

Zárójelentés az OTKA PD 83728: A rózsagyökér glikozid bioszintézisének genetikai vizsgálata pályázathoz

I. A *Rhodiola rosea* genetikai diverzitásának jellemzése európai élőhelyeken

A pályázati tervben vállaltam egy *Rhodiola rosea* génbank létrehozását, és a génbanki egyedek genetikai diverzitásának felmérését molekuláris markerekkel. A begyűjtött *Rhodiola rosea* minták egész Európa területéről származnak, a három nagy hegységből: az Alpokból, a Kárpátokból és a Pireneusokból, valamint Skandináviából (Finnország és Norvégia) illetve Ázsia nyugati részeiről. Összesen 369 egyedet vizsgáltunk, melyek 19 populációból származtak. A begyűjtött leveleket lefagyasztottuk és -20°C-on tároltuk.

Finnország két régiójából, összesen nyolc helyszínről gyűjtött rózsagyökér egyedek vizsgálatát végeztük el 5 ISSR markerrel. Alacsony genetikai variabilitást találtuk. A két régió (Halti és Kilpisjärvi) egyedei külön kládokba rendeződtek az UPGMA módszerrel készített törzsfán. Érdekes, hogy a Kilpisjärvi régióból származó egyedek két alcsoportba rendeződtek. Az egyik csoportba kizárólag az egyik (K6) élőhelyről gyűjtött egyedek voltak. Ez az élőhely elkülönül a többitől egyrészt, mert hegyoldalban van, míg a többi lent a tóparton, másrészt alacsonyabb ezen egyedek glikozid tartalma a többihez képest. Az egyedek vizsgálatát a 2009-ben publikált *Rhodiola rosea* specifikus mikroszatellit markerekkel is elvégeztük. Az amplifikált fragmentumokat poli-akrilamid gélen választottuk el. Ilyen körülmények között az összes egyedben ugyanakkora fragmentum méreteket azonosítottunk lókuszonként. Megállapítottuk, hogy vagy az SSR markerek nem elég variábilisak, vagy az akrilamid gélen történő elválasztás nem elégséges az esetlegesen különböző fragmentum méretek elkülönítésére vagy valóban nincs genetikai változékonyság ezekben a lókuszekben.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2012) *Acta Horticulturae* 955: 197-202.

Megvizsgáltuk négy, egymástól nagy távolságra lévő, oroszországi (É-Urál, D-Urál, Altáj, Novaja Zemlja) rózsagyökér populáció egyedeit mind SSR, mind ISSR módszerrel. Megállapítottuk, hogy a fent említett nyolc SSR lókuszból csak négy volt alkalmas a genetikai variabilitás felmérésére, a másik négy vagy nem megbízhatóan amplifikálódott vagy nem mutatott polimorfizmust. Az ISSR vizsgálat során 7 primert használtunk. Mindkét technikával nyert adatok alapján törzsfákon ábrázoltuk a négy populációt. A két törzsfá hasonlón nézett ki. A legszorosabb kapcsolat az altáji és a novaja zemlja-i populációk között volt, míg mindkét esetben a dél-uráli populáció határozottan elkülönült. A Mantel teszt, amellyel ellenőriztük a két markerezési technikával kapott eredményeket szignifikánsan pozitív volt.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2012) *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40(2): 266-273.

Ishmuratova és mtsai (2004) valamint Yanbaev és mtsai., (2007) *R. iremelica*-ként írnak a Dél-Urálban élő rózsagyökér populációról. A *R. iremelica*-t Borissova (1939) írta le új fajként a Szovjet Flora műben. A különbség a két faj (*R. rosea* és *R. iremelica*) között a levelek alakjában, és a magok mérete alapján lett meghatározva. Mint már korábban említettük *R.*

rosea-ra nagy morfológiai variabilitás jellemző. A *Flora Europaea* szerint a *R. iremelica* csak egy szinonimája a *R. rosea*-nak. ITS szekvencia analízist végeztünk annak megállapítására, hogy a dél-uráli populációt alkotó növények valóban a *R. rosea* fajhoz tartoznak-e vagy a *R. iremelica*-hoz. Az NCBI GenBank-ban megtalálható *Rhodiola* fajok ITS szekvenciáit hasonlítottuk össze az általunk amplifikált és megszekvenált ITS régiókkal. Sajnos *R. iremelica* szekvencia nincs a génbankban. Megállapítottuk, hogy azokban a pozíciókban, ahol a *Rhodiola* fajok ITS szekvenciája eltérő, a négy vizsgált populáció egyedei között nincs különbség az ITS szekvenciákban. Ugyanakkor ez még nem bizonyítja egyértelműen, hogy a d-uráli egyedek valóban a *R. rosea* fajhoz tartoznak, ennek tisztázásához további vizsgálatokra van szükség.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2012) *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40(2): 266-273.

É-Norvégia partvidékén 10 élőhelyről gyűjtött rózsagyökér egyedeket vizsgáltunk a korábban említett nyolc SSR markerrel. Újra megállapítottuk, hogy a nyolc markerből csak négy alkalmas a genetikai diverzitás vizsgálatára. Közepesen nagy diverzitást találtunk, és a vizsgált élőhelyeket törzsfán ábrázolva megfigyeltük, hogy a szigeten található egyedek elkülönülnek a szárazföldiektől.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2013) *Turkish Journal of Biology* 37: 655-660.

A fent említett É-Norvégiából származó mintákat ISSR vizsgálatnak is alávetettük. Nyolc ISSR markert használtunk. Ebben az esetben is megfigyeltük a szigetről származó egyedek különállását. A norvég partner elvégezte az összes egyed kémiai elemzését. Ennek alapján négy csoportot tudtunk elkülöníteni: 1. nagy szalidroزيد tartalom kicsi rosavin tartalommal; 2. kicsi szalidroزيد tartalom és nagy rosavin tartalom; 3. közepes szalidroزيد és rozavin tartalom; 4. nagyon kicsi szalidroزيد és rozavin tartalom. Mind a glikozid tartalom, mind az ISSR adatok alapján törzsfát készítettünk és összevettük azokat. Megállapítottuk, hogy nincs hasonlóság a két törzsfá között, tehát a vizsgált markerek nincsenek relációban a glikozid tartalommal. Az elvégzett AMOVA vizsgálat szerint a molekuláris variancia 85%-a az egyedek közötti variabilitásból adódott és csak 15%-a az élőhelyek közötti varianciából.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2013) *Biochemical Systematics and Ecology*, 50:361-367.

A vizsgálatok során rendre azt az eredményt kaptuk, hogy a nyolc Zini és mtsi (2009) által közzé tett SSR marker közül csak négy alkalmazható megbízhatóan. Ezen markerek felhasználásával csupán kismértékű áttekintést kaphatunk a faj genetikai diverzitását illetően. Ezért tűztük ki célul a *Rhodiola*-specifikus mikroszatellit markerek számának gyarapítását. A markerfejlesztést Bloor és mtsi (2001) és Zane és mtsi. (2002) publikációja alapján végeztük. Munkánk eredményeként három mikroszatellit motívumot azonosítottunk és primereket terveztünk a mikroszatellit régiók határoló szakaszaira. A markerek használhatóságát, számos, különböző elterjedési területről származó *Rhodiola rosea* egyed DNS-n ellenőriztük. Fragmentumhossz-analízis segítségével megállapítottuk, hogy az egyik lókus (RhpB14a) nem mutat polimorfizmust, míg a másik kettő (RhpB14b és az RhpB13) igen.

Az eredményeket bemutató publikáció: Veress és mtsi. (2013) Kertgazdaság 45(4): 63-70.

2013-ban You és mtsi. tizenhét új, *Rhodiola* nemzetség-specifikus SSR markert tettek közzé. A markerek alkalmazhatóságát négy Kínában élő fajon (*R. bupleuroides*, *R. crenulata*, *R. fastigiata* és *R. sacra*) ellenőrizték. Ezek közül az öt legvariábilisabbat választottuk ki és bevontuk a kísérleteinkbe. A svájci Alpok öt pontjáról gyűjtött, összesen 74 rózsagyökér egyedet vizsgáltunk. Az öt újonnan bevont marker közül egy nem működött, így végül nyolc SSR markerrel dolgoztunk. A genetikai diverzitás mind az öt populációban hasonló nagyságrendű (közepes) volt. A populációk közötti és a populációkon belüli diverzitás mértéke megegyezett. Törzsfán ábrázolva a populációkat, azok nem a földrajzi helyzetük szerint csoportosultak. Ugyanakkor megfigyelhető, hogy a kiugróan nagy glikozid-tartalommal rendelkező mattmarki populáció elkülönül a többitől. Ábrázoltuk a populációkat a glikozid-tartalom alapján és nem találtunk hasonlóságot a mikroszatellit adatok alapján készített törzsfával. Fő koordináta elemzést végezve megállapítottuk, hogy a 74 egyed szórطان helyezkedik el a koordináta rendszerben, nem csoportosulnak élőhelyüknek megfelelően, egyedül a mattmarki és unteralpi populáció egyedei helyezkednek el közel egymáshoz. Az AMOVA szerint a variancia 98%-át az egyedek közötti variancia adta és a populációk közti variancia csak 2%-át, ami megerősíti, hogy a populációk közötti és a populációkon belüli diverzitás mértéke megegyező.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2014) Biochemical Sytematics and Ecology 54:137-143.

Célul tűztük ki Európa magashegységeiben található rózsagyökér populációk összehasonlítását mikroszatellit markerek segítségével. A Kárpátokból öt, az Alpokból szintén öt és a Pireneusokból két populációt vontunk be a vizsgálatba. Zini és mtsi.(2009) primerei közül négyet, illetve You és mtsi. (2013) primerei közül kettőt alkalmaztunk, mivel másik kettő, amivel korábban már dolgoztunk csak nagyon kis polimorfizmust mutatott (György és mtsi., 2014). A kapott genetikai paraméterek nagy genetikai variabilitásra utalnak. A populációkat törzsfán, illetve az egyedeket főkoordináta elemzés után ábrázolva megállapítottuk, hogy az Alpok és a Kárpátok populációi nem földrajzi helyzetüknek megfelelően csoportosulnak, hanem keverten. Az egyedek között egyedül a Pireneusokból származóak alkotnak egy zártabb csoportot. Megállapítottuk, hogy a populációkon belüli és a populációk közötti diverzitás hasonló nagyságrendű.

Az eredményeket bemutató publikáció: Wilhelm és mtsi. (2014). Kertgazdaság 46(1): 76-83.

Összesen tizenhét európai rózsagyökér populációt vizsgáltunk meg és hasonlítottunk össze: kettőt a Pireneusokból, kilencet az Alpokból, ötöt a Kárpátokból és egyet Skandinávia északi részéről. Ezeken kívül dolgoztunk még finnországi és ázsiai populációkkal, de azokat az eltérő vizsgálati módszer miatt nem tudtuk az összesített értékelésbe bevonni. A vizsgálatokat hat mikroszatellit markerrel végeztük el az összesen 271 rózsagyökér mintán. Közepesen nagy ($H_o=0,78$; $H_e=0,73$; $h_{(Nei)}=0,73$; $I_{(Shannon)}=1,62$) genetikai diverzitást találtunk a tanulmányozott populációkban. A populációkat törzsfán ábrázolva megfigyeltük, hogy a norvégiai egyedek teljesen elkülönülnek a többitől. A két pireneusi populáció is egy zárt csoportot képez. Az Alpok néhány populációja és a Kárpátok egy-két populációja is

csoportosul, de általánosságban elmondható, hogy az alpoki és a kárpátoki populációk szórtaan helyezkednek el a törzsfán. Az AMOVA vizsgálat szerint, amennyiben 4 csoportban vizsgáljuk a populációkat (Pireneusok, Alpok, Kárpátok, Skandinávia) a variancia 85%-a az egyedek közötti varianciából adódik, 11% a populációk közti varianciából és csak 4% a régiók (hegységek) közötti varianciából. Ha két nagy csoportba rendeztük az adatokat (Észak és Dél) akkor 75% adódik az egyedek közötti varianciából, 10% a populációk és 15% a régiók közötti varianciából. Ha csak az Alpokat és a Kárpátokat vizsgáltuk, azt találatuk, hogy a variancia 88%-a adódik az egyedek közötti varianciából, 12% a populációk közti varianciából és 0% a régiók közötti varianciából.

Az eredményeket bemutató publikáció: György és mtsi. (2014) benyújtás alatt.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a *Rhodiola rosea* faj közepesen nagy genetikai variabilitást mutatott az egyes populációkban. A Nei-féle diverzitás értéke 0,5 és 0,76 között volt. Néhány populáció esetében módunk volt a vizsgált egyedek kémiai analízisét is elvégezni és megállapítottuk, hogy az egyedek a hatóanyag szintjükben még magasabb változékonyságot mutatnak, mint amit az általunk felhasznált molekuláris markerek feltártak. Ugyanakkor találtunk olyan populációkat, amelyek egységesen nagyobb glikozid tartalommal rendelkeztek és ezt a tulajdonságukat az egyedek megtartották (rizómadugvánnyal) kísérleti telepre telepítve is. Az kiugróan nagy vagy éppen kiugróan alacsony glikozid tartalommal rendelkező populációk a molekuláris markerek alapján is elkülönültek a környező populációktól, ugyan nem sikerült egy bizonyos markert kapcsolnunk ezekhez a tulajdonságokhoz. A glikozid tartalomhoz kapcsolt marker kifejlesztéséhez szükséges a bioszintézis utak feltérképezése, az azokban résztvevő gének szekvenciájának megismerése, alacsony és magas glikozid tartalmú egyedekben ezen gének szekvenciájának összehasonlítása továbbá a gének expressziós vizsgálata.

II. A *Rhodiola rosea* glikozid bioszintézisének genetikai vizsgálata

A munka első lépéseként egy review cikkben áttekintettük a rózsagyökér glikozidjainak bioszintézisééről a rendelkezésre álló ismereteket. Az irodalom alapos tanulmányozása után megállapítottuk, hogy mind a szalidroizid mind a fahéjalkohol glikozidok bioszintézis útjának vannak nem tisztázott lépései.

Az eredményeket bemutató publikáció: Mirmazloun és György (2012) Acta Alimentaria 41:133-146.

Célul tűztük ki a két glikozid típus feltételezett bioszintézis útjaiban résztvevő gének izolálását és szekvenciáik leírását. Azokat a géneket választottuk ki, amelyekre vonatkozóan találtunk szekvenciákat más növényekből az NCBI génbankban. Így primereket terveztünk a fenilalanin ammónia liáz (PAL), a hidroxifahéj-CoA ligáz (4CL), a fahéj-CoA reduktáz (CCR), a fahéjalkohol dehidrogenáz (CAD), tirozin dekarboxiláz (TYRDC) és UDP-glükóztranszferáz (UDPGT) génekre. A teljes gén szekvenciáját eddig egyedül a tirozin dekarboxiláz génnek sikerült megszekvenálni (ennek nagy része már meg volt a pályázat

indulásakor) és az 5' irányba további 700 bp hosszú szekvenciát ismertünk meg, amelyben azonosítani tudtuk a promóter régiókra jellemző motívumokat. A többi gén hosszabb-rövidebb részlete is birtokunkba van már: a fenilalanin ammónia liáz 1350 bp-os részlete, amely magába foglalja a 3' véget; a hidroxifahéj-CoA ligáz 740 bp-os részlete szintén a 3' véggel; a fahéj-CoA reduktáz 850 bp-os részlete, amelyből csak 280 bp kódoló rész; a fahéjalkohol dehidrogenáz esetén 1405 bp-nyi genomi szekvenciánk van, amelyből egy 176 bp exon, egy 175 bp-os intron és egy 303 bp-os exon régiót tudtunk azonosítani eddig. Az UDP-glükóztranszferáz génnek 900 bp-os részletét ismertük meg, ami magába foglalja a 3' véget. Az első (homológ szekvenciák alapján tervezett) primerekkel amplifikált szakaszokból Genom Walking és RACE technikákkal mentük tovább. Ezek az eredmények még nincsenek publikálva, tovább folytatjuk a gének teljes szekvenciájának megismerésére irányuló munkát a pályázat terhére vásárolt vegyszerekkel illetve az előre vásárolt szekvenálási kerettel. Ezekből az eredményekből legalább 2 impakt faktoros cikk megírását tervezzük.

A pályázat második évében egy ausztriai populációban kijelöltünk 4 növényt, amelyekről a vegetációs periódus során havonta vettünk rizóma, gyökér és levélmintákat. Azért döntöttünk egy természetes populáció egyedei mellett, mert a létrehozott génbankban szemmel láthatóan nem érezték/érezik komfortosan magukat a növények. Elvégeztük a minták HPLC analízisét. Megállapítottuk, hogy a levelek csak nyomokban tartalmazták a vizsgált glikozidokat. a 4 növényegyed földalatti mintái óriási szórást mutattak, mind időpontonként, mind egyedenként. Egyértelmű trendet az egyes glikozidok felhalmozódására vonatkozóan nem lehetett látni. Génexpressziós vizsgálatok során a fahéjalkohol glikozidok bioszintézis útjában szereplő 4 enzimet kódoló gént (PAL, 4CL, CCR és CAD) vizsgáltunk. A relatív expressziós értékeket a REST szoftverrel számítottuk ki. Mivel egyértelmű trendeket az vizsgált gének expressziójában sem lehetett felfedezni, egy speciális statisztikai módszert alkalmaztunk annak érdekében, hogy mégis csak tudjunk valamit mondani az eredményekről. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a 4CL gén expressziós mintázata volt leginkább hasonló a négy párhuzamos biológiai ismételtsben a rizóma mintákban: virágzás alatt lecsökkent majd később ismét emelkedett. Regressziós analízis alapján CCR gén expressziója volt hatással a glikozid tartalomra.

Az eredmények egyenlőre egy 2013. évi konferencián lettek bemutatva és absztraktként érhetőek el. A full-paper az Acta Horticulturae-ban fog megjelenni. Mirmazloum és mtsi. (2013).

A fenti kísérletet a pályázat 3. évében megismételtük nagyobb minta számmal. Tizenöt egyedet jelöltünk ki, szintén egy ausztriai populációból, melyeket rizómadugvánnyal konténerbe ültettünk, majd fitotrónban neveltünk tovább. A rizómadugványok úgy lettek szedve, hogy 5-10 hajtás fejlődjön rajtuk, illetve a rizóma elég nagy legyen ötszöri mintavételhez. A fitotrónban magashegyi területekre jellemző környezeti tényezőket állítottunk be (16 h fény, nappal 17°C éjjel 12°C, heti kétszeri öntözés, 70% páratartalom). A HPLC vizsgálatot végül csak 7 egyed mintáin végeztük el és csak gyökér és rizóma minták esetében. Ebben a sorozatban is óriási szórást tapasztaltunk. Speciális statisztikai elemzést kellett végezni, mert a nagy szórás miatt a hagyományos módszerek nem vezettek

eredményre. E munka alapján készült cikk jelenleg benyújtás alatt van a Natural Product Communications folyóirathoz.

A fenti kísérlet során a HPLC vizsgálatra történt mintagyűjtéssel egy időben a génexpressziós vizsgálatokhoz is történt mintagyűjtés. Ezekből a mintákból az RNS kivonás megtörtént, a munka további lépései jelenleg is zajlanak.

Amint az korábban már említettem megállapítottuk, hogy mind a szalidrozyd mind a fahéjalkohol glikozidok bioszintézis útjának vannak nem tisztázott lépései. Ezeket a lépéseket in vitro kallusz kultúrák segítségével biotranszformációs kísérletekben kívánjuk tisztázni. A potenciális prekursorokat beszereztük a Sigma cégtől. A kísérletek során – melyek jelenleg is futnak – ezeket a prekursorokat (egyesével) *Rhodiola rosea* kallusz sejtek táptalajába keverjük, majd HPLC-vel ellenőrizzük, milyen anyagokká alakultak át a sejtekben. A mintavétel az inokulálást követő 6, 12, 24 és 72 óra elteltével történik. A kalluszok egy részét egy éjszakán át szárítjuk 40°C-on, majd 70%-os metanollal extraháljuk a HPLC vizsgálatához. A kalluszok másik részét folyékony nitrogénnel lefagyasztjuk és -80°C-on tároljuk további felhasználásig. Ezekből a mintákból RNS-t izolálunk, majd RT-PCR-rel ellenőrizzük melyik gének aktiválódtak a prekursor hatására. Amennyiben több is expresszálódik, úgy kvantitatív Real-time PCR-rel vizsgáljuk az egyes gének expressziójának szintjét. Ezek a kísérletek jelenleg is zajlanak, eredmény nyár közepére várható belőlük. Az eredményeket impakt faktoros folyóiratban kívánjuk közölni.

A pályázat ideje alatt in vitro kísérletek is zajlottak, melyek ugyan nem voltak a kísérleti tervben leírva, de az előző bekezdésben ismertetett munkához szükségesek voltak. Ennek keretében kidolgoztunk egy transzformációs módszert, melyet a későbbiek során tudunk majd alkalmazni egy-egy gén kalluszsejtekben való túlexpresszáltatásának előidézéséhez.

Az eredményeket bemutató publikáció: Mirmazloum és mtsi (2014) Acta Scientiarum polonorum Series Hortum Cultus, in press.

ELTÉRÉSEK INDOKLÁSA

A pályázati munkatervben előirányzott célkitűzések megvalósultak vagy közel vannak a megvalósuláshoz, a pályázat szakmailag sikeresen zárul. A költségtervtől néhány eltérésre sor került. Az évek óta tartó irodalmazás és adatgyűjtés eredményeképpen jóval több populációról tudok, mint 2009-ben mikor összeállítottam a pályázati anyagot, így a minél alaposabb munka érdekében több gyűjtőúton vettem részt, mint eredetileg terveztem. A munka során a szekvenálási reakciókat és a fragmentumhossz-analíziseket szolgáltatásként vásároltuk, és a gazdasági válság következtében a szolgáltatások ára olyan mértékben növekedett meg, amely a költségvetés tervezésekor nem volt előre látható. A kutatás eredményei alapján indokoltá vált az eredetileg tervezettnél több HPLC vizsgálat elvégzése, amit szintén szolgáltatásként vásárolunk, mivel Tanszékünk ilyen jellegű vizsgálatokra nincsen berendezkedve. Többször

előfordult, hogy konferencia részvételem az egyetemi közbeszerzési rendszer miatt másfélszer annyiba került, mint eredetileg terveztem.

ÉRTÉKMÉRŐK

A pályázati munka eredményeiből összesen 19 különböző publikáció született. Ezek között 6 impakt faktoros folyóiratcikk (kumulatív IF= 4,679), 2 nem impakt faktoros folyóiratban megjelent cikk, 1 könyvfejezet, 8 konferencia-összefoglaló és 2 teljes szövegű konferencia-kiadvány. Jelenleg benyújtás alatt van 2 impakt faktoros közlemény. A pályázati munka eredményeit 5 nemzetközi (4 előadás és 2 poszter) és 3 magyarországi (4 poszter) konferencián mutattuk be. A pályázati munka eredményeihez kötődően 8 TDK dolgozat született, melyek a Kari TDK versenyen 1db 1. és 2 db 3. helyezést értek el, valamint különdíjat nyertek. A vezetőkutató elnyerte a 2014. évi Budapesti Corvinus Egyetem Kutatási Kiválósági Díját. A munka során számos jelentős nemzetközi együttműködés valósult meg: Galambosi Bertalan (MTT, Finnország), Paul Eric Aspholm (Bioforsk, Norvégia), Dr. José Vouillamoz (Agroscope, Svájc), Dmitry Bacharov (Komi Science Center, Oroszország) kutatócsoportjaival.