértékben expresszálódnak különböző szövetekben illetve környezeti tényezők hatására.

8. táblázat. Az egyes mintákban regisztrált allélok.

Minta	Regisztrált allélok	Minta	Regisztrált allélok	Minta	Regisztrált allélok
1/31	B, F, L	HKR	M, K, O, L, R	P75	M, J, K
AA6	B, C	Ke4	M,L,N,O	P80	J, K
B6	M, J, C, K	Lo6	M,K,O	P100	M, K
B8	M, J, C, K	M1	J, C, K	PG1	M, J, C, K
CB1	J, C, K	M10	A, W	PG12	M, J, C, K
CHP1	A, B, C, D	M13	M, J, C, K	PG14	M, J, C, K
CHP2	J, K	MD3	J, K	PG17	M, J, C, K
CHP4	B, C, P, D	MD13	J, K	PG18	M, J, C, K
CHP7	A, J, K, P, D	MD19	J, K	S2	J, H, C, Z
CHP10	J, B, K	MD26	J, K	S11	J, K
CHP12	J, K, Q	N1	J, C, K	S18	J, H, C, K, Z
CHP21	J, B, K, D	N4	J, C, K	To4	J, C, K
CHP23	J, K	N10	J, C, K	U4/4	J, C
CP5	J, B, K, L	N13	J, C, K	Ua2	J, C, K
E12	M, J, C, K	N2/182	J, O	V11	J, B, C, K
F2	M, C, K	P2	J, C, K, O	V16	H, L
F5	J, C, K	P6	M, K	V6F	J, W, K
F14	M, C, O, S	P12	J, C, K	V8F	J, W, K
F15	J, B, K	P5	I, J, K, L	VI4	J, L
Fog4	J, K, L	P30	M, J, L	W6	J, H, K, L
HK1	M, J, K	P40	J, K	Z13	J, P, D
HK4	M, J, C, K	P55	J, H, K, L		

9. táblázat. Az egyes allélok előfordulása a vizsgált mintákban.

Allél		Minták, amelyben regisztráltuk
I	P5	
M	Ke4, Lo6, P100, HKR, F14, PG1, HK1, HK4, P30, P75, PG12, PG18, PG1, PG14, PG17, F2, M13, B6, B8, E12, P6	
A	M10, CHP1, CHP7	
J	U4/4, V8F, V6F, HK1, HK4, S18, S2, S11, N2/182, To4, CHP23, CHP2, CHP12, CB1, V11, W16, Fog4, VI4, CP5, P80, Z13, CHP7, CHP10, CHP21, P5, P30, P55, P75, P40, PG12, PG18, PG1, PG14, PG17, F5, N1, N4, N10, N13, P2, P12, M1, M13, B6, B8, Ua2, F15, E12, MD26, MD19, MD13, MD3	
H	P55, W6, V16, S2, S18	
B	V11, CP5, CHP1, CHP4, CHP10, CHP21, 1/31, F15, AA6	
F	1/31	
C	Ua2, E12, AA6, Ua2, B8, B6, M13, M1, P12, P2, N13, N10, N4, N1, F2, F5, PG17, PG14, PG1, PG18, PG12, CHP1, CHP4, V11, CB1, S2, S18, HK4, U4/4, PG1, F14, To4	
W	V8F, V6F, M10	
K	P6, Ua2, MD3, MD13, MD19, MD26, E12, F15, B8, B6, M13, M1, P12, P2, N13, N10, N4, N1, F2, F5, PG17, PG14, PG1, PG18, PG12, P40, P75, P55, P5, CHP21, CHP10, CHP7, P80, CP5, Fog4, W6, V11, CB1, CHP12, CHP2, CHP23, S11, S18, HK1, HK4, V6F, V8F, To4, HKR, P100, Lo6, CHP21, Ke4	
O	N2/182, Lo6, HKR, F14, P2	
P	CHP4, CHP7, Ke4, Z13	
L	1/31, P55, P30, P5, CP5, VI4, Fog4, W6, V16, HK4	
D	CHP1, CHP4, CHP7, CHP21, Z13	
S	F14	
R	HKR	
Q	CHP12	
Z	S2, S18	

10. táblázat. A különböző haplotípusok (fragmentum kombinációk).

Haplotípus	Előfordulás	Haplotípus	Előfordulás
B, F, L	1/31	M,L,N,O	Ke4
B, C	AA6	M,K,O	Lo6
M, J, C, K	B6, B8, PG1, PG12, PG14, PG17, PG18, M13, E12, HK4	A, W	M10
J, C, K	CB1, F5, M1, N1, N4, N10, N13, P12, To4, Ua2	J, O	N2/182
A, B, C, D	CHP1	J, C, K, O	P2
J, K	CHP2, CHP23, MD3, MD13, MD19, MD26, P40, P80, S11	M, K	P6, P100
B, C, P, D	CHP4	I, J, K, L	P5
A, J, K, P, D	CHP7	M, J, L	P30
J, B, K	CHP10, F15	J, H, K, L	P55, W6
J, K, Q	CHP12	J, H, C, Z	S2
J, B, K, D	CHP21	J, H, C, K, Z	S18
J, B, K, L	CP5	J, C	U4/4
M, C, K	F2	J, B, C, K	V11
M, C, O, S	F14	H, L	V16
J, K, L	Fog4	J, W, K	V6F, V8F
M, J, K	HK1, P75	J, L	VI4
M, K, O, L, R	HKR	J, P, D	Z13

5.4. SVÁJCI POPULÁCIÓ ELEMZÉSE

Rendelkezésünkre állt a 3.1.5-ös pontban bemutatott svájci kísérlet alapjául szolgáló növényanyagból kivont DNS. Minden populáció esetében 4 mintát választottunk, ezekből PCR segítségével amplifikáltuk a *TyrDC* gént, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a amplifikált fragmentumokat. Ezen minták esetében is elvégeztük az SSCP vizsgálatot a *tirozin-dekarboxiláz* gén populáción belüli variabilitásának felmérése érdekében. Sajnos a PCR során nem amplifikálódott csak egyetlen populációból (Val de Nomnom) mind a 4 kiválasztott mintából a *tirozin-dekarboxiláz* gén. Az értékelhető eredmények alapján egyes populációkon belül nincs különbség az egyedek tirozin-dekarboxiláz szekvenciája között pl: Val de Nomnom, Binntal, más populációkban pedig igen pl: Piano dei Canali, Mattmark. A mattmarki populációban regisztrálták Malnoe és munkatársai (2009) a kiugróan magas szalidrozyd tartalmat. Ezért a további munka során mindenképpen érdemes lenne ennek a populációnak a teljes rendelkezésre álló növényanyagát megvizsgálni, hogy köthető-e a *tirozin-dekarboxiláz* gén valamelyik allélvariánsához, ez a kiugróan magas szalidrozyd tartalom.

5.5. SZEKVENCIAILLESZTÉS

Elvégeztük a NCBI génbanki adatbázisból elérhető növényi *TyrDC* szekvenciák vizsgálatát, melyeket a 11. táblázatban foglaltunk össze. A letöltött szekvenciák hasonlósága 55,8-100 % között változott. Hosszuk szélső értékei, a parciális szekvenciákat nem tekintve, 1265-2404 bp voltak, a leggyakrabban 1600-1900 bp között váltakoztak. Néhány esetben egy fajból több eltérő szekvenciát is találtunk. A felmérés eredménye megerősített minket abban, hogy lehet egy adott fajon belül sok szekvencia változata ennek a génnek.

11. táblázat. Az NCBI-ből elérhető szekvenciák összehasonlítása.

Faj	Megoszlás	Hossz (bp)	Hasonlóság %	Hány csoport töltötte fel
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1db lineáris mRNS 7db lineáris mRNS (teljes cds)	1504-1942	55,8-99,6	4
<i>Oryza sativa</i>	3db lineáris mRNS (teljes inszert szekvencia) 4db lineáris mRNS (teljes cds)	797-1922	12,8-99,9	2
<i>Petroselinum crispum</i>	2db lineáris mRNS (3' vég) 1db lineáris mRNS (parciális cds) 1db lineáris mRNS (teljes cds) 1db lineáris (teljes cds)	1702 1298 1777 1671	70,6-100	1
<i>Papaver somniferum</i>	2db lineáris DNS (teljes cds) 1db lineáris mRNS (teljes cds) 1db parciális mRNS	1859-1955 1437	60-76,8	1
<i>Medicago trunculata</i>	2db lineáris mRNS (teljes cds)	1599-1719	78,5	1
<i>Solanum tuberosum</i>	2db lineáris mRNS (teljes cds)	1533	99,6	1
<i>Aristolochia contorta</i>	1db lineáris mRNS (parciális), 1db lineáris DNS (teljes cds)	1357	72,5	1
<i>Citrus reshni</i>	2db lineáris DNS (teljes cds)	1718-2404	71,2	1
<i>Citrus medica</i>	2db lineáris DNS (teljes cds)	1718	99,7	1
<i>Citrus maxima</i>	2db lineáris DNS (teljes cds)	1724-1265	69,3	
<i>Brachypodium distachyon</i>	lineáris mRNS	1848	-	1
<i>Populus trichocarpa</i>	lineáris mRNS (teljes cds)	1638	-	1
<i>Solanum lycopersicum</i>	lineáris mRNS	1927	-	1
<i>Linum usitatissimum</i>	lineáris mRNS (parciális cds)	405	-	1
<i>Rhodiola rosea</i>	lineáris DNS (teljes szekvencia)	1520	-	1

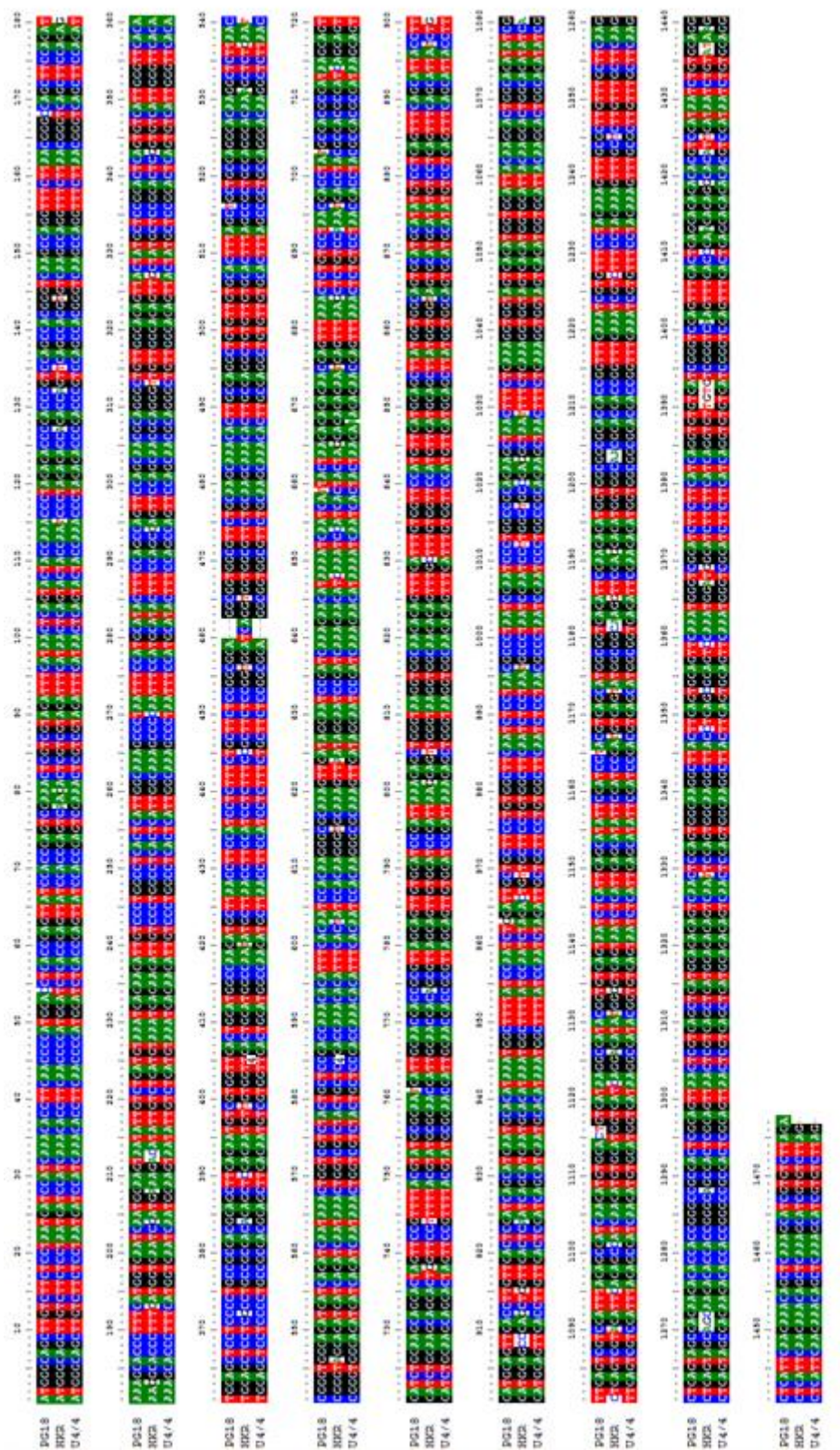
Faj	Megoszlás	Hossz (bp)	Hasonlóság %	Hány csoport töltötte fel
<i>Citrus reticulata</i>	lineáris DNS (teljes cds)	1718	-	1
<i>Citrus aurantium</i>	lineáris DNS (teljes cds)	1718	-	1
<i>Citrus sinensis</i>	lineáris DNS (teljes cds)	1718	-	1
<i>Rhodiola sachalinensis</i>	lineáris mRNS (teljes cds)	1715	-	1
<i>Rhodiola crenulata</i>	lineáris mRNS (teljes cds)	1670	-	1

5.6. SAJÁT SZEKVENCIA EREDMÉNYEK

Néhány minta (PG18, HKR, U4/4) esetében meghatároztuk a teljes nukleotid szekvenciát. Ezeket összeillesztettük és 88,7-99,2 %-ban voltak egymással hasonlóak. Az eltérés a legtöbb esetben egy pontos nukleotid-polimorfizmusokból adódott. Meg kell jegyeznünk, hogy az egyes mintákat csak 1-2 klónból szekvenáltuk meg, így nem zárható ki a szekvenálási hiba lehetősége. Ugyanakkor éppen azért végeztünk SSCP vizsgálatot, hogy lássuk valóban sok szekvencia variáns van-e és az SSCP géleken megfigyelt nagy változatosság megerősíti a szekvenálási eredményeket.

Két helyen egy 3 nukleotidos inzerciót találtunk, ez azonban nem jár kereteltolódással, így a fehérje szerkezetére ezek nincsenek nagy hatással. További terveink között szerepel az SSCP gélek alapján több eltérőnek bizonyuló minta esetén a *TyrDC* gén szekvenciájának meghatározása.

A 3 általunk meghatározott szekvenciát összehasonlítottuk az NCBI-ban megtalálható más *Rhodiola* fajok szekvenciáival is. Kettő darab *tirosin-dekarboxiláz* szekvencia volt az adatbázisban, egy *Rhodiola sachalinensis*-ből és egy *Rhodiola crenulata*-ból. A *Rhodiola crenulata* főként SNP-kben különbözött a szekvenciáinktól, 77,7-84,8% között volt a hasonlóság aránya a mi szekvenciáinkkal. A *Rhodiola sachalinensis* az SNP-ken kívül két viszonylag hosszú inzerciót tartalmaz (18bp és 24bp), emiatt mutatott kisebb hasonlóságot a mintáinkkal, a hasonlóság mértéke 69,4-72,5% között változott.



9. ábra. Az általunk meghatározott szekvenciák illesztése a BioEdit programban. (PG18 – olaszországi passo gaviai populáció egy egyede, HKR – ausztriai hochkari populáció egyede, U4/4 – oroszországi novaja zemljai populáció egy egyede).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Crassulaceae* családba tartozó *Rhodiola rosea* adaptogén hatású gyógynövényként ismert, az emberi testre számos jótékony hatást gyakorol. Többek között serkenti a központi idegrendszer működését, jótékonyan hat a hosszú távú memóriára és a koncentrációs képességre, többféle jótékony hatást gyakorol a szívre, illetve szerepe lehet a rák elleni védekezésben.

A tirozin-dekarboxiláz enzim a tirozint tiraminná redukálja. Kulcsfontosságú szerepe van a szalidrozyd bioszintézisben, ami a rozavinek mellett a rózsagyökér adaptogén hatásáért felelős hatóanyag. Az egyes egyedek szalidrozyd felhalmozásában nagy különbségek vannak, erre egy magyarázatot adhatnak a *tirozin-dekarboxiláz* gén allélváltozatai.

Kutatásunk során 142 DNS mintából amplifikáltuk a *TyrDC* teljes ORF-jét PCR segítségével. Az amplifikált termékek agaróz gélelektroforézissel való ellenőrzése után SSCP technikával vizsgáltuk az egyes minták közötti eltéréseket.

Az SSCP technika segítségével megállapítottuk, hogy a *TyrDC* génnek sok szekvencia változata van (65 minta esetén 34 haplotípust különítettünk el). A gélképek alapján homozigóta, heterozigóta, illetve 3 vagy 5 ssDNS-t mutató egyedeket is azonosítottunk. Azt is megállapítottuk, hogy bizonyos ssDNS-sel rendelkező haplotípusok viszonylag gyakran előfordulnak (például az M, J, C, K vagy a J, C, K kombinációk 10-10 mintában fordultak elő), mások viszont csak egy-egy vizsgált mintára voltak jellemzőek (például az M, K, O az Lo6-os mintára vagy az A, W kombináció az M10-es mintára).

A 3 meghatározott szekvencia illesztése alapján a fajon belüli eltérésekért főként SNP-k a felelősek, de egy pozícióban találtunk egy 3 bázispáros inszerciót, ami kereteltolódást nem okoz. Az SNP-k miatt az egyes aminosavakat kódoló triplettek több esetben megváltoztak, ami a fehérje szerkezetében is változást jelent. Ugyanakkor további vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy a talált SNP-k valójában nem szekvenálási hibából adódnak-e.

Az NCBI-ből letöltött szekvenciák hasonlósága 55,8-100 % között változott. Hosszuk a parciális szekvenciákat nem tekintve 1265-2404 bp között váltakozott. Néhány esetben egy fajból több eltérő szekvenciát is találtunk. Ez megerősített minket abban, hogy lehet sok szekvencia változata ennek a génnek.

Az elkövetkező időszakban terveink közt szerepel a *TyrDC* gén szekvenciájának meghatározása további mintákból. Emellett néhány populáció részletes vizsgálatát is szeretnénk elvégezni, a populáción belüli változatok számának felmérése céljából, szintén SSCP technikával.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aiken, S. G., Dallwitz, M. J., Consaul, L. L., McJannet, C. L., Boles, R. L., Argus, G. W., Gillett, J. M., Scott, P. J., Elven, R., LeBlanc, M. C., Gillespie, L. J., Brysting, A. K., Solstad, H., Harris, J. G. (2007) Flora of the Canadian Arctic Archipelago: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa. <http://nature.ca/aaflora/data>, letöltve 2014. szept. 30.
2. Asdal, A., Galambosi, B., Olsson, K., Wedelsback Bladh, K., Porvaldsdóttir, E. (2006) Spice-and Medicinal Plants in the Nordic and Baltic Countries. Conservation of Genetic Resources pp. 94-104.
3. Bai, Y., Bi, H., Zhuang, Y., Liu, C., Cai, T., Liu, X., Zhang, X., Liu, T., Ma, Y. (2014) Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*. Scientific Reports 4:6640, doi:10.1038/srep06640
4. 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.
5. Brown, R. P., Gerbarg, P. L., Ramazanov, Z. (2002) *Rhodiola rosea*: A Phytomedicinal Overview. *HerbalGram* 56: 40-52.
6. Cao, L. L., Du, G. H., Wang, M. W. (2005) Effect of salidroside on mitochondria injury induced by sodium azide. *Yao Xue Xue Bao* 40(8): 700-704.
7. Cao, L. L., Du, G. H., Wang, M. W. (2006) The effect of salidroside on cell damage induced by glutamate and intracellular free calcium in PC12 cells. *Journal of Asian Natural Products Research* 8(1-2): 159-165.
8. Darbinyan, V., Aslanyan, G., Arnroyan, E., Gabrielyan, E., Malmstrom, C., Panossian, A. (2007) Clinical trial of *Rhodiola rosea* L. extract SHR-5 in the treatment of mild to moderate depression. *Nordic Journal of Psychiatry* 61(5): 343-348.
9. 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): 365-71.

10. Elameen, A., Klemsdal, S. S., Dragland, S., Fjellheim, S., Rognli, O. A. (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. Ellis, B. E. (1983) Production of Hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry* 22(9): 1941-1943.
12. Facchini, P. J., De Luca, V. (1994) Differential and Tissue-specific Expression of a Gene Family for Tyrosine/Dopa Decarboxylase in Opium Poppy. *The Journal of Biological Chemistry* 269(43): 26684-26690.
13. Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L., Tari, L. W. (2000) Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* 54(2): 121-138.
14. Facchini, P. J., Penzes-Yost, C., Samanani, N., Kowalchuk, B. (1998) Expression Patterns Conferred by Tyrosine/Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase Promoters from Opium Poppy Are Conserved in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology* 118:69-81.
15. Furmanowa, M., Hartwich, M., Alfermann, A. W., Kozminski, W., Olejnik, M. (1999) Rosavin as a product of glycolisation by *Rhodiola rosea* (roseroot) cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 105-110.
16. Furmanowa, M., Oledzka, H., Michalska, M., Sokolnicka, I., Radomska, D. (1995) *Rhodiola rosea* L. (Roseroot): In vitro regeneration and the biological activity of roots. -in: Bajaj, Y.P.S. (Ed.): *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 33, Medicinal and Aromatic Plants VIII. Springer, Heidelberg, pp. 412-426.
17. Galambosi, B., Galambosi, Z., Slacanin, I. (2007) Beneficial health substances from berries and minor crops – How to increase their concentration in cultivated species, eliminate losses in processing and enhance dietary use. *Nordic Association of Agricultural Scientists* 3: 38-39.
18. Galambosi, B., Galambosi, Z., Uusitalo, M., Heinonen, A. (2009) Effects of plant sex on the biomass production and secondary metabolites in roseroot (*Rhodiola rosea* L.) from the aspect of cultivation. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 14(3): 114-121.
19. György, Z. (2006) Glycoside production by in vitro *Rhodiola rosea* cultures. *Acta Universitatis Ouluensis C Technica* 244, Oulu University Press, Oulu. ISBN 951-42-8079-2. pp. 16.

20. György, Z., Jaakola, L., Neubauer, P., Hohtola, A. (2009) Isolation and genotype-dependent, organ-specific expression analysis of a *Rhodiola rosea* cDNA encoding tyrosine decarboxylase. *Journal of Plant Physiology* 166:1581-1586.
21. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequencealignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
22. Kawalleck, P., Keller, H., Hahlbrock, K., Scheel, D., Somssich, I. E. (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 2189-2194.
23. Kelly, G. S. (2001) *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. *Alternative Medicine Review* 6 (3): 293-302.
24. Khanum, F., Bawa, A. S., Singh, B. (2005) *Rhodiola rosea*: A Versatile Adaptogen. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety* 4(3): 55-62.
25. 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* 206:691-696.
26. Kucinskaite, A., Briedis, V., Savickas, A. (2004) Experimental analysis of therapeutic properties of *Rhodiola rosea* L. and its possible application in medicine. *Medicina (Kaunas)* 40(7): 614-619.
27. Kurkin, V. A., Zapesochneya, G. G. (1986) Chemical composition and pharmacological properties of *Rhodiola rosea*. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 20: 1231–1244.
28. Kurkin, V. A., Zapesochneya, G. G., Shchavlinskii, A. N. (1984) Flavonoids of the epigeal part of *Rhodiola rosea* L. *Chemistry of Natural Compounds* 20(5): 623-624.
29. Kylin, M. (2010) Genetic diversity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) from Sweden, Greenland and Faroe Islands. Diplomamunka, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Svédország <http://stud.epsilon.slu.se/2049/>, letöltve: 2014. szeptember 17.
30. Landtag, J., Baumert, A., Degenkolb, T., Schmidt, J., Wray, V., Scheel, D., Strack, D., Rosahl, S. (2002) Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. *Phytochemistry* 60: 683-689.
31. Lehmann, T., Pollman, S. (2009) Gene expression and characterization of a stress-induced tyrosine decarboxylase from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 583: 1895-1900.

32. Lid, J., Lid, D. T. (2005) Norsk flora. Det Norske Samlaget, Oslo, ISBN 8252160298, p. 378.
33. Lishmanov, I. B., Maslova, L. V., Maslov, L. N., Dan'shina, E. N. (1993) The anti-arrhythmia effect of *Rhodiola rosea* and its possible mechanism. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* 116(8): 175-176.
34. Lishmanov, I. B., Naumova, A. V., Afanas'ev, S. A., Maslov, L. N. (1997) Contribution of the opioid system to realization of inotropic effects of *Rhodiola rosea* extracts in ischemic and reperfusion heart damage in vitro. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya* 60(3): 34-36.
35. Ma, L. Q., Liu, B. Y., Gao, D. Y., Pang, X. B., Lü, S. Y., Yu, H. S., Wang, H., Yan, F., Li, Z. Q., Li, Y. F., Ye, H. C. (2007) Molecular cloning and overexpression of a novel UDP-glucosyltransferase elevating salidroside levels in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Cell Reports* 26: 989–999.
36. Maldonado-Mendoza, I. E., López-Meyer, M., Galef, J. R., Burnett, R. J., Nessler, C. J. (1996) Molecular Analysis of a New Member of the Opium Poppy Tyrosine/3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase Gene Family. *Plant Physiology* 110: 43-49.
37. Malnoë, P., Carron, C., Vouillamoz, J., Rohloff, J. (2009) L'orpin rose (*Rhodiola rosea* L.), une plante alpine anti-stress. *Revue suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* 41(5): 281-286.
38. Marques, I. A., Brodelius, P. E. (1988) Elicitor-Induced L-Tyrosine Decarboxylase from Plant Cell Suspension Cultures. *Plant Physiology* 88: 46-51.
39. Mirmazloun, 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.
40. Molinos, A. (2013) Effects of adaptogen supplementation on sport performance. A recent review of published studies. *Journal Of Human Sport and Exercise* 8(4): 1054-1066.
41. Negrel, J., Lotfy, S., Javelle, F. (1995) Modulation of the Activity of two Hydroxycinnamoyl Transferases in Wound-Healing Potato Tuber Discs in Response to Pectinase or Abscissic Acid. *Journal of Plant Physiology* 146:318-322.
42. Negrel, J., Martin, C. (1984) The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23(12): 2797-2801.

43. Pannosian A., Wikman G., Sarris J. (2010) Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine* 17: 481-493.
44. Parker, J., Malone, M. szerk. (2006) *Flóra II*. Global Book Publishing Pty Ltd, Willoughby, Ausztralia p. 1143 ISBN 9639615102
45. Perfumi, M., 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: 37-43.
46. Pirttilä, A. M., Hirsikorpi, M., Kämäräinen, T., Jaakola, L., Hohtola, A. (2001) DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:273a-f.
47. Priszter, S. (1998) *Növényneveink*. Budapest. Mezőgazda Kiadó. p. 479.
48. Rohloff, J. (2001) Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L. *Phytochemistry* 59(6): 655-661.
49. Saratikov, A. S., Krasnov, E. A., Chnikina, L. A., Duvidson, L. M., Sotova, M. I., Marina, T. F., Nechoda, M. F., Axenova, R. A., Tscherdinzeff, S. G. (1968) Rhodiolosid, a new glycoside from *Rhodiola rosea* and its pharmacological properties. *Pharmazie* 23(7): 392-395.
50. Shevtsov, V. A., Zholus, B. I., Shervarly, V. I., Vol'skij, V. B., Korovin, Y. P., Khristich, M. P., Roslyakova, N. A., Wilkman, G. (2003) A randomized trial of two different doses of a SHR-5 *Rhodiola rosea* extract versus placebo and control of capacity for mental work. *Phytomedicine* 10: 95–105.
51. Somssich, I. E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E., Schulz, W. (1989) Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Molecular Biology* 12: 227-234.
52. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
53. Tasheva, K., 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: 274942.
54. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- positions-specific gaps penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
55. Trezzini G. F., Horrichs A., Somssich I. E. (1993) Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Molecular Biology* 21: 385-389.
 56. Vastag, B. (2007) Warming to a cold war herb: Soviet secret finds its way west. *Science News* 172(12): 184-189.
 57. Wang, H., Ding, Y., Zhou, J., Sun, X., Wang, S. (2009) The in vitro and in vivo antiviral effects of salidroside from *Rhodiola rosea* L. against coxsackievirus B3. *Phytomedicine* 16(2-3): 146-155.
 58. Yu, H. S., Ma, L. Q., Zhang, J. X., Shi, G. L., Hu, Y. H., Wang, Y. N. (2011) Characterization of glycosyltransferases responsible for salidroside biosynthesis in *Rhodiola sachalinensis*. *Phytochemistry* 72: 862-870.
 59. Zapesochaya, G. G., Kurkin, V. A. (1983) Glycosides of cinnamyl alcohol from the rhizomes of *Rhodiola rosea*. *Chemistry of Natural Compounds* 18: 685–688.
 60. Zhang, J. X., Ma, L. K., Yu, H. S., Zhang, H., Wang, H. T., Qin, Y. F., Shi, G. L., Wang, Y. N. (2011) *Plant Cell Reports* 30:1443–1453.
 61. Zhang, J., Liu, A., Hou, R., Zhang, J., Jia, X., Jiang, W., Chen, J. (2009) Salidroside protects cardiomyocyte against hypoxia-induced death: a HIF-1 α -activated and VEGF-mediated pathway. *European Journal of Pharmacology* 607(1-3): 6-14.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a Genetika és Növénynemesítés Tanszéknek a DNS minták és eszközök rendelkezésemre bocsájtását, illetve a tanszék munkatársainak mindennemű segítségét.

Külön köszönetet szeretnék mondani Iman Mirmazlounnak, amiért megmutatta a szekvenciaillesztő-programok használatát.

Legfőképpen pedig szeretném megköszönni konzulensemnek, Benyóné György Zsuzsanna egyetemi adjunktusnak mindig segítőkész hozzáállását és áldozatos munkáját.