

**BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BUDAPEST**

**A kalkonszintáz gén intron régiójának variabilitása a
Rhodiola rosea L. faj esetén**

Trócsányi Eszer

Mezőgazdasági biotechnológus

Készült: Genetika és Növénynevelés Tanszéken

Tanszéki konzulens: Dr. György Zsuzsanna, adjunktus

Bírálok: _____

Budapest, 2014. 12. 15.

tanszékvezető/szakirányfelelős

konzulens

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzés.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. A <i>Rhodiola rosea</i> általános jellemzése.....	6
3.1.1. Történeti áttekintés.....	6
3.1.2. Rendszertani besorolás.....	6
3.1.4. Származás és elterjedés.....	7
3.2. Fitokémiai jellemzés.....	8
3.2.1. <i>Rhodiola rosea</i> hatóanyagai.....	8
3.2.2. A szalidroزيد és rozavin anyagcsereutak.....	10
3.3. Gyógyászati felhasználás.....	11
3.4. A molekuláris markerek.....	12
3.4.1. RFLP-hibridizáció.....	12
3.4.2. A PCR technikán alapuló eljárások.....	13
3.4.3. SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism).....	15
3.4.4. A <i>Rhodiola</i> populációk genetikai diverzitásának tanulmányozása molekuláris markerekkel.....	16
3.5.1. Kalkonszintáz, mint molekuláris marker.....	19
3.5.2. A kalkonszintáz (<i>CHSi</i>) diverzitás vizsgálata.....	20
4. Anyag és módszer.....	23
4.1. Növényanyag.....	23
4.2. DNS-kivonás.....	25
4.3. PCR-vizsgálat.....	25
4.4. Detektálás.....	25
4.4.1. Elválasztás metaforagaróz gélen.....	25
4.4.2. SSCP vizsgálat.....	26
4.4.3. Adatértékelés.....	26
5. Eredmények és megvitatásuk.....	27
5.1. DNS kivonás.....	27
5.2. PCR-vizsgálat.....	29
5.3. Detektálás.....	29
5.3.1. Elválasztás metaforagarózzal.....	29
5.3.2. SSCP vizsgálat.....	30
5.3.3. Adatértékelés.....	31
6. Összefoglalás.....	35
7. Irodalomjegyzék.....	36
8. Köszönetnyilvánítás.....	42

Rövidítések jegyzéke

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism - amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR - Tetszőleges primerrel végzett PCR
APS	ammonium persulfate - <i>ammónium</i> peroxidilszulfát
cDNS	complementary DNS: , komplementer DNS
CHI	chalcone isomerase – kalkon izomeráz
CHS	chalcone synthase – kalkonszintáz
<i>CHSi</i>	chalcone synthase intron – kalkonszintáz intron
cpDNS	klorplasztisz dezoxiribonukleinsav
DMD/DMB	Duchenne/Becker Muscular Dystrophy - Duchenne/Becker-féle izomdisztrófia
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
IFLP	Intron Fragment Length Polymorphism – intron fragmentumhossz polimorfizmus
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat – egyszerű szekvenciák közötti ismétlődések
OTC	ornitin transcarbamilase - ornitin-transzkarbamiláz
PAL	phenylalanine ammonia-lyase - fenilalanin-ammónia-liáz
PCR	Polymerase Chain Reaction - polimeráz láncreakció
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism - restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism – egyszálú konformációs polimorfizmus

ssDNS	single stranded deoxiribonukleinsav – egy szálú DNS
SSR	Simple Sequence Repeats - egyszerű szekvencia ismétlődések
TAL	tyrosine ammonia-lyase - tirozin-ammónia-liáz
TBE	Tris-Bórsav-Edta
TEMED	tetramethylethylenediamine - tetrametilén etiléndiamin
UV	Ultraviolet - ultraibolya

1. Bevezetés

A *Rhodiola rose* L. az északi féltekén elterjedt gyógynövény, mely a *Crassulaceae* családba tartozik. Bár egyes népek már évszázadok óta ismerik és használják a népgyógyászatban, Nyugat-Európában csak az elmúlt 10-20 évben terjedt el. Számos klinikai vizsgálat készült az adaptogén hatásáról, továbbá tanulmányok készültek a növény fő hatóanyagaival kapcsolatban, melyek a földalatti szervekben felhalmozódó fahéj-alkohol glikozidok: rozin, rozarin, rozavin, és a fenolglykozid szalidrozyd.

Mind a *Rhodiola* nemzetségben, mind a *Rhodiola rosea* fajon belül is igen nagy a diverzitás. Ez a morfológiai sokféleségükben is megnyilvánul, például a virág színben, a növény magasságban vagy levél alakban, fogazottságban (Asdal *et al.*, 2004; Mell, 1938 idézte Brown *et al.*, 2002), de fitokémiai szinten is (Malnoe *et al.* 2009). Éppen ezért az elmúlt időszakban több tanulmány is foglalkozott a *Rhodiola* fajok genetikai variabilitásával.

A kalkonszintáz, a flavonoid bioszintézisében részt vevő enzim, a növények esetében igen erősen konzervált. A kalkonszintáz intron szekvenciájára viszont nem hatott erős szelekciós nyomás ezért létre jöhettek un. semleges mutációk, inszerció, delécio, vagy transzpozonok megjelenése útján. Ez alkalmassá teszi a *CHSi* szekvencia használatát molekuláris markerezésre. Ezen alapult Bartish és munkatársainak (2006) kutatása a homoktövis esetében. A dolgozatban bemutatott munka célja a *Rhodiola rosea* L. faj kalkonszintáz intronjának genetikai diverzitásának vizsgálata. Tizenegy ország területéről huszonhat populációból választottunk 1-4 egyedet. A *CHS* gén intron régiójának amplifikálása után elvégeztük azok SSCP vizsgálatát. Az SSCP módszer során az egy szálú DNS-eket natív poliakrilamid gélen választottuk el. A gélen látott mintázat alapján több haplotípust azonosítottunk.

2. Célkitűzés

A dolgozat témája a *Rhodiola rosea* L. kalkonszintáz intron régió változékonyságának vizsgálata, európai és oroszországi populációk esetében. Célunk a populációk közötti variabilitás felmérése volt SSCP módszer segítségével.

Az elérendő célokat a következő pontokban lehet összefoglalni:

- DNS kivonás 26 populáció egyedeiből.
- A kalkonszintáz intron amplifikálása pcr-el.
- SSCP módszer alkalmazhatóságának vizsgálata a rózsagöker kalkonszintáz intron esetén.
- Haplotípusok megállapítása.
- A haplotípusok földrajzi lokalizációjának vizsgálata.

3.Irodalmi áttekintés

3.1.A *Rhodiola rosea* általános jellemzése

3.1.1.Történeti áttekintés

Elsőként a görög orvos, Dioscorides tett feljegyzéseket az un. *Rodiola riza* gyógyászati alkalmazásairól időszámításunk előtt 77-ben *De Materia Medica* című művében (Mell, 1938 idézte Brown *et al.*, 2002). 1749-ben Linné nevezte el *Rhodiola rosea*-nak, és írta le mint a sérv, leukorrhea (hüvelyi váladék, fehérfolyás), a hisztéria, és a fejfájás ellenszerét valamint mint vérzéscsillapítót (Linneus, 1749 idézte Brown *et al.*, 2002). 1725-től számtalan tanulmány jelent meg a svéd, norvég, francia, német, szovjet és izlandi irodalomban a növény gyógyhatásairól. 1960-ig több mint 180 farmakológiai, fitokémiai, és klinikai tanulmány született róla (Brown *et al.*, 2002). 1755-ben a *R. rosea*-t leírták az első Svéd Gyógyszerkönyvben (Magnusson és Fagringar, 1992 idézte Brown *et al.*, 2002). 1961-ben G. V. Krylov orosz botanikus az Orosz Tudományos Akadémia Botanikai Tagozatának tagja, szervezett egy expedíciót az Altai hegységbe, és Dél-Szibériába, ahol megtalálta a *R. rosea*-t és azonosította a népgyógyászatban használt arany gyökérrel (Krylov, 1969 idézte Brown *et al.*, 2002).

Habár a XX. század második felétől számos kutatási eredmény született a növényről kapcsolatban, mégis nyugaton csak a század végén került be a tudományos köztudatba. Ez annak tudható be, hogy a kutatásokat többnyire szláv és skandináv nyelveken publikálták (Brown *et al.*, 2002).

3.1.2.Rendszertani besorolás

A *Rhodiola rosea* L., amely aranygyökér (golden root) vagy rózsgyökér (rosen root) néven is ismert, a *Crassulaceae* családba tartozik (Engler, 1964 idézte Brown *et al.*, 2002). Hivatalos magyar neve az illatos rózsás varjúháj (Priszter, 1999). Az aktuális taxonómiai besorolása igen bonyolult alakult ki. A második világháború előtt a *Rhodiola* fajokat egy saját nemzetségbe sorolták a *Sedoidae* alcsaládon belül. Később egy a *Sedum* nemzetségbe tartozó alnemzetségbe sorolták be őket, amely 10 *Rhodiola* fajt tartalmazott. Végül 1963-ban több mint 50 *Rhodiola* fajt különítettek el, és azokat a *Rhodiola* nemzetségbe sorolták a *Crassulaceae* családon belül (Hegi, 1963 idézte Brown *et al.*, 2002). Mára meghatározott morfológiai sajátosságok alapján tartoznak egy nemzetségbe, de az új fajok elhelyezésével kapcsolatban még mindig vita folyik a szakemberek között (Ohba, 1975 idézte Brown *et al.*, 2002).

A több mint 200 azonosított *Rhodiola* faj közül Ázsiában legalább 20 fajt alkalmaznak a tradicionális gyógyászatban, mint például a *R. alterna*, *R. brevipetiolata*, *R. crenulata*, *R. kirilowii*, *R. sachalinensis*, *R. rosea* és *R. sacra* (Kelly, 2001). Mára az egyre népszerűbb *Rhodiola* termékek számos változatát kínálják, de gyakran az általános nemzetségnevet használják a fajok teljes botanikai neve helyett. Ez zavarot okozhat. Nem tekinthetünk egy tibeti vagy indiai *Rhodiola* kivonatát egyenértékűnek a *Rhodiola rosea* kivonatával, mivel a fajok fitokémiai és farmakológiai tulajdonságai eltérőek. Ezért fontos a pontos taxonómiai besorolás használata, amely általánosan elfogadott botanikai, fitokémiai és genetikai taxonómiai kritériumok alapján történik (Brown *et al.*, 2002).

3.1.3. Botanikai leírás

A *Rhodiola rosea* száraz, sziklás, köves talajon, magas fekvésű területeken él (Saratikov és Krasnov, 1987 idézte Brown *et al.*, 2002). Évelő növény, rizómával telel át. Ha a rizómáját megtörjük, erősen illatozik (Mell, 1938 idézte Brown *et al.*, 2002). *Rhodiola rosea*-nak Linné nevezte el, ezzel utalva a rizóma rózsa illatára (Linnaeus, 1749 idézte Darbinyan 2000). A biológiailag aktív anyagok a gyökérben és rizómában halmozódnak fel, így ezt a részt tekintjük a drognak (*Rhodiola Rhadix et Rhizoma*) (Platikanov és Evstatieva, 2008). Szukkulens növény. A száraz körülményekhez alkalmazkodva, szára és levele húsos, pozsgás. Ülő, néha szárölelő levelei hosszúkásak elliptikusak, de akár egészen kerekdedek is lehetnek, ép szélűek vagy enyhén fogazottak, és a csúcsukon gyakran kihegyesedőek. Magassága 30-70cm között változhat (Asdal *et al.*, 2004; Mell, 1938 idézte Brown *et al.*, 2002). A növény kétlaki. Egyivarú virágai júniusban nyílnak, általában sárga esetleg piros bogernyő virágzatban (Asdal *et al.*, 2004). A szíromlevelei gyakran hiányoznak, s a portokok pirosas színűek (Tutin *et al.*, 1972). 1,5-2,0 mm hosszú és 0,3-0,6 mm széles apró barna magvainak ezermagtömege 0,1-0,2 g, csírázóképesége 2-3 év (Galambosi, 2006).

3.1.4. Származás és elterjedés

A *Rhodiola* nemzetség Délnyugat-Kína hegyvidéki régióiból, és a Himalájából származtatható (Darbinyan *et al.*, 2000). A *Rhodiola rosea* cirkumpoláris elterjedésű faj, az északi félgömbön a nagyobb tengerszint feletti magasságokban illetve magasabb szélességi körök mentén terjedt el (1. ábra. A *Rhodiola* nemzetség elterjedése 1. ábra). Közép- és Észak-Ázsiában a nemzetség az Altaj hegységtől, Mongólián át egészen Szibéria egyes területeiig megtalálható (Komarov, 1971 idézte Brown *et al.*, 2002). A nemzetség egyes fajait azonosították Alaszkában, Kanadában, és az Egyesült Államok északi hegységeiben is.

Európában a *R. rosea* faj fellelhető Izlandon, a Brit szigeteken, Skandináviában, továbbá délen a Pireneusok az Alpok és a Kárpátok vonulatainak magasabb régióiban (Hegi 1963 idézte Brown *et al.*). Bulgáriában a természetes előfordulási területei a folyó és patak völgyek 2000-2600 m magasságban az alpesi területeken, a Rila, Pirin és a Balkán-hegységben (Valev, 1970). Romániában a Keleti-Kárpátokban (Máramarosi havasok, Fogarasi havasok, Radnai havasok, Kelemen-havasok) találtak *Rhodiola rosea* fajt (Furmanova *et al.*, 1995).



1. ábra. A *Rhodiola* nemzetség elterjedése (Physical map of the world

<http://www.körinfo.hu/drupal/en/node/6623> módosításával az irodalmi adatok alapján).

3.2. Fitokémiai jellemzés

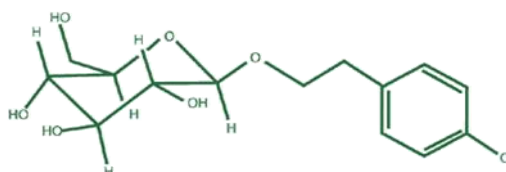
3.2.1. *Rhodiola rosea* hatóanyagai

A fitokémiai kutatások 28 másodlagos anyagcsereterméket mutattak ki a *R. rosea* gyökeréből és rizómájából, melyeket 6 csoportba (1. táblázat) soroltak be (Kurkin és Zapesochnya, 1985 Brown *et al.*, 2002). A *Rhodiola rosea* stimuláló és adaptogén hatásait két fő kémiai vegyületcsoportnak tulajdonítják, amelyeket a földalatti szervekből izoláltak, és mint fenilpropanoid (rozavinok) és fenil-etanol származékok (szalidrozyd, tirozol) határoztak meg (Saratikov *et al.*, 1986 idézte Furmanowa 1999).

1. táblázat: A *Rhodiola rosea* hatóanyagai

Hatóanyagcsoport	Hatóanyagok
Fenilpropanoidok	rozavin, rozin, rozarin
Fenil-etanol származékok	szalidroزيد (rhodioloزيد), tirozol
Flavonoidok	rodilin, rodionin, acetyl-rodalgin, tricin
Fenolsavak	klorogénsav, hidroxi-fahéjsav,
Monoterpének	roziridol, rozaridin
Triterpének	daukosztrerin, béta-szitoszterin

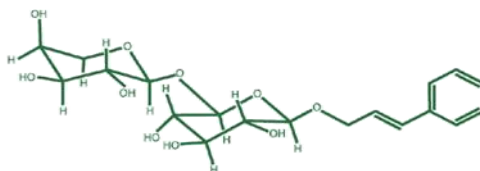
A rózsagyökér kivonat standardizálásának meghatározása két lépcsőben zajlott. Eleinte az egyedülálló farmakológiai tulajdonságokat a szalidroزيدnak (2. ábra) tulajdonították (Saratikov és Krasnov, 1987 idézte Brown *et al.*, 2002; Kurkin és Zapesochneya, 1986 idézte Furmanowa 1999) és az Orosz Gyógyszerészeti Bizottság minimum 0.8 %-os koncentrációban határozta meg a rózsagyökér készítményekben a szalidroزيد tartalmát (Kurkin *et al.*, 1985 Brown *et al.*, 2002).



2. ábra. A szalidroزيد kémiai képlete (Brown *et al.*, 2002).

Az 1980-as években a *R. rosea* alapú készítmények iránti kereslet erősen megnövekedett, ami a vadon élő állományok megcsappanását, és a *R. rosea* készítmények minőségbeli leromlását okozta. A *R. rosea* fajt ugyanis megpróbálták más *Rhodiola* fajokkal helyettesíteni, de ezeknek a készítményeknek a farmakológiai hatása vagy megváltozott, vagy meg is szűnt, míg az eredeti *R. rosea* készítmények hatásosak maradtak. Így felmerült a kérdés hogy alkalmas-e a szalidroزيد kémiai markernek (Brown *et al.*, 2002).

Majd egy évtizedes kutatás után, Kurkin és kollégái bebizonyították, hogy a *R. rosea* hatóanyagai különböznek a többi *Rhodiola* fajétól (Kurkin és Zapesochneya 1986, Furmanowa 1999). Kurkin és Zapesochneya a rózsagyökér rizómában kimutatták három fahéj-alkohol glikozid (rozavin, rozin rozarin egyszóval rozavinek) jelenlétét (Brown *et al.*, 2002). A rozavin kémiai képletet a 3. ábra látható.

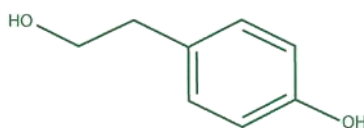


3. ábra. A rozavin kémiai képlete (Brown et al., 2002).

Manapság a rozavineket alkalmazzák kémiai markerként a tiszta *R. rosea* kivonat jelzésére. A Szovjet Gyógyszerkönyv 1983-ban szabványosította a *R. rosea* vizes-alkoholos vagy szárított gyökér kivonatában mind a rozavinek, mind a szalidrozyd tartalmát. 3 % rozavin, rozin és rozarin valamint 0.8-1 % szalidrozyd tartalmat írtak elő, mert ezen összetevők aránya a természetben is 3:1. Ilyen kivonatot alkalmaznak általában humán klinikai vizsgálatoknál is (Brown, 2002).

A *R. rosea* rizóma illóolaj összetevőit Rohloff (2002) vizsgálta és megállapította, hogy a szárított rizóma 0.05 % illóolajat tartalmaz. A geraniolt azonosította, mint a legfontosabb rózsa illatú komponenst, további komponensei a geranil acetát, benzilalkohol és a feniletillalkohol (Rohloff, 2002).

A *R. rosea*-ban antioxidáns anyagokat is kimutattak, úgy mint tirozolt (4. ábra), szerves savakat, flavonoidokat. Az alkoholos és vizes kivonatok szabadgyök megkötő képességét is vizsgálták (Lee, 2000; Ohsugi, 1999).



4. ábra. A tirozol kémiai képlete (Brown et al., 2002).

3.2.2. A szalidrozyd és rozavin anyagcsereutak

Mind a szalidrozyd, mind a fahéj alkoholl glikozidok a sikimin-korizmánssav anyagcsere útvonalaiból származó fenilpropanoid származékai. A fenilpropanoid útvonal legalaposabban tanulmányozott enzime a fenilalanin-ammonia-liáz (PAL), alakítja át a fenilalanint fahéjsavvá. Ezen a ponton a fahéjalkoholl glikozidok bioszintézise elágazik a fő fenilpropanoid bioszintézis úttól, és három további enzim segítségével fahéjalkohollá alakul. Azt az enzimet, amely a fahéjalkoholl glikozidálásában játszik szerepet még nem írták le. A fahéjalkoholl és egy glükóz összekapcsolódásának eredménye képen a rózsagyökér legegyszerűbb glikozidját a rozint kapjuk. Ebből alakul ki további cukor molekulák kapcsolódásával a rozarin és a rozavin is (György, 2006).

A szalidrozyd bioszintézise a tirozinból indul ki, amely tiraminná alakul a tirozin dekarboxiláz (TyrDC) által. A tiramin tirozollá oxidálódik. Majd a tirozolhoz egy UDP-glükózztranszferáz

segítségével egy glükóz molekula kapcsolódik és így alakul ki a szalidrozyd (György *et al.*, 2009). Ismert a szalidrozyd bioszintézisének egy alternatív útvonala is. E szerint a tirozint a tirozin ammónia-liáz kumarinsavvá alakítja át. A kumarinsavból további három enzim segítségével kumarol-alkohol keletkezik, melyből egy még ismeretlen lépés során tirozol keletkezik. Itt visszakanyarodva az előző útvonalhoz UDP-glükóztranszferáz segítségével kialakul a szalidrozyd (Ma *et al.*, 2008).

3.3. Gyógyászati felhasználás

A *R. rosea*-t mint tradicionális népi gyógyszert már régóta használják a fizikai állóképesség, az élethossz és a munkateljesítmény növelésére, valamint a hegyi betegségekkel szembeni ellenálló képesség fokozására, továbbá a fáradtság, depresszió, vérszegénység, impotencia, emésztőrendszeri megbetegedések, fertőzések és az idegrendszeri zavarok kezelésére (Brown *et al.*, 2002).

Alaszkában az eszkimók zöldségnövényként, nyersen, sütvé vagy főzve is fogyasztották. Vitaminpótlásra használták magas – 33 mg/g (levél), 12 mg/g (gyökér) - C-vitamintartalma miatt.

Később a növény, felkeltette a kutatók érdeklődését és számos vizsgálatnak vetették alá. Az orosz kutatók az adaptogén növények közé sorolták, azaz a szervezet ellenálló képességét nem specifikusan erősítő növény, amely nem zavarja meg a természetes biológiai folyamatokat (Kelly, 2001). A növény hatásainak megismerése érdekében édesvízi csigán (*Lymnaea stagnalis*) végeztek kísérleteket. A csiga tojásainak *R. rosea* (40,5 µg/ml) vizes kivonatóval való inkubálása után a következő stresszeknek tették ki azokat: hő sokk (43°C-os hőmérséklet 4 percre), oxidatív stressz, nehézfém kezelés. Míg a hő sokk kezelést a kontroll állatok csak 9 %-a élte túl, addig a kezelt állatoknál 90 % lett a túlélési ráta. Az oxidatív stressz esetén ez a százalék 68, míg a nehézfém kezelés 28-35 körül alakult, de mindegyik esetben nagyobb volt a túlélési ráta a kezelt csoportban a kontrolcsoportéhoz képest. Humán kísérletek is beszámolnak az *R. rosea* adaptogén hatásairól (Boon-Niermeijer, 2000).

A *R. rosea* széleskörű gyógyászati alkalmazását a Szovjet Egészségügyi Minisztérium alapozta meg, mikor 1975-ben jóváhagyták, és bejegyezték *Rhodiola Extract Liquid* (No. 75/933/14) néven a *R. rosea* alkoholos alapú (40 % etanol) kivonatót és engedélyezték a kivonat nagy mennyiségű előállítását. A növényt a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII., 2004) ill. az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur.) még nem tartalmazza, azonban már itthon is kaphatók különböző készítmények, mint az Odin Rózsagyökér, a Vitango, vagy a Swanson Rhodiola Rosea.

3.4. A molekuláris markerek

A markereket azonosításra, genetikai variabilitás elemzésére használják, és három csoportba sorolhatók. Az első a morfológiai markerek csoportja, ami a fenotípusos jegyeket jelenti. A második a biokémiai markerek csoportja, ide tartoznak az izoenzimek. A harmadik csoport pedig a molekuláris markerek csoportja. A marker a DNS egy kódoló vagy nem kódoló régióban található lókusza (Kiss, 2005). A molekuláris markereket három csoportba sorolhatjuk. Léteznek hibridizáción alapuló markerek (RFLP), PCR-en alapuló markerek (SSR, AFLP), és szekvencia illetve DNS chip alapú markerek (Gupta *et al.*, 1999).

3.4.1. RFLP-hibridizáció

A RFLP (restriction fragment length polymorphism) a restrikciós enzimek használatán alapul. Ezek az enzimek specifikus helyeket ismernek fel a genomban és ezeken a pontokon elhasítják a DNS szálát. Ezek a restrikciós fragmensek agaróz gélen molekulaméret alapján elválaszthatóak, majd Southern blot technika alkalmazásával a fragmenseket egy nitrocellulóz membránra viszik fel, és az egyes fragmenseket jelölt próbák hibridizálásával azonosítják. A hibridizációhoz a genomi DNS egy szakaszát, cDNS-t vagy oligonukleotidok használhatóak (Kiss, 2005). Az egyes egyedek restrikciós fragmenseinek hossza genotípusbeli különbséget jelent. A különbség lehet egy restrikciós hely hiánya, vagy új alternatív restrikciós hely megjelenése (White és Wyman 1980). A fragmensszám, vagy fragmenshosszbeli eltérést okozhatja pontmutáció, inszerció, delécio, transzlokáció, duplikáció vagy inverzió. Először Paterson és munkatársai 1988-ban közöltek RFLP-n alapuló kromoszóma térképet (Paterson *et al.*, 1988).

Az RFLP-k a genomban véletlenszerűen oszlanak el, és igen gyakoriak. A DNS-ben nem csak az exonokban hanem az intronokban is bekövetkezhetnek változások. Ez utóbbiakra nem nehezedik közvetlenül szelekciós nyomás. Ezeket IFLP-nek nevezzük (Intron Fragment Length Polymorphism) (Hajósne Novák, 1999).

Az RFLP technika nem igényel szekvencia ismeretet, és könnyen értékelhető. További előnye, hogy jól ismételhető az eljárás és kodomináns öröklődésű marker, de hátránya, hogy radioaktivan jelölt próba szükséges hozzá, nagy mennyiségű és jó minőségű DNS-t igényel, költség- és munkaigényes eljárás, illetve gyakran nem megfelelő szintű polimorfizmust ad (Semagn *et al.*, 2006).

3.4.2. A PCR technikán alapuló eljárások

3.4.2.1 A polimeráz láncreakció

A PCR eljárást (polymerase chain reaction) 1987-ben Karl B. Mullis találta fel, majd 1993-ban Nobel-díjjal ismerték el felfedezését. A módszer a DNS felsokszorozására alkalmas, néhány óra alatt milliárdos kópiaszám érhető el (Hajósne Novák, 1999).

A PCR technika gyakorlatilag az élő sejtben lezajló DNS replikáció folyamatát másolja. A reakció egy programozható termosztátban zajlik. A templát DNS felsokszorozásához szükség van hőstabil DNS polimeráz enzimre (Taq polimeráz), mely a komplementer szálát szintetizálja. Továbbá lánckezdő oligonukleotidra azaz a primerekre, dezoxinukleotid-trifoszfátokra (dNTP-mix), magnéziumionra, és a megfelelő puffer közegre, mely a polimeráz számára biztosítja a megfelelő kémiai környezetet.

A reakció lépései:

- A PCR első lépésében 95°C-on denaturálják a templát DNS-t.
- A második lépésben 50-65°C-ig hűtik az elegyet, ahol a primerek a komplementer szakaszhoz hibridizálódnak.
- A harmadik lépés 72°C-on zajlik. Ekkor a polimeráz a primerek 3' végét elkezd meg hosszabbítani (elongáció), a komplementer szál szintézise 5'-3' irányban történik.

A szintetizálódott szál a következő ciklusban templát DNS-ként szolgál. A ciklusok során a DNS szakasz exponenciálisan felsokszorozódik (Mullis és Fallona, 1987). A megfelelő számú ciklus után a DNS fragmentumokat gélen elválasztják és festik, így szabad szemmel is láthatóvá válnak (Hajósne Novák, 1999).

3.4.2.2. RAPD

A RAPD (random amplified polymorphic DNAs) technikát 1990-ben Williams és munkatársai írták le. PCR alapú technika, mely során random 10 nukleotidos primereket használnak. Ha a primerkötőhelyek ellentétes szálon, amplifikálható távolságban helyezkednek el DNS fragmentumok szintetizálódnak, melyek agaróz gélen elválaszthatóak és etidium-bromiddal festve detektálhatóak. A kapott mintázat, az egyes fragmentumok jelenléte vagy hiánya markerként használható.

Legtöbbször 2-10 fragmentum amplifikálható ezzel a módszerrel, melyek hossza 200 és 2000 bp közé esik (Kiss és E999). A RAPD előnye hogy gyors és egyszerű eljárás és kis mennyiségű DNS templát is elegendő hozzá, de mivel domináns jellegként viselkedik heterozigotáság kimutatására alkalmatlan (Bisztray, 2001). Az ismételhetősége viszont

problémát okoz, ugyan is ez a technika nagyon érzékeny a reakció körülményeire, a DNS mennyiségére és minőségére, illetve különböző szövetekben az eltérő metilezettség okozhat különbséget a PCR mintázatban (Arnholdt-Schmitt et. al. 1991).

A RAPD-hoz hasonló eljárás az AP-PCR, csupán annyiban tér el, hogy a primerek hosszabb oligonukleotidok mint a RAPD esetében (Welsh és McClelland, 1990).

3.4.2.3. Mikroszatellit polimorfizmus (SSR)

Az eukariota genom sok olyan szakaszt tartalmaz, melyekben rövid nukleotid motívumok ismétlődnek tandem elrendezésben. Ezek a motívumok 1-4 bázis hosszúak lehetnek (Tautz és Renz, 1984 idézte Morgante és Olivieri 1993).

Ezt a jelenséget Litt és Luty, valamint Weber és May egy időben írta le az emberi genomban. A mikroszatellit (Simple Sequence Repeats SSR) elnevezés Litt és Luty-tól származik. Saiki és munkatársai (1988) PCR-technika segítségével felszaporították ezeket a mikroszatellit régiókat. Ehhez a mikroszatellit motívumok konzervatív határoló szekvenciáira tervezett primerpárok használhatóak. Szinte mindig nagy polimorfizmust mutatnak a fragmentumok. A mikroszatellitek hosszúságbeli eltérését a rövid nukleotid motívumok eltérő számbeli ismétlődése okozza (Litt és Luty, 1989; Weber és May, 1989 idézte Morgante és Olivieri 1993). Az egyedek közötti különbség tehát az ismétlődések számában van. Valószínűleg a DNS replikáció során a polimeráz „megcsúszása” miatt jönnek létre ezek az eltérések (Tautz et al., 1986 idézte Morgante és Olivieri 1993).

Nagyfokú polimorfizmusa miatt jó genetikai marker, és alkalmas genetikai térképek készítésére (Weissenbach et al., 1992). Kodomináns jellegű, így a heterozigótaság kimutatható. A mikroszatellit alapú eredmények jól reprodukálhatóak (Arbeola et al., 2006). Számos gazdasági növény esetében fejlesztettek már ki SSR markert, ilyenek például az árpa (*Hordeum vulgare*) (Maroof et al., 1994), napraforgó (*Helianthus annuus* L.) (Brunel, 1994), kukorica (*Zea mays* L.) (Senior et al., 1996), tanszékünkön pedig kajszi (*Prunus armeniaca* L.) egyedek esetében használtak sikeresen az SSR markereket (Pedryc et al., 2006). A módszer hátránya a költségigényessége.

3.4.2.4. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Az ISSR technikát 1994-ben írták le Zietkievitz és munkatársai. Előnye, hogy nem igényel előzetes szekvencia ismeretet, és erősen polimorf mintázatot ad. Ebben az esetben a primereket az ismétlődő szekvenciákra, mikroszatellit régiókra tervezik. Gélen elválasztva a PCR termékeket minden egyes sáv megfelel egy DNS szekvenciának, amit két mikroszatellit

határol (Bornet és Branchard, 2001).

Ha a primert csak a mikroszatellit régióra tervezik akkor a primer adott mikroszatellit régió több pontján is beköthet, különböző hosszúságú fragmentumokat eredményezve. Ekkor a géliképen egy „smear” (elhúzódó sáv) látszik. Ha az ismétlődő szekvenciára tervezett primert meghosszabbítják a 3' vagy az 5' végen, akkor csak egy fragmentum készül adott régióról és egy határozott fragmentumot látunk a géliképen (Reddy *et al.*, 2002).

Az ISSR további előnyei hogy gyors, egyszerű és jól ismételhető (Bornet és Branchard, 2001).

3.4.2.5. AFLP

Az AFLP (amplified fragment length polymorphism) a RAPD és az RFLP módszerek előnyeit ötvözi. A módszer lényege hogy egy gyakran és egy ritkán vágó restrikciós endonukleázzal emésztik a genomi DNS-t, majd az így létrejövő ismert végződésű fragmentumokhoz (mivel a restrikciós enzimek hasítási helyei ismertek) adaptereket ligálnak. Az adapterekkel komplementer primerek segítségével a fragmentumokat PCR során amplifikálják. Ezután szelektív amplifikációt végeznek, amikor a primereket 1-3 un. szelektív nukleotiddal megtoldják. A PCR után a szakaszokat akrilamid gélen választják el. Az így kapott fragmentumok számából kiszámítható a szakaszok relatív távolsága, illetve további statisztikai vizsgálatokkal a taxonok közötti genetikai távolság is szemléltethető. A módszer általánosan alkalmazható, és nem igényel előzetes szekvencia ismeret (Vos *et al.*, 1995).

3.4.3. SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

Az SSCP az egyszálú DNS (single-strand DNA / ssDNS) elektroforetikus elválasztása, amely olyan szekvenciabeli különbségen alapul, ami ssDNS eltérő másodlagos strukturáját és így az elektroforézis során azok eltérő mozgékonyágát eredményezi. Ez gyakran egy bázis különbség is lehet (SNP). 1989-ben Orita és munkatársai fejlesztették ki ezt a módszert. Első lépésként a DNS-t restrikciós enzimekkel kell emésztetni lúgos közegben és PCR technikával amplifikálni. A fragmentumok denaturálása végezhető hővel, formamiddal, de használható nátrium hidroxid, vagy formaldehid és metil-higany hidroxid keverékével is. A denaturálás után az egyszálú fragmentumokat natív poliakrilamid gélben futtatják. Az elektroforézis során az ssDNS egy háromdimenziós alakzatot vesz fel, mely az elsődleges szerkezetétől, a nukleotid szekvenciától függ. Az elektroforetikus mozgékonyágat az egyszálú molekula alakja befolyásolja. Ha csak egy nukleotidnyi eltérés van két minta között, akkor is eltérő elektroforetikus képet fogunk kapni. A módszer azon a megfigyelésen alapszik,

hogy az egy szálú DNS fragmentumok egyedi térformát vesznek fel, melyet intramolekuláris kölcsönhatások stabilizálnak (Kusakabe *et al.*, 1993 idézi Kakavas *et al.*, 2008). Így egy bázis eltérése is konformáció változást okoz, ami eltérő mobilitásként detektálható.

Ha a fragmentumok amplifikálásához jelölt (P^{32}) nukleotidokat használunk a detektálás autoradiogramm segítségével történik. Ezen kívül a detektáláshoz használhatunk fluorescensen jelölt nukleotidokat, etidium bromidot, vagy ezüsfestéses módszert (Kakavas *et al.*, 2008).

Napjainkban az SSCP-t leggyakrabban humán genetikai betegségek diagnosztizálása esetében használják. Liechti-Gallati és munkatársai (1999) olyan protokollt dolgoztak ki, amely számos örökletes betegség kimutatására alkalmas, így a Duchenne vagy Becker izomsorvadás (DMD, BMD), OTC (Ornithin transcarbamylase) hiány, kollagén hiány, CMT (Charcot-Marie-Tooth) betegség és a Wilson kór kimutatására is.

A mutáció által okozott futásbeli eltolódást nem lehet előre meghatározni. Fordítva, egy mutált szekvencia mobilitásának megméréseével viszont tapasztalati úton következtethetünk a háromdimenziós szerkezetre (Kenshi, 1991 idézte Kakavas *et al.*, 2008).

3.4.4. A *Rhodiola* populációk genetikai diverzitásának tanulmányozása molekuláris markerekkel

A *Rhodiola* nemzetségben a fajon belül is megfigyelhető az egyedek morfológiai sokfélesége. Ez a sokféleség megnyilvánulhat például a virág színben, a növény magasságban vagy levél alakban, levélszél fogazottságban (Asdal *et al.*, 2004; Mell, 1938 idézte Brown *et al.*, 2002). De nem csak morfológiai szinten figyelhető meg nagy diverzitás a fajon belül. Fitokémiai vizsgálatokkal is különbségek fedezhetők fel az egy fajba tartozó egyedek között. Malnoe és munkatársai (2009) a Svájci Alpok rózsagyökér populációi szalidroزيد és rozavin tartalmát vizsgálták, és megállapították, hogy a fajon belül az egyes populációk rozavin tartalma 1,02 % és 2,07 % között változott, míg a szalidroزيد tartalom 0,46 % és 2,85 % közötti volt. Ezen morfológiai és fitokémiai megfigyelések alapján nem csak a nemzetségben belül, de a fajon belüli genetikai diverzitással is érdemes foglalkozni (György *et al.*, 2014).

Az elmúlt időszakban több tanulmány is született világszerte a *Rhodiola* fajok genetikai variabilitásának vizsgálatával kapcsolatban.

A *R. iredemica* Boriss. a Dél-Urál területén élő endemikus, védett faj. Yanbaev és munkatársai (2007) izoenzim markereket és poliakrilamid gél elektroforézist használtak a populációk genetikai variabilitásának összehasonlítására. Az eredmények egyed szinten magas genetikai változatosságot mutattak, és a populációk differenciálódása ($F_{st}=0,115$) magasabb volt, mint a

legtöbb idegentermékenyülő növény esetében. A viszonylag nagy eltérés oka a *R. iremelica* populációk esetében feltehetőleg a kisméretű populációkra jellemző beltenyésztés és a génsodródás jelensége lehet. Jellegzetes mintázatokat a genetikai variabilitás eloszlásában nem találtak. Figyelembe véve a növény magas szintű variabilitást, a tanulmányban javasolták az *in situ* megőrzés mellett mesterséges *ex situ* populációk létrehozását is és később azok visszatelepítését a természetes környezetbe.

A *Rhodiola rosea* Norvégiában igen elterjedt növény. Egy szelekciós nemesítési program érdekében Elameen és munkatársai (2008) 97 Norvégia különböző megyéiből származó klón genetikai diverzitását tanulmányozták AFLP módszerrel. Öt primer kombinációját alkalmazták a vizsgálat során, és így 109 polimorf fragmentumot kaptak. Ezek alapján mind a 97 klón egyértelműen azonosítható volt. Eredményeiket UPGMA típusú dendrogrammon ábrázolták. A genetikai hasonlóság az AFLP adatok alapján 0,440 és 0,952 között mozgott, átlagosan pedig 0,631 volt. A vizsgálat kimutatta, hogy az egyes termőhelyekről származó klónok között nincsen jelentős genetikai hasonlóság, illetve nem találtak ivarspecifikus markereket sem. Továbbá AMOVA vizsgálattal magas szintű genetikai különbségeket tapasztaltak egyes régiókon belül (92,03 %), míg a régiókon kívül alacsony volt a variancia (7,97 %). A szerzők szerint ezek az alacsony szintű genetikai különbségek a régiók közötti nagyarányú génáramlásra utalnak, ami a *R. rosea* esetében inkább a magszóródásnak köszönhető, mint a keresztbeporzásnak.

A *Rhodiola crenulata* Délnyugat-Kínában elterjedt faj. Lei és munkatársai (2006) a *Rhodiola crenulata* genetikai változatosságát tanulmányozták a Hengduan hegységben. Kilenc populációt vizsgáltak, hármat Kelet-Tibetben, és hatot Észak-Yunnanban. 12 ISSR markert használtak, melyekkel 184 polimorf lókuszt azonosítottak. AMOVA vizsgálattal kimutatták, hogy az egyed szintű genetikai variabilitás viszonylag nagy volt ($p = 97,83 \%$, és $H_o = 0,464$), a populáción kívüli és belüli genetikai diverzitás pedig a Shannon index alapján megközelítőleg azonos. A Nei féle diverzitás vizsgálat és az UPGMA törzsfá alapján elmondható, hogy a yunnani populációk közül három a földrajzi elhelyezkedésüknek megfelelően elkülönülő csoportokat alkot a genetikai diverzitás alapján.

A *Rhodiola alsia* egy endemikus faj a Qingnai-Tibet fennsíkon. Gao és munkatársai (2009) a *R. alsia* filogeográfiáját tanulmányozták, a kloroplasztisz egy intergenikus régiójának (rpl20-rps12) szekvenálásával. A vizsgált 18 populációból összesen 315 egyedet emeltek ki, ezzel a térség teljes állományát lefedve és 31 haplotípus azonosítottak. A legtöbb haplotípus csupán egy populáción belül fordult elő, vagy két szomszédos populációra korlátozódott, ami arra enged következtetni, hogy a génáramlás magszóródás útján nagy távolságra kismértékű.

Csupán három olyan haplotípus fordult elő, ami az egész elterjedési területen megtalálható volt. A kutatók a növény jelenlegi elterjedése alapján egy korábbi elterjedésre következtettek, mely szerint a negyedidőszaki eljegesedés során a *R. alsia* refugiákba húzódott vissza majd a későbbiekben a populációk egymástól függetlenül fejlődtek.

Zini és munkatársai (2009) *Rhodiola rosea* faj vizsgálatára 8 db di- és trinukleotidos mikroszatellit régió amplifikálására alkalmas primerpárt fejlesztettek ki. 48 egyedet mintáztak két populációból Trentino régióból (Olaszország). Minden lókuszt polimorfnak bizonyult, lókuszonként 2-5 ssDNS-t találtak. A megfigyelt heterozigótaság (H_o) 0,09 és 0,76 között mozgott. A két populációban a HWE teszt 5 lókuszban jelentős eltérést mutatott a Hardy-Weinberg egyensúlytól.

Hasonlóan a *Rhodiola rosea* fajjal foglalkozott Kylin (2010). Növényanyaga a Nordic Gene Bank génbankból származott. A Nordic Gene Bank növényeit Svédországból, Grönlandról, és a Feröer-szigetéről gyűjtötték be. Négy ISSR és négy SSR primert használtak, a genetikai diverzitás értékelésére. A PCR termékeket poliakrilamid gélen választották el, majd ezüsfestéssel tették láthatóvá a fragmentumokat. A géleket manuálisan értékelték, majd a kodomináns SSR és a domináns ISSR marker adatokat külön-külön vizsgálták a Popgene; és NTSYSpc. szoftverekkel. Végül 37 (ISSR) illetve 12 (SSR) polimorf lókuszt találtak. Az ISSR marker esetében a svéd minták 83,78 %-os, a Grönlandiak 94,59 %-os, a Feröer-szigeteki minták pedig 48,65 %-os polimorfizmust mutattak. A minták közül csak kettő bizonyult klónnak, a többi egyedi volt. Ivar specifikus primert pedig ez esetben sem találtak.

Kozyrenko és munkatársai (2011) 10 orosz és egy lengyel *R. rosea* populációt vizsgáltak, ezen kívül még *R. integrifolia* és *R. stephanii* populációkat is. Összesen 206 DNS mintával dolgoztak, és nyolc ISSR primerrel. Mintegy 243 polimorf fragmentumot találtak. Megállapították, hogy faj szinten magas a genetikai variabilitás, míg populációk szintjén relatív alacsony variabilitást figyeltek meg. Az AMOVA vizsgálat alapján a variabilitás a populációk között magas volt (65,42 %) míg a populációk között alacsonyabb (34,58 %). A *R. rosea* populációkat két csoportba sorolták klaszteranalízis alapján. A két csoport két evolúciós útvonalat képvisel a fajon belül, melyek eltérő genetikai szerkezettel, evolúciós történelemmel, és migrációs útvonallal rendelkeznek.

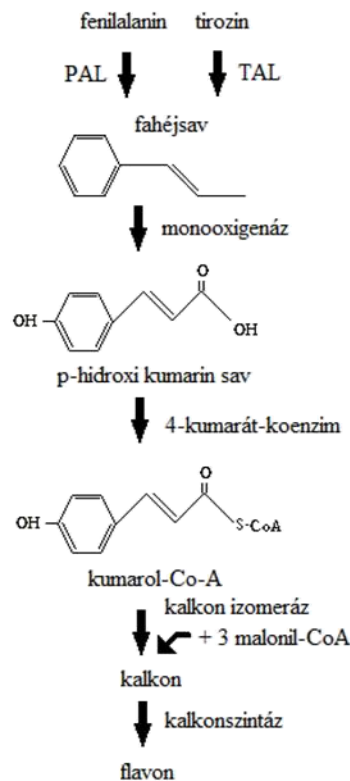
Az Észak Amerikában honos *Rhodiola integrifolia*, *R. rhodanta* és *R. rosea* fajok kloroplasztisz és sejtmagi DNS-nek vizsgáltával a genetikai variabilitás alapján filogeográfiai következtetéseket vontak le Guest (2001). A sejtmagi DNS átíró, de nem kódoló ITS régióját szekvenálták. Filogenetikai vizsgálatok alapján arra következtettek, hogy a *R. rhodanta* és *R. integrifolia* elkülönülő, de szoros rokoni kapcsolatban álló fajok, illetve hogy a

vizsgált három faj egy elkülönülő csoportot alkot a *Rhodiola* nemzetségen belül. A kloroplasztisz régió esetében RFLP módszerrel vizsgálódtak, és a Sziklás hegység déli területein, ahol a két faj areája átfed, találtak közös haplotípusokat, vagyis ezeken a területeken a két faj hibridjei jöttek létre. A kloroplasztisz DNS *psbA-trnH* gének közötti nem kódoló szakaszt 66 *R. integrifolia* populáció esetében vizsgálták, és 28 haplotípust azonosítottak. Egyes haplotípusok széles körben elterjedtek voltak, míg mások csak egy adott területen fordultak elő, mint például a Yukon mentén, Alaszkában, a Queen Charlotte szigeten. Délebbre haladva a haplotípusok diverzitása egyre fokozódott

György és munkatársai (2009) előbb finnországi populációk vizsgálatát végezték el ISSR markerekkel, később néhány oroszországi populáció néhány egyede genetikai ujjlenyomatát nézték meg ISSR és SSR markerekkel (György *et al.*, 2012). Észak-norvégiai populációk diverzitását is vizsgálták mind ISSR (2013) mind SSR markerekkel (György *et al.*, 2013). A legfrisebb munkájukban (György *et al.*, 2014) három európai hegységből, az Alpokból, a Kárpátokból, és a Pireneusokból származó populációkból emeltek ki összesen 169 egyedet majd a populációk diverzitását hasonlították össze Zini és munkatársai (2009) által tervezett nyolc és You és munkatársai (2013) által tervezett öt primerpár segítségével. Hat primerpár esetében kaptak polimorf mintázatot. Az UPGMA törzsfá és a PAST szoftverrel végzett elemzések alapján a genetikai diverzitás a populációk között nem volt jelentősen nagyobb, mint a populációkon belül. Megállapították, hogy az Alpok és a Kárpátok egyedei nem különülnek el, az AMOVA vizsgálat szerint a genetikai variabilitás számottevően nagyobb a vizsgált egyedek között, mint a populációk között

3.5.1. Kalkonszintáz, mint molekuláris marker

A kalkonszintáz a flavonoid bioszintézisútban vesz részt (5. ábra). A flavonoidok bioszintézise fenilalaninból és tirozinból kezdődik. A fenilalaninból vagy tirozinból a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) vagy tirozin-ammónia-liáz (TAL) fahéjsavvá dezaminálja. A fahéjsavat a monooxygenáz hidroxilálja *p*-hidroxi kumarin savvá, amit a 4 kumarát koenzim aktivál 4 kumarol-Co-A-vá. Ebből és három malonil-Co-A-ból alakul ki a flavonváz a kalkonszintáz (CHS) a kalkon-izomeráz (CHI) segítségével (Winkel-Shirley, 2001).



5. ábra: A flavonoid bioszintézis útvonal.

3.5.2.A kalkonszintáz (*CHSi*) diverzitás vizsgálata

Mivel a kalkonszintáz a flavonoid bioszintézis egy kulcsenzime, a növényeknél igen erősen konzervált. A kétszikűek között több mint 66 % szekvencia azonosság van a kalkonszintáz génben. Az intron szakaszra viszont nem hatott erős szelekciós nyomás, így a kalkonszintáz intronjában (*CHSi*) létre jöhetnek un. semleges mutációk. Így például míg a kódoló régió vizsgálata során a 1107 bázispárból csak 27 nukleotid esetében találtak eltérést, addig az intron szekvencia vizsgálatakor jelentős változásokat tapasztaltak a szekvenciában, például számos, eltérő transzpozon megjelenést (Casacuberta és Santiago, 2003 idézte Griesbach és Beck, 2005; Durbin *et al.*, 2001 idézte Griesbach és Beck, 2005).

Strand és munkatársai (1997) egy protokollt vázoltak fel kis kópiaszámú gének esetében az oligonukleotid primerek fejlesztésére. A primer fejlesztéssel az evolúció biológiai és származástani kutatások során alkalmazott DNS alapú markerezést kívánták segíteni.

Nyolc univerzális primer párt fejlesztettek és teszteltek egy és kétszikű növényekkel. A markerezésre alkalmas régiókat elsődleges és másodlagos anyagcsere termékek előállításában részt vevő gének közül választották ki, mert ezekre jellemzőek a következők:

1. Sok információ áll rendelkezésre ezen szekvenciákról, ami megkönnyíti a primer tervezést.
2. Lehetőség nyílt az evolúciós tanulmányok összekapcsolására egyéb molekuláris kutatásokkal, úgy mint funkció, szabályozás és expresszió vizsgálat.
3. Általában kis kópiaszámú gének.

Ezek alapján választották a kalkonszintáz a nyolc vizsgált lókuszt közé. A legtöbb régió magába foglal egy vagy több intront. Az intron szekvenciák nagyobb mértékben változnak, mint az exon szekvenciák, és így sokkal valószínűbb hogy variábilis helyet tartalmaznak, amely alkalmas markerezésre. Bár a *CHS* néhány esetben úgy ismert, mint multigén család, de mindegyik lókuszt eltérő hosszú intront tartalmazot, így elkülöníthető volt a többi lókusztól (Reif *et al.*, 1985). A *CHS* gén intron régiójára fejlesztett primerpárral 150 és 1200 bp közé esett az amplifikált fragmentumok hossza. Az amplifikált *CHSi* fragmenteket génbanki szekvencia adatokkal történő egyeztetés során azonosították, majd a közönséges harangláb (*Aquilegia vulgaris* L.) esetében a *CHSi*-t meg is szekvenáltak (200 bp). Ezeket a primereket a szerzők direkt szekvenáláshoz, RFLP vizsgálatához, heteroduplex analízishez, SSCP vizsgálatához és denaturáló gradiens gélelektroforézishez ajánlották (Strand *et al.*, 1997).

Griesbach és Beck (2005) a *Petunia integrifolia*, *P. altilplanta*, *P. littoralis*, és egy ismeretlen braziliai taxon *CHSi* szekvenciájának vizsgálatával megállapították, hogy az ismeretlen taxon a *P. integrifolia* közeli rokona, valamint a vizsgálat alapján felállított filogenetikai törzsfá szerint a *P. integrifolia* sokkal közelebbi rokona a *P. littoralis*-nak, mint a *P. altilplanta*-nak.

Egy másik tanulmányban Griesbach és munkatársai (2000) a *Petunia integrifolia* fajra kifejlesztett technikát alkalmazták a *CHSi* genetikai heterogenitásának vizsgálatára. Ismert termőhelyekről gyűjtött vad petúnia fajokat mintáztak, majd a *CHSi* régiót PCR-rel amplifikálták. A kapott fragmentumokat *Rsa I* enzimmel hasították a fajok genetika jellemzése céljából. Ezek alapján négy fajt írtak le.

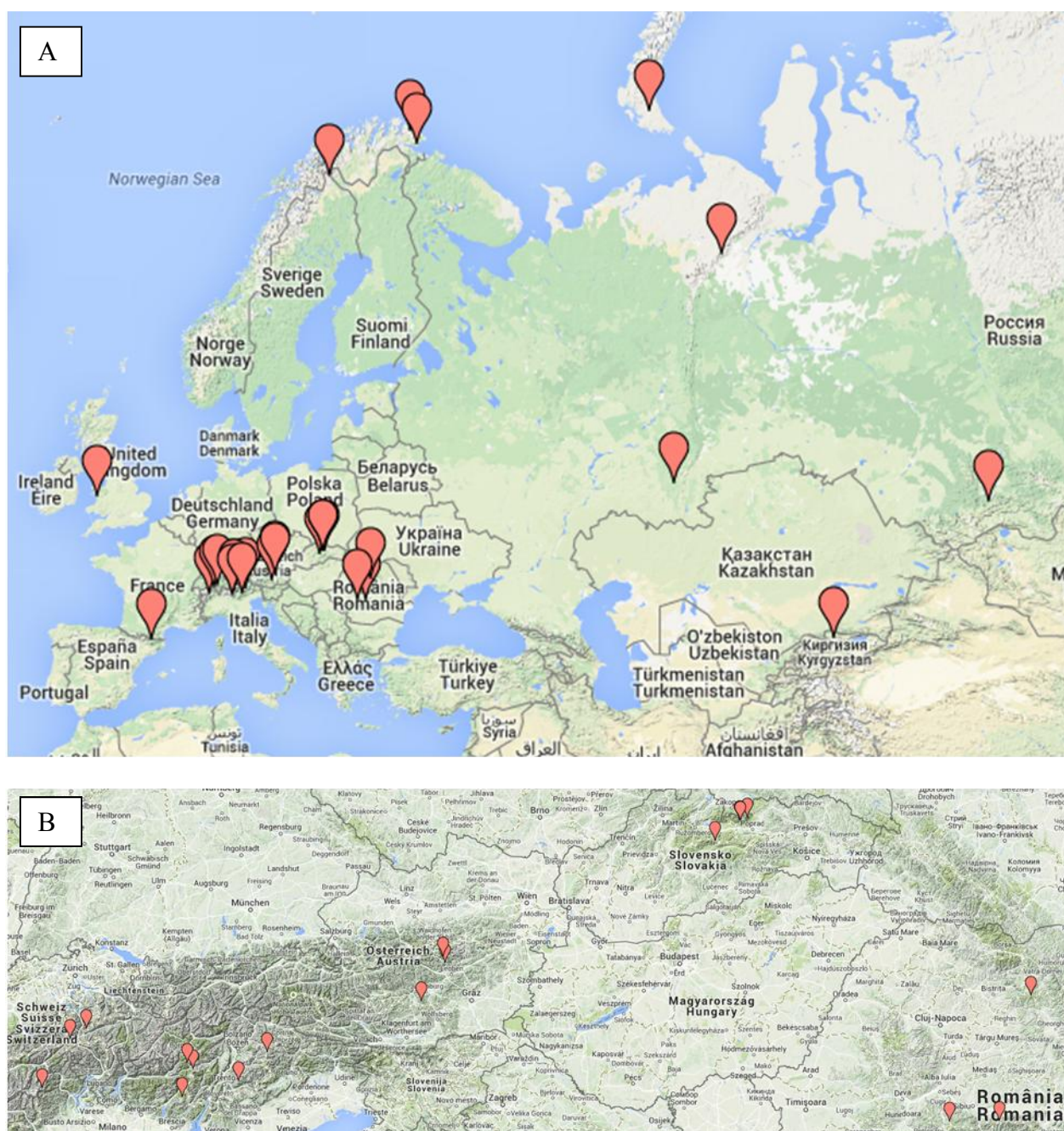
Bartish és munkatársai (2006) a *CHSi*-t használták homoktövis (*Hippophae rhamnoides*) populációk markerezésére. Tanulmányukban a homoktövis *CHSi* markerezésével, a kloroplasztisz DNS RFLP vizsgálatával, és pollen fossziliák alapján a növény késő negyedidőszaki történetére következtettek. A *CHSi* nagy polimorfizmusának köszönhetően alkalmasnak bizonyult filogeográfiai és demográfiai események rekonstruálására. A *CHSi* vizsgálatához 131 egyedet használtak fel összesen 26 területről (mindegyik területről maximum 9 egyedet) ezzel lefedve az elterjedési területet Európában és Kis-Ázsiában. Egy különálló csoportként Kínából származó egyedeket is, valamint homoktövis fossziliákat is bevontak a vizsgálatba. A *CHSi* vizsgálatához egy univerzális primerpárt használtak. Az

egyedek heterozigótaságára gélelektroforézis után a több allél jelenlétéből, vagy a kromatogrammon a polimorf helyeken megjelenő 'dupla csúcsokból' következtettek. A haplotípusokat vagy kromatogramm alapján határozták meg, kisebb indelek (inzerció/delécio) vagy szubsztitúciók alapján vagy pedig Clark féle algoritmus alapján. Ez utóbbi módszer a már ismert szekvenciákat használja referenciaként az új haplotípusok megállapításához. Amennyiben négynél több pozícióban fordulnak elő indelek egyik módszer sem bizonyult megbízhatónak, így ezekben az esetekben a PCR termék megszekvenálására került sor. A kapott szekvenciák hossza 628 és 778 bp között volt. A 131 egyed között 83 haplotípust azonosítottak, melyek szekvenciája az NCBI honlapján elérhetőek. A minták diverzitását 1-18 bp-os indelek, vagy 1-5-ször ismétlődő 28 bp-os minisatellit ismétlődések okozták. Filogenetikai fa készítésével hat fő *CHSi* vonalat azonosítottak. A populáción belüli diverzitást Nei alapján számolták, így a legnagyobb haplotípus diverzitásokat és nukleotid diverzitásokat ($h=0,94$ és $\pi=4,22$; $h=0,96$ és $\pi=3,90$) az egymással szomszédos német és ausztriai populációk esetében kapták. A haplotípusok földrajzi elterjedését NCA-val (Nested clade analysis) határozták meg. E vizsgálat alapján megállapították, hogy a homoktövis elterjedése az elmúlt 40000 évben négy fázisonra osztható. Először 36300 évvel ezelőtt egy rövid meleg 'interstadiális' alatt terjedt el, majd ezt követően az utolsó glaciális maximum után 19-18000 évvel ezelőtt. A korai Holocénben 11600-9800 évvel ezelőtt és végül 4200-1800 évvel ezelőtt volt elterjedésre lehetsége a homoktövisnek.

4. Anyag és módszer

4.1. Növényanyag

A növényanyag a Genetika és Növénynemesítés Tanszéken található *Rhodiola* génbankból származik, ahol a növényanyagot -20°C -on fagyasztva tárolják. Huszonhat populációt vizsgáltunk. A populációk 11 ország területéről származnak. A populációkat és jelölésüket az 2. táblázat foglalja össze. Minden populációból 1-4 egyedemet emeltünk ki. A vizsgált populációkat térképen ábrázoltuk (6. ábra).



6. ábra: A vizsgált *Rhodiola rosea* populációk földrajzi elhelyezkedése. A: Az összes európai és ázsiai minta származási helye, B: A közép-európai minták származási helye (részletes).

2. táblázat: A vizsgált *Rhodiola rosea* populációk földrajzi elhelyezkedése.

Ország	jelölés	tájegység
Andorra	VI	Juclar, Pireneusok
Svájc	M	Mattmark, Alpok
	N	Val de Nomnom
Olaszország	VF	Val Fredda, Alpok
	PG	Passo di Gavia, Alpok
	F	Fedaia see, Alpok
	To	Tonale, Alpok
	E	Erdemolo, Alpok
	P	Präblichl, Alpok
Ausztria	Z	Zirbitzkogel, Alpok
	Hk	Hochkar, Alpok
	Ua	Unteralpe, Alpok
	CHP	Chopok, Kárpátok
Szlovákia	MD	Mengusovska Dolina, Kárpátok
	Lo	Lomnic, Kárpátok
	T	Tátra, Kárpátok
	Fog	Fogarasi-havasok, Kárpátok
Románia	Ke	Kelemen-havasok, Kárpátok
	CS	Cindler, Szebeni havasok, Kárpátok
	N1	Észak-Skandinávia
Norvégia	N2	
Oroszország	U1	Észak Ural,
	U2	Dél Ural,
	U3	Altai,
	U4	Novaja Zemlja,
Finnország	K	Kilpisjärvi
Kirgizisztán	A	Ala Archa
Egyesült Királyság	W	Wales

4.2. DNS-kivonás

A DNS-t fagyasztott levelekből Xu és munkatársai (2004) protokolja alapján vontuk ki. A kapott oldat DNS koncentrációját NanoDrop (Bioscience, Budapest) készülékkel határoztuk meg, majd 1 %-os TBE agaróz gélen ellenőriztük a minőségét.

4.3. PCR-vizsgálat

A PCR-vizsgálathoz Strand és munkatársai (1997) által leírt univerzális primerpárt használtuk. A forward primer: 5'-AGGAAAAATTCAAGCGCATG-3' (*CHSx1F*), míg a reverz primer: 5'-TTCAGTCAAGTGCATGTAACG-3' (*CHSx2RN*) volt.

A reakciót 25 µl végtérfogatban mértük össze melyhez 1 µl DNS-t (20-50 ng) használtunk. A mixhez 0,05 µl Dream *Taq* polimerázt (0,25 U) használtunk fel, továbbá 2,5 µl tízszeres hígítású puffert, 0,5 µl dNTP-t (10 mM), 0,8 µl forward illetve reverz primer-t (10 mM), végül 18,53 µl milliQ vízzel egészítettük ki.

A polimeráz láncreakció 94°C-on denaturációval kezdődött mely 3 percig tartott, majd 35 cikluson keresztül 45 másodpercig 94°C-on denaturáció, 60 másodpercig 49°C-on primer bekötődés, és 90 másodpercig 72°C-on elongáció követik egymást, végül további 6 percig 72°C-on tartottuk PCR csöveket.

A reakció után a sikeres amplifikációt először etidium bromiddal festett 1 %-os TBE agaróz gélen ellenőriztük, 50 cm³-es kádakban, 70 V-on, 40 percig. A fragmensek méretének megállapításához 100 bp-os létrát használtunk (GeneRuler, Fermentas, Biocenter). A fragmenseket UV fényel megvilágítva tettük láthatóvá (Bio-Rad, Budapest). A gélről képet készítettünk.

4.4. Detektálás

4.4.1 Elválasztás metaforagaróz gélen

A sikeres PCR után a fragmenseket metaforagaróz gélben választottuk el. A PCR termékeket etidium bromiddal festettük, majd 1 % TBE metaforagaróz gélben 120 cm³-es kádban, 180 percen keresztül választottuk el a fragmentumokat, 100 V-on. A fragmensek méretének megállapításához 100 bp-os létrát használtunk (GeneRuler, Fermentas, Biocenter). Végül UV fény alatt ellenőriztük az eredményt (Bio-Rad, Budapest). A gélről képet készítettünk.

4.4.2 SSCP vizsgálat

A kapott PCR termékeket végül natív poliakrilamid gélben futtattuk meg. A gélhez egy 70 ml végtérfogatú elegyet mértünk össze, amely 18 ml 40 % bisakrilamidot, 3 ml 10 %-os TBE puffert valamint 49 ml desztillált vizet tartalmazott. Az elegyet szűrőpapír segítségével szűrtük, majd 130 µl TEMED-et (tetrametilén etiléndiamin) és 310 µl APS (ammónium peroxidilszulfát) adtunk hozzá, melyek jelenlétében polimerizálódik a gél. A futtatást hidegszobában 4°C-on végeztük. Egy 30 perces előfuttatás után a zsebekbe 12 µl mintát vittünk fel, amihez megelőzően azonos mennyiségű FDE festéket kevertünk. A futtatást 200 V-on történt, egyszer 20 órán át, majd a további futtatások alkalmával 10 órán át. A géleken ezüstfestéssel tettük láthatóvá a sávokat, majd 12 %-os glicerinbe tettük el a géleket.

4.4.3. Adatértékelés

A géleket átvilágító asztalon értékeltük. Az eltérő allélokat azonosítottuk, és betűkóddal láttuk el. Azokat az ssDNS-eket értékeltük különbözőnek, melyek jól láthatóan eltérő helyzetben voltak a gélen. Excel-táblázatban összesítettük az egyes típusokat. Továbbá leolvastuk a gélről, mely egyedek bizonyultak hetero- és melyek homozigótának. Megállapítottuk, mely haplotípusok illetve allélok voltak a leggyakoribbak és melyek fordultak elő csak egy adott területen. Végül térképen ábrázoltuk őket.

5. Eredmények és megvitatásuk

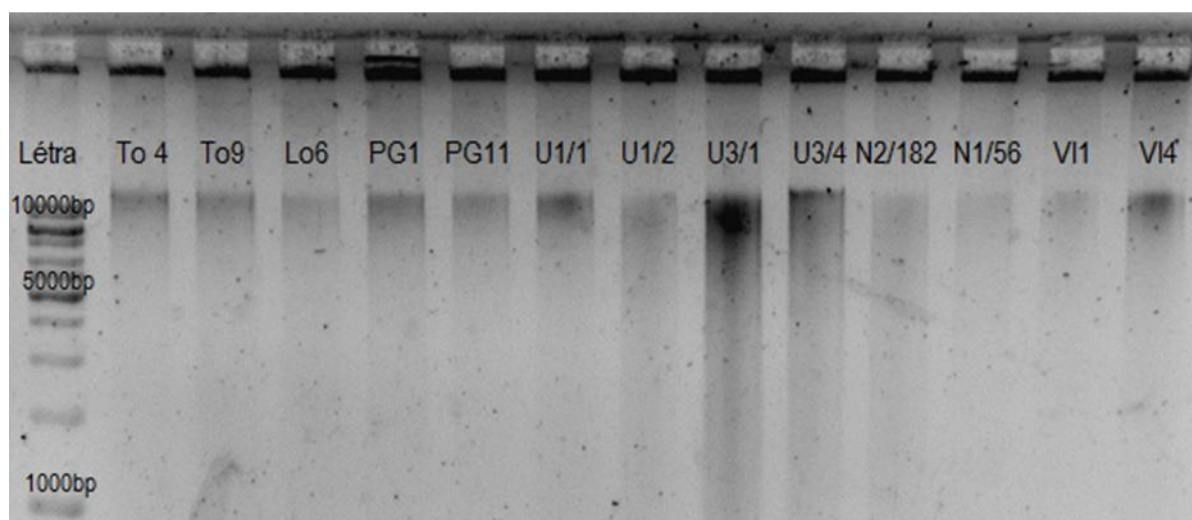
5.1 DNS kivonás

A kivont DNS mennyiségét Nanodrop készülékkel (BioScience, Budapest) ellenőriztük. Nem minden minta esetében kaptunk elegendő mennyiségű DNS-t. Általánosan elmondható, hogy a Xu protokoll (2004) alapján kivont minták megfelelő mennyiségű DNS-t tartalmaztak, és a protokoll jól alkalmazható a rózsagyökér esetében. Ez különösen fontos a másodlagos anyagcseretermékek jelenléte miatt, ami gyógynövények esetén sok esetben megnehezíti a DNS kivonást.

Sikertelen DNS kivonást a növényanyag minőségének tudtuk be, és másik egyedet választottunk az adott populációból, mellyel megismételtük a DNS kivonást többnyire már sikerrel. A néhány korábbi kivonásból származó minta kevesebb DNS-t tartalmazott. Ennek oka lehetett, hogy néhány esetben különböző kitékkel történt a DNS izolálás és a kiték mindig alacsonyabb koncentrációjú DNS oldatot eredményeznek. Ennek ellenére ezeket a mintákat is használni tudtuk a továbbiakban.

A 260 és 280 nm hullámhosszon mért értékek hányadosa adja az R értéket. Ha a 1,7 és 2,0 közé esik akkor a DNS oldat tisztának tekinthető. 1,7 alatt fehérjével, 2,0 felett pedig RNS-el szennyezett az oldat (Sambrook *et al.*, 1989). A mért értékeket a 3. táblázat tartalmazza, ami alapján a minták megfelelően tisztának találtuk.

1% os TBE agaróz gélen elválasztva a mintákat megbizonyosodtunk, hogy a DNS-ek nem töredezték, jó minőségűek, és PCR vizsgálatra alkalmasak (7. ábra).



7. ábra. Tizennégy kivont DNS elektroforetikus képe 1 %-os TBE agaróz gélen.

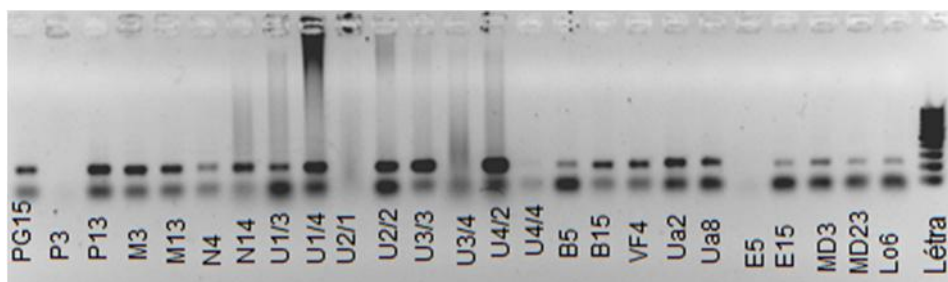
3. táblázat. A kivont DNS-ek mennyisége és minősége.

Minta	ng/ul	A260	A280	260/280
S16	8,74	0,175	0,094	1,85
S18	24,4	0,488	0,268	1,82
S6	8,82	0,176	0,123	1,44
S2	9,12	0,182	0,13	1,4
Fog6	14,74	0,295	0,205	1,44
Fog1	12,79	0,256	0,179	1,43
K6-5	204,2	4,084	2,042	2
K3-1	92,43	1,849	0,968	1,91
U3/3	246,96	4,939	2,351	2,1
U3/4	54,85	1,097	0,555	1,98
U3/1	173,81	3,476	1,762	1,97
U1/2	205,46	4,109	2,027	2,03
U1/1	174,89	3,498	1,848	1,89
U4/2	145,59	2,912	1,424	2,04
U4/1	73,83	1,477	0,732	2,02
U2/4	51,83	1,037	0,49	2,12
U2/2	85,89	1,718	0,88	1,95
T2	437,13	8,743	4,047	2,16
CS4	350,96	7,019	3,621	1,94
CS1	137,57	2,751	1,294	2,13
LO4	534,7	10,694	4,992	2,14
Lo6	287,88	5,758	2,751	2,09
F14	757,81	15,156	6,844	2,21
F4	360,28	7,206	3,239	2,22
Z14	367,09	7,342	3,36	2,19
MD13	316,28	6,326	2,915	2,17
VI1	501,28	10,026	4,658	2,15
Ke4	654,44	13,089	7,009	1,87
CHP8	697,18	13,944	6,371	2,19
CHP21	174,47	3,489	1,797	1,94
N1/65	91,71	1,834	0,854	2,15
To9	342,22	6,844	3,146	2,18
To4	305,75	6,115	2,821	2,17
PG1	519,97	10,399	4,867	2,14
PG11	105,68	2,114	0,993	2,13
W18	589,21	11,784	5,53	2,13
W16	62,67	1,253	0,58	2,16
CP4	403,03	8,061	2,436	3,31
N2/182	51,22	1,024	0,477	2,15
M13	70,16	1,403	0,659	2,13
M3	8,48	0,17	0,133	1,27
N1	15,23	0,305	0,165	1,84
N4	6,83	0,137	0,08	1,7

Minta	ng/ul	A260	A280	260/280
N14	4,6	0,092	0,097	0,95
N15	12,67	0,253	0,172	1,47
Ua3	12,63	0,253	0,18	1,4
AA6	99,66	1,993	0,936	2,13
VF14	9,53	0,191	0,128	1,49
VF4	7,83	0,157	0,127	1,23
HK6	8,93	0,179	0,129	1,39
HK1	13,28	0,266	0,142	1,87
P40	68,45	1,369	0,618	2,22

5.2 PCR-vizsgálat

Az alkalmazott primerpár a legtöbb esetben amplifikálta a *Rhodiola rosea* *CHSi* régióját. Néhány minta esetében nem kaptunk fragmentumot, így ezeket a mintákat a továbbiakban kihagytuk a kísérletből. A fragmentumok egyösszesen ~210-230 bp hosszúság közé estek (8. ábra), míg Bartish és munkatársai (2006) homoktövis *CHSi* vizsgálatakor ugyan ezen primer párral 628 és 778 bp hosszúság közti fragmentumokat kaptak. Strand és munkatársai (1997) több faj esetében is vizsgálták az általuk tervezett *CHS* intron régiót határoló primerpárt. Eredményeik szerint 150 és 1200 bp között változott a különböző fajok estében az amplifikált fragmentum méret.

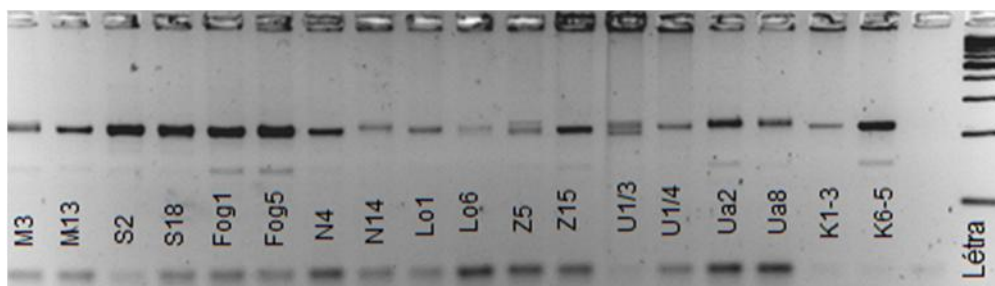


8. ábra. A PCR során amplifikált kalkonszintáz intron fragmentumok agaróz gélen elválasztva.

5.3. Detektálás

5.3.1. Elválasztás metaforagarózgélen

Metaforagaróz gélen elválasztva szintén ~210-230 bp hosszúságú fragmentumokat láttunk a gélen (9. ábra). A fragmentumok között már láthatóvá váltak méretbeli különbségek, sok esetben homo- és heterozigótákat is el tudtunk különíteni. Ezeket a különbségeket még nem találtuk elegendőnek különböző haplotípusok elkülönítéséhez, bármilyen sokáig tartott az elválasztás.

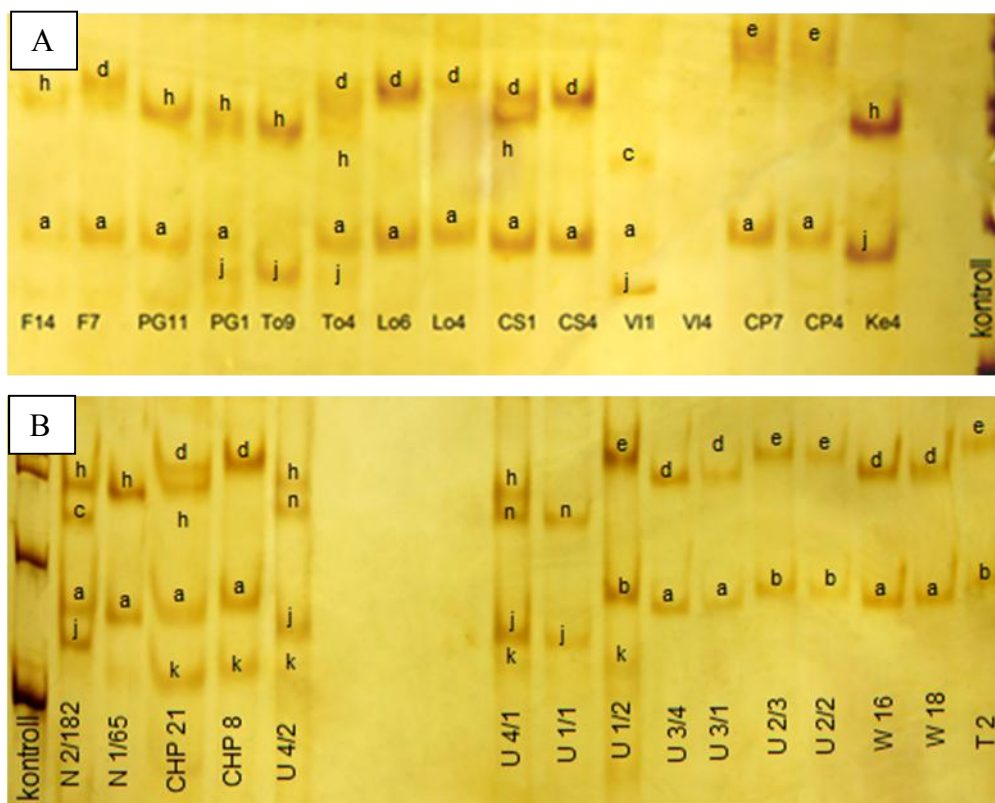


9. ábra A PCR során amplifikált kalkonszintáz intron szekvenciák metaforagaróz gélen elválasztva.

5.3.2. SSCP vizsgálat

Natív akrilamid gélen 20 h elválasztás után nem láttunk a gélen egy fragmentumot sem. Tíz óra elválasztás után a gélen majdnem minden minta esetében meg tudtunk számolni 2-4 sávot (10. ábra). Néhány esetben, bár agaróz gélen láttunk PCR terméket, az akrilamid gélen nem láttunk fragmentumot, így ezeket a mintákat ki kellett hagynunk. Ilyen például VI4-es minta a 10./A ábrán.

Az SSCP módszert alkalmasnak találtuk a különböző *CHSi* haplotípusok azonosítására, ahogyan azt Strand és munkatársai (1997) is ajánlották. Igen polimorf mintázatot kaptunk, amint az a 10. ábrán is megfigyelhető.



10. ábra A és B: A kalkonszintáz intron szekvenciák SSCP módszerrel elválasztva 8%-os akrilamid gélen, az egyes ssDNS-ek betűkoddal ellátva.

5.3.3. Adatértékelés:

Végül 56 rózsagyökér minta esetében kaptunk kiértékelhető adatot. Az allélokat betűjellel ellátva, 19 haplotípust azonosítottunk összesen 11 allél kombinációjaként. A 4. táblázatba foglaltuk össze a haplotípusokat és az 5. táblázatban az egyes allélokat, majd kiszámítottuk mely haplotípusok illetve allélok a leggyakoribbak.

4. táblázat. A *Rhodiola rosea* populációkban azonosított haplotípusok, és relatív gyakoriságuk.

Haplotípus	Egyed	Haplotípus relatív gyakoriság
a,d,	E3, Fog6, H1-1, H3-4, K3-6, K6-5, M13, S16, S18, Ua3, W18, W16, U 3/4, U 3/1, CS4, Lo4, Lo6, F7, Z14, MD13	0,385
a,j,d,h	HK1, HK6, P40, S6, To4	0,096
a,d,k,h	CHP 21	0,019
a, d, k, ?	CHP 8	0,019
a,b,d,e	M3	0,019
a,d,e,?	Fog1, N4	0,039
a,d,h,?	S2, CS1	0,039
a,h	PG11, F14, Ke4, N 1/65	0,077
j,h	AA6, To9	0,039
j, n	U 1/1	0,019
h,j,i,d	VF14, VF4	0,039
h,n,j,k	U 4/1, U 4/2	0,039
j,a,c,h	N 2/182	0,019
b,k,e,?	U1/2	0,019
j,a,c,?	VII	0,019
b,e	N1, N15, U 3/3, U 2/2, U 2/3, T2	0,115
a,e	CP7, CP4	0,038
m,l	N14	0,019
a, h, j, ?	PG1	0,019

5. táblázat : A *Rhodiola rosea* populációkban azonosított ssDNS-ek, és relatív gyakoriságuk.

ssDNS	Egyed	allél relatív gyakorisága
a	PG11, S16, S18, S2, S6, To4, U 3/1, U 3/4, Ua3, VII, W16, W18, Z14, P40, N4, N 2/182, N 1/65, E3, F14, F7, Fog1, Fog6, H1-1, H3-4, HK1HK6, K3-6, K6-5, Ke4, Lo4, Lo6, M13, M3, MD13, CS1, CHP8, CHP21, CS4, CP4, CP7	0,280
d	H1-1, Lo4, MD13, N4, S16, To4, S18, S2, S6, P40, Lo6, M13, M3, H1-1, H3-4, HK1, HK6, K3-6, K6-5, U 3/1, U 3/4, Ua3, VF14, W16, VF4, W18, Z14, E3, Fog6, CS4, CS1 F7, Fog1	0,231
j	AA6, HK1, HK6, N 2/182, P40, PG1, S6, To4, To9, U 1/1, U 4/1, U 4/2, VF14, VF4, VII	0,105
h	AA6, CS1, F14, HK1, N 1/65, N 2/182, P40, PG1, PG11, S2, S6, To4, To9, U 4/1, U 4/2, VF14, VF4, CHP 21, HK6, Ke4	0,140
b	M3, N1, N15, T2, U 2/2, U 2/3, U 3/3, U1/2	0,056
e	U 3/3, U 2/3, U 2/2, U 1/2, T2, N4, N15, N1, Fog1, M3, U1/2, CP4, CP7	0,091
g	N14,	0,007
c	N14, N 2/182, VII	0,021
n	U 4/1, U 4/2, U1/1	0,021
i	VF14, VF4	0,014
k	CHP21, CHP8, U 4/2, U 4/1, U1/2	0,035

Az SSCP gélen látható eltérő ssDNS-ek eltérő szekvenciát jelentenek, melyek nem az eltérő méretből adódnak. Az elválás mértéke az ssDNS alakjától függ, aminek hátterében az eltérő nukleotid sorrend áll.

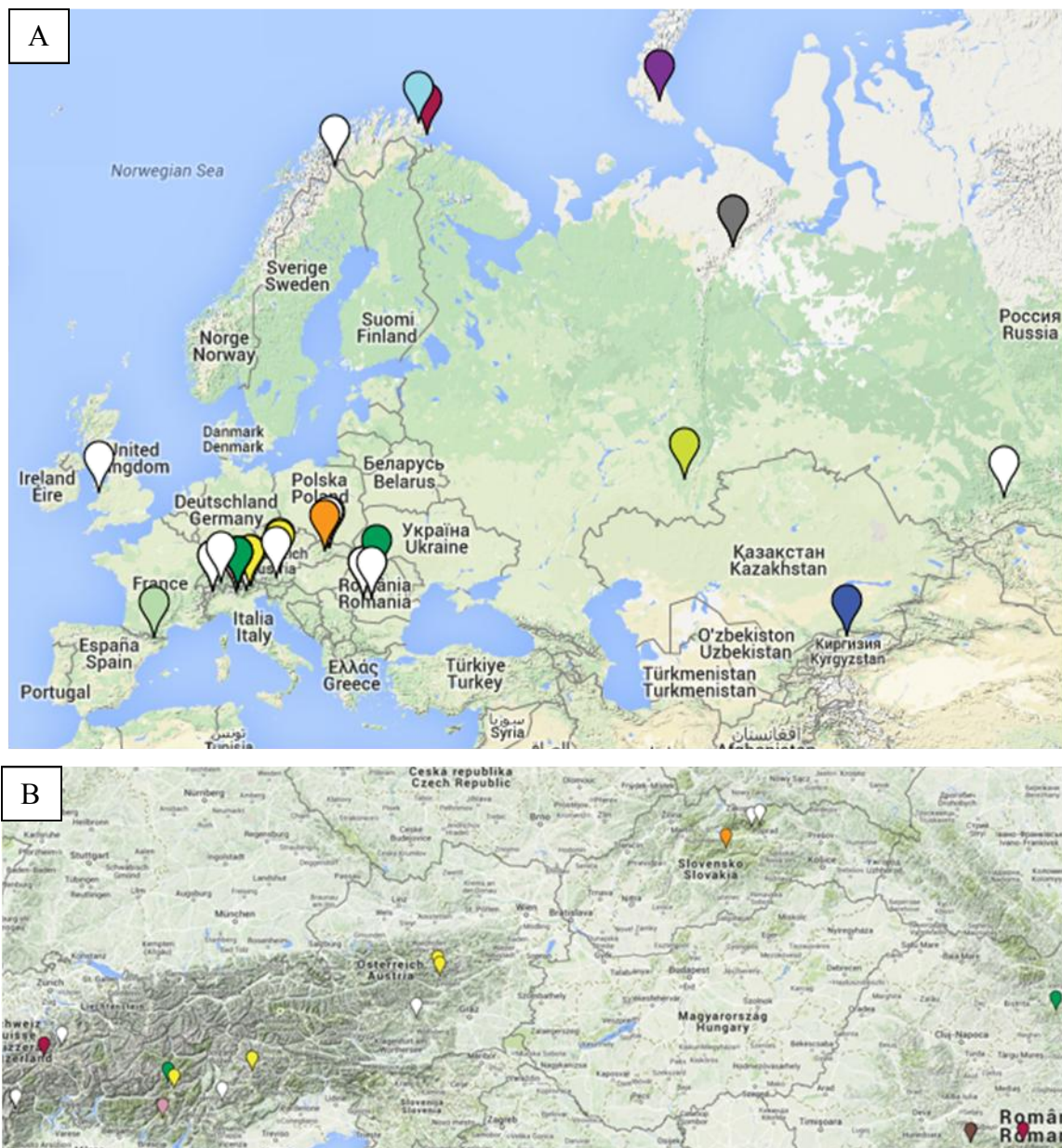
A leggyakoribb allél az 'a' jelű volt ez összesen 38 egyednél fordult elő az összes 56 közül. Szintén gyakori allél volt még a 'd' (26 egyednél) 'h' (21 egyednél) 'j' (15 egyednél) allélok. Az 'm', 'l', 'c' és 'g' allélok csak egy-egy populációban fordultak elő.

13 egyedről biztosan meg tudtuk állapítani, hogy heterozigóták, ezekben az esetekben a két eltérő allél négy ssDNS-ként jelent meg a gélen. Egyes egyedeknél három fragmentumot láttunk a gélen. Ezek lehetnek heterozigóták, melyeknek nem volt elég hosszú a futtatás ideje a négy fragmentum tökéletes szétválásához, de előfordulhatott az is, hogy a denaturáció nem történt meg tökéletesen, és két ssDNS mellett egy dsDNS is megjelent. 37 db biztosan homozigóta egyedet találtunk.

A leggyakoribb haplotípus az 'a' és 'd' ssDNS-eket tartalmazó homozigóta volt, majd ezt követték az 'a', 'j', 'd', 'h' fragmentumokat tartalmazó heterozigóták. Néhány haplotípus csupán egy populációban fordult elő így a 'a,b,d,e' (M3 – Mattmark, Svájc) és 'b,k,e,?'

(U1/2 – Észak Ural) és 'j,a,c,h' (N 2/182 - Norvégia) és 'j,a,c,?' (VI1 – Juclar, Andorra) és 'm,l' (N14 - Nomnom) és 'a,d,k,h' és 'a,d,k, ?' (CHP21és CHP8-Chopok), valamint az 'a, h, j, ?' (PG1-Passo di Gavia).

A 11. ábra színekkel jelöltük az egyes haplotípusokat. A haplotípusok előfordulása nem mutatott jellegzetes mintázatot. A leggyakoribb haplotípus 'a,d' (fehér) elszórva szinte minden területen előfordult. Többnyire megállapítható, hogy az azonos populációból származó egyedek azonos allélokkal rendelkeztek, ennek megerősítésére szolgálhatna a *CHSi* populáción belüli diverzitás vizsgálata SSCP módszerrel.



11. ábra: A *CHSi* haplotípusok földrajzi elhelyezkedése. A: Az összes európai és ázsiai minták, B: A közép-európai minták (részletes).

Bartish és munkatársai (2006) a homoktövis *CHSi* szekvencia vizsgálatakor hat fő *CHSi* vonalat azonosított, melyek között a genetikai diverzitás nagyobb volt, mint a csoportokon belül. Ezek a csoportok földrajzilag is el különülnek. Tanulmányuk alapján a homoktövis az eljegesedések során újra meg újra visszahúzódni kényszerült, majd a felmelegedések idején elterjedt. Így négy időszakot azonosítottak, amikor a kedvező körülmények lehetőséget adtak a homoktövis elterjedésére. A populációk visszaszorulásával a genetikai sokféleség csökkent, és az újra felmelegedéskor a megmaradt haplotípusok terjedtek el. A földrajzi elkülönülés megfigyelésével az elterjedési útvonalakat is azonosították.

György és munkatársai (2014) az Európa magashegységeiben élő *Rhodiola rosea* populációk SSR markerekkel történő vizsgálatakor azt találták, hogy a populációk közötti genetikai diverzitás nem nagyobb jelentősen, mint a populáción belüli, illetve nem figyelték meg a haplotípusok földrajzi elkülönülését. Eredményüket magyarázhatja Ronikier (2011) elmélete, mely szerint a Pireneusok, Alpok és Kárpátok a Negyedidőszak előtt egy vonulatot alkottak és egyes magashegyi populációk olyan közel helyezkedtek el egymáshoz, hogy a génáramlás könnyen végbemehetett. Később az eljegesedés és földmozgások hatására a hegységek elkülönültek egymástól. Ennek eredménye képpen egyes fajok távoli populációinak genetikai állománya hasonlít.

Eredményeink megerősítik György és munkatársai (2014) mikroszatellit markerekkel végzett vizsgálatának eredményét, mely szerint nem alakultak ki az egyes régiókra jellemző haplotípusok, hanem nagyfokú diverzitás figyelhető meg a populációk között és a populációkon belül. Néhány esetben találtunk kimondottan egy populációra jellemző haplotípusokat, de többségében megmaradt a populációk közötti változatosság, szemben Bartish és munkatársainak a homoktövis *CHSi* vizsgálatával, ahol földrajzilag elkülönült csoportokat azonosítottak.

6. Összefoglalás

A *Rhodiola rosea* adaptogén hatású gyógynövény, mely Kelet Európában, a Skandináv térségben, Közép- és Észak-Ázsiában, valamint Észak-Amerikában a tradicionális gyógyászt már régóta alkalmaz. Mára számos klinikai tanulmány igazolta, hogy erősíti az immunrendszert, növeli a teljesítőképességet, csökkenti a stressz okozta károkat, fokozza az ellenálló képességet. A fajon belüli fenotípusosan tapasztalható diverzitás felveti a genetikai diverzitás vizsgálatának szükségességét.

Munkánk során Európa és Oroszország területéről 26 populáció 56 egyedét vizsgáltuk. Strand és munkatársai (1997) a kalkonszintáz intronjára fejlesztett primerpárjával végeztünk PCR-t. Megközelítőleg 210-230 bp hosszúság fragmentumokat kaptunk. A fragmentumokat előbb metaforagaróz gélen választottuk el, ahol ugyan láttunk különbségeket, de nem tudtunk biztos haplotípusokat elkülöníteni. Ezért az egy pontos nukleotid polimorfizmusok kimutatására kiválóan alkalmas SSCP technikát alkalmaztuk. A poliakrilamid géleket átvilágító asztalon manuálisan értékeltünk ki.

Megállapíthatjuk, hogy sikeresen vontunk ki DNS-t Xu és munkatársai (2004) protokollja alapján, és hogy a Strand és munkatársai (1997) által leírt primerek alkalmasak a *Rhodiola* kalkonszintáz intron amplifikálására.

Az SSCP vizsgálattal igen polimorf mintázatot kaptunk. 56 rózsagyökér minta esetében 19 haplotípust azonosítottunk összesen 11 ssDNS kombinációjaként. A gélen megjelenő fragmentek alapján 13 heterozigótát, és 37 homozigóta egyedet azonosítottunk. A leggyakoribb az 'a' és 'd' ssDNS-ett tartalmazó homozigóta volt, melyről megállapítottuk, hogy elsősorban szinte minden területen előfordult.

Térképen ábrázolva megfigyelhető, hogy a populációk nem alkotnak földrajzilag elkülönült csoportokat, hanem az egyes haplotípusok szórtan helyezkednek el. Néhány esetben találtunk kimondottan egy populációra jellemző haplotípusokat, de általánosan megállapítható, hogy nagyfokú diverzitás figyelhető meg a populációk között.

Ezek az eredmények egybevágóak György és munkatársai (2014) azonos növényanyagon végzett SSR vizsgálatának eredményeivel, de ellentétben állnak Bartish és munkatársai (2006) homoktövis *CHSi* vizsgálatával, ahol földrajzilag elkülönült csoportokat azonosítottak.

Az azonos populációkból származó egyedek gyakran azonos allélokat tartalmaztak, ennek megerősítésére a továbbiakban a populációkon belüli *CHSi* diverzitás vizsgálatra lenne szükség SSCP módszerrel a rózsagyökér esetén.

7. Irodalomjegyzék

1. Arbeola, A., Daorden, M.E., Garcia, E., Wunsh, A., Hormaza, J.I., Marín, J.A. (2006) Significant effect of accidental pollinations on the progeny of low setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica* 147:389-394.
2. Arnholdt-Schmitt, B., Herterich S., Neumann K.H. (1991) Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase – dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. *Theoretical and Applied Genetics* 91:809-815
3. Åsdal, A. (2004) Conserving the Genetic Resources of Spice and Medicinal Plants. *Nordic Genetics resources*. 14-15.
4. Bartish, I.V., Kadereit, J.W., Comes, H.P., (2006) Late Quaternary history of *Hippophaë rhamnoides* L.(*Elaeagnaceae*) inferred from chalcone synthase intron (Chsi) sequences and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* Volume 15, 4065–4083
5. Bisztray, Gy. D. (2001) A genom összetétele. In: I. Velich(szerk): *Növénygenetika*. Mezőgazda Kiadó , Budapest. 407-431 o.
6. Boon-Niermeijer, E.K., van den Berg, A., Wikman, G., Wiegman, F.A. (2000) Phytoadaptogens protect against environmental stress-induced death of embryos from the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Phytomedicine*. 7(5): 389-99.
7. Bornet, B., Branchard, M. (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 209-215.
8. Brown, M.D., Gerbarg, P.L., Ramazanov, Z. (2002) *Rhodiola rosea*: A Phytomedicinal Overview *HerbalGram*.56:40-52
9. Brunel, D. (1994) A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology Reporter*,. 24:397-400.
10. 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*. 7:365-71.
11. 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. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. 36. 706-715.
12. Furmanowa, M., Kedzia, B., Hartwich, M., *et al.* (1999) Phytochemical and pharmacological properties of *Rhodiola rosea* L. *Herba Polonica*, 45 (2), 108-113.

13. 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.
14. Galambosi, B. (2006) Demand and availability of *Rhodiola rosea* L. in raw material. In *Medicinal and Aromatic Plants*. Netherland: Springer. 16, 223-236.
15. Gao, Q., Zhang, D., Chen, S., Duan, Y., Zhang, F., Li, Y., Chen^a, S.(2009). Chloroplast DNA phylogeography of *Rhodiola alsaia* (Crassulaceae) in the Qinghai–Tibet Plateau, *Botany*, 87(11): 1077-1088,
16. Griesbach, R.J., Beck, R.M. (2005) Sequence Analysis of Chalcone Synthase Gene Intron in Four *Petunia* Jussieu Taxa. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(3):360-365
17. Griesbach, R.J., Beck, R.M., Stehmann, J.R. (2000) Molecular Heterogeneity of the Chalcone Synthase Intron in *Petunia* HortScience 35:7 1347-1349
18. Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., Ramesh, B. (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118:369-390
19. György, Z., Derzsó, E., Galambosi, B. (2009) Finnországi *Rhodiola rosea* populációk diverzitásának vizsgálata ISSR markerekkel. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, Október 28-30. Budapest.
20. György, Z., Fjellidal, E., Ladányi, M., Aspholm, P. E., Pedryc, A. (2013) Genetic diversity of roseroot (*Rhodiola rosea*) in North-Norway. In: *Biochemical Systematics and Ecology* 50:361-367.
21. György, Z., Jaakola, L., Neubauer, P., Hohtola A. (2009) Isolation and expression analysis of a *Rhodiola rosea* tyrosine decarboxylase cDNA. *Journal of Plant Physiology* 14:1581-1586.
22. György, Z., Vouillamoz, J.F., M., Ladányi, M., Pedryc A. (2014) Genetic survey of *Rhodiola rosea* L. populations from the Swiss Alps based on SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 54:137–143
23. György, Zs., Szabó, M., Bacharov, D., Pedryc, A. (2012) Genetic Diversity Within and Among Populations of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) Based on Molecular Markers. In: *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40. 2:266-273.
24. György, Z. (2006): Glycoside production by in vitro *Rhodiola rosea* cultures. Oulu University Press, Oulu, Finland.
25. Hajós, N.M. (1999) Genetikai variabilitás a növénynevelésben. Mezőgazda Kiadó,

Budapest, 142

26. Guest J. H., (2001) Systematic and phylogeographic implications of molecular variation in the western North American roseroot, *Rhodiola integrifolia* (Crassulaceae). University of Victoria in the Department of Biology
27. Kakavas, V.K., Plageras, P., Vlachos, T.A., Papaioannou, A., Noulas, V.A., (2008) PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular Biotechnol.* 38(2):155-63.
28. Kelly, G. S. (2001) *Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen. *Alternative Medicine Review* 6:293–302.
29. Kiss, E. (2005) XI. Molekuláris növénynevelés. 194-210. In: (Heszky, L., Fésüs, L., Hornok, L. eds.). *Mezőgazdasági Biotechnológia*. Agroinform Kiadó, Budapest,
30. Kiss, Gy. B., Endre, G. (1999) Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. *Molekuláris növénybiológia* In: (Balázs Ervin, Dudits D. eds.) Budapest Akadémiai Kiadó 37-91.
31. 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.
32. Kylin, M. (2010) Genetic diversity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) from Sweden, Greenland and Faroe Islands. Diplomamunka, Alnarp, Svédország. MSc thesis <http://stud.epsilon.slu.se/2049/>
33. Kurkin VA, Zapesochneya GG. Chemical composition and pharmacological properties of *Rhodiola rosea*. *Chemical and Pharmaceutical Journal* (Moscow) 1986;20(10):1231-44.
34. Kurkin VA, Zapesochneya GG. Chemical composition and pharmacological characteristics of *Rhodiola rosea* [review]. *Journal of Medicinal Plants*, Russian Academy of Science, Moscow 1985;1231-445
35. Lee, M.W, Lee, Y.A., Park, H.M., Toh, S.H., Lee E.J., Jang H.D., Kim Y.H., Bor, A. (2000) Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis*, *Archives of Pharmacal Research* 23: 455–458
36. Lei, Y., Gao, H., Tsering, T., Shi, S., Zhong, Y. (2006) Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan Mountains Region, China using inter-simple sequence repeats. In: *Genetics and Molecular Biology*. 29. 2:339-344.
37. Liechti-Gallati, S., Schneider, V., Neeser, D., Kraemer, R., (1999) Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation

- screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *European Journal of Human Genetics* 7(5):590-8.
38. Ma, L.Q., Gao, D.Y., Wang, Y.N., Wang, H.H., Zhang, J.X., Pang, X.B., Hu, T.S., Lu, S.Y., Li, G.F., Ye, H.C., Li, Y.F., Wang, H. (2008) Effects of overexpression of endogenous phenylalanine ammonia-lyase (PALrs1) on accumulation of salidroside in *Rhodiola sachalinensis*. *Plant Biology* 10:323–333
 39. Malnoe.P., Carron P.C., Vouillamoz, J. F. (2009) L'orpin rose (*Rhodiola rosea* L.), une plante alpine anti-stress. *Revue suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* 41 (5): 281-286, 2009
 40. Maroof M.A.S., Biyashev, R. M., Yang, P.G., Zhang, Q., and Allard, R. W. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 7;91(12):5466–5470.
 41. Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993) Technical advance PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3(1): 175-182
 42. Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology* 155:335-50.
 43. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989) Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (86): 2766-70.
 44. 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. Ethnopharmacol.* 67, 111-119.
 45. Paterson, A.H., Lander, R.E., Hewitt, J.D., Paterson, S., Lincoln, S.E., Tanksley, S.D. (1988) Resolution of quantitative trait traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction length polymorphism. *Nature* 335: 721-726
 46. Pedryc, A.P., Bisztray, Gy.D., Ruthner, Sz., Laimer, M. (2006) Characterization of different apricot cultivars grown in Hungary with SSR markers. V. International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. 2004. september 12-17., Debrecen, Hungary
 47. Platikanov, S., Evstatieva, L. (2008) Introduction of Wild Golden Root (*Rhodiola rosea* L.) as a Potential Economic Crop in Bulgaria. *Economic Botany*, 62, 4: 621-627
 48. Priszter Szaniszló. (1999) Növényneveink: A magyar és a tudományos növénynevek

szótára. Budapest: Mezőgazda Kiadó

49. Reddy, P. M., Sarla N., Siddiq, E. A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128, 9-7.
50. Reif, H., Niesbach, U., Deumling, B., Saedler, H. (1985) Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *Molecular and General Genetics*, 199, 208–215.
51. Rohloff, J. (2002) Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L. *Phytochemistry* 59:655-661.
52. Ronikier, M. (2011) Biogeography of high-mountain plants in the Carpathians: An emerging phylogeographical perspective. In: *Taxon*. 60. 2: 373-389.
53. Saiki R. K., Gelfand D.H., Stoffe .S, Scharf S., (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science*, 239, pp. 487–491
54. Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
55. Semagn K., Bjornstad Å., Ndjiondjop M. N. (2006): An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5:2540-2568.
56. Senior, M. L, Chin, E. C. L., Lee, M. J., Smith S. C., Stuber, C.W. 1996, Simple Sequence Repeat Markers Developed from Maize Sequences Found in the GENBANK Database: Map Construction. *Crop Science* 36:1676-1683
57. Strand, A. E., Leebens- Mack, J. B., Milligan G. (1997) Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology, *Molecular Ecology* 1997, 6, 113–118
58. Tutin, T. G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (1972) *Flora Europaea*. 3. *Diapensiaceae to myoporaceae*. Cambridge
59. Valev, S. (1970) Genus *Rhodiola* L.. in D. Jordanov, ed., *Flora Reipublicae Popularis Bulgaricae* 4, Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria. 619–620
60. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407–4414.
61. Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. and Lathrop, M. (1992) A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359:794-801.
62. Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.

63. White, R., Wyman, A. R. (1980) A Highly Polymorphic Locus in Human DNA
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1980
77: 6754-6758.
64. Winkel-Shirly, B. (2001) Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics,
Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology Plant Physiology 126. 2:485-493
65. Xu, Q., X. Wen, X., Deng, X. (2004) A simple protocol for isolating genomic DNA from
chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt.) for RFLP and PCR analyses. Plant Molecular
Biology Reporter 22: 301-302.
66. Yanbaev, A. Y., Bairamuglov, N. R., Redkina, N. N., Mullagulov, R, Y., (2007)
Differentiation among Populations of the *Rhodiola iredelica* Boriss. (Crassulaceae) in the
Southern Urals. In: Russian Journal of Genetics. 43. 11: 1314-1318.
67. You, J., Liu, W., Zhao, Y., Zhu, Y., Zhang, W., Wang, Y., Lu, F., Song, Z. (2013)
Microsatellite Markers in *Rhodiola* (Crassulaceae), a Medicinal Herb Genus Widely Used
in Traditional Chinese Medicine Applications in Plant Sciences 1 (3): 1200219
68. Zini, E., Clamer, M., Passerotti, S., Vender, C., Vendramin, G. G., Komjanc, M. (2009)
Eight novel microsatellite DNA markers in *Rhodiola rosea* L. In: Conservation Genetics.
10. 5: 1397-1399.

8. Köszönetnyilvánítás

Munkám során rengeteg segítséget kaptam.

Elsőként szeretnék köszönetet mondani Dr. Pedrycz Andrzej tanszékvezető úrnak, aki lehetővé tette a kísérletek elvégzését, és a dolgozat megszületését.

Köszönöm a Genetika és Növénynemesítés Tanszék dolgozóinak a segítségét, akik bármikor rendelkezésre álltak, hasznos tanácsokkal, és jó hangulattal támogatva a munkát.

Legtöbb segítséget témavezetőm Dr. György Zsuzsannának köszönhetem, aki türelmesen irányított a kezdetektől, szakértelmével és tanácsaival segítette a feladatok elvégzését.

DIPLOMAMUNKA LEADÁSI NYILATKOZAT¹

Alulírott Trócsányi Eszter (Neptun-kód: VN0PFM) nyilatkozom, hogy a A kalkonszintáz gén intron régiójának variabilitása a *Rhodiola rosea* L. faj esetén címen benyújtott diplomamunkám saját szellemi termékem. Tudomásul veszem, hogy a Dékáni Hivatalban határidőben történő bemutatás nem jelenti dolgozatom szakmai és tartalmi elfogadását.

Budapest, 2014 12.

Hallgató aláírása