

Az nSSR és cpDNS lokuszok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus* sp.)

Tóth Zoltán¹ – Gyulai Gábor¹ – Szabó Zoltán^{1,2} –
Horváth Lajos³ – Gyulai Ferenc⁴ –
Heszky László¹

Szent István Egyetem

¹Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

²Növénytani és Ökofiziológia Intézet, Gödöllő

³KTI, Gödöllő

⁴Agrobotanikai Intézet, Tápiószele

toth.zoltan@mkk.szie.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Görögdinnye (*Citrullus lanatus*) magleletekből (13. sz., Debrecen; 15. sz. Buda; 18. sz. Pannonhalma) DNS-izolálást, molekuláris (nSSR – nuclear simple sequence repeat; cpDNS – kloroplasztisz DNS) elemzést és fenotípusos fajtarekonstrukciót végeztünk 44 mai fajttal való összehasonlításban. Az elemzésben 47 primer-párt teszteltünk, ebből 26 primer-pár bizonyult hatékonyknak a mai fajtákban, amelyek közül csak 16 volt aktív a középkori mintában. Az aktív primerek alkalmazásával szekvencia elemzést végeztünk a (CT)₂₆₋₃₀ nSSR lokuszon, és a clp-12 cpDNS lokuszon. Megállapítottuk, hogy a középkori mintában még megtalálható (CT)₃ szakasz a mai fajtában már delécióval kiesett az elmúlt 600 év során. Továbbá a cpDNS trnV (Jarret et al., 1997) lokuszán (tRNS-Valin; 299 bp) két szubsztitúciót azonosítottunk (102.196 és a 102.201 nt.-ben). A (CT)₂₆₋₃₀ nSSR lokusz (196 bp) 122-130 bp szakaszán egy további (CT)₄ inverziót is azonosítottunk, amely (CT)₂₆₋₃₀ egyszerű mikroszatellita lokuszról kialakuló (CT)₁₇-C-(TC)₃-T-(CT)₅ összetett mikroszatellita születését igazolja. Vizsgálataink során egy új retrotranszpozont (Cila-1) azonosítottunk. A középkori minta fajtarekonstrukciójához elkészítettük a 44 mai fajta morfológiai dendrogramját 25 fenotípusos bélyeg alapján.

Kulcsszavak: mikroszatellitek, görögdinnye, LTR-retrotranszpozon, szekvenciaelemzés

SUMMARY

The evolution of water melon (*Citrullus lanatus*) microsatellites from the 15th century (Debrecen); 13th (Buda); and 18th century, (Pannonhalma) were analyzed. Microsatellite (nSSR, nuclear simple sequence repeat) and cpDNA profiles of the aDNA (ancient DNA) of seed remains were compared to modern water melon cultivars and landraces. Sixteen primer pairs were applied. Sequence analysis at the (CT)₂₆ and cpDNA trnV loci revealed a (CT)₃ and Adenin deletions, respectively, from the current water melon cultivar compared to the medieval sample. Cila-1, a new LTR retrotransposon has been described. For morphological reconstruction, a dendrogram produced by SPSS11 based on the presence versus absence of 24 phenotypic characters were also analyzed.

Keywords: microsatellites, watermelon, LTR-retrotransposon, sequence alignment

BEVEZETÉS

A görögdinnye (*Citrullus lanatus*; 2n=2×=22; 4.25-4.54×10⁸ bp; 0.42 pg DNS) (Arumuganathan és Earle, 1991; Kihara, 1951) a rendkívül monotipikus *Citrullus* nemzetség tagja, melynek többi faja közeli morfológiai rokonságban áll a *Citrullus colocynthis*, *Citrullus ecirrhosus*, *Citrullus rehmi* vadfajokkal. A görögdinnye evolúciós kutatásának kiemelt jelentőségét az adja, hogy két alfaja, a *Citrullus lanatus* var. *lanatus* és a *Citrullus lanatus* var. *citroides* máig fennmaradt párhuzamos evolúciójuk során. Elsődleges géncentruma az Abesszíniai övezet, illetve trópusi Afrika, másodlagos géncentruma Kína, Belső-Ázsia és India (Vavilov, 1951). Nagyfokú morfológiai variabilitását a hús-, és a mag színe és formája adja. Termesztésbe vonása i.e. 2000 évvel ezelőtt kezdődhetett, ahogy ezt az Egyiptomi falfestmények és magleletek igazolják (Zhang és Jiang, 1990; Zamir et al., 1984). Európában csak a középkor hajnalán vált ismertté balkáni közvetítéssel.

Régészeti leletek. A magyarországi középkori magleletek szerint a görögdinnye (*Citrullus lanatus*) és a sárgadinnye (*Cucumis melo*) különösen kedvelt konyhakerti növények voltak (Hartyányi és Nováki, 1975). A 15. század elején íródott Besztercei-szószedet említi először név szerint: „gereg dyne”. A 16. századig még nem vált el a görögdinnye neve az uborkától, továbbá csak ezután kezdték megkülönböztetni a két dinnyét (görögdinnye – sárgadinnye) egymástól. Szikszai Fabriczius Balázs Nomenclaturájában (1591) is így szerepel. Igen jelentős volt a dinnyetermesztés a középkori magyar királyság területén. Lippay János (1664) talán erre utal, amikor megemlíti, hogy I. Albert királyunk 1439-ben a mértéktelenül sok elfogyasztott dinnye miatt lelte halálát. A középkori Magyarországon termesztett görögdinnyék többnyire *sárgabelűek* voltak (Gyulai F. vizsgálati eredménye) egészen a 18. századig, a pirosbélű fajták csak a török uralom megszűnése után kezdtek terjedni. Viszont a pirosbélű fajták már a 16. századi Itáliában közkedveltek lehetettek, ahogy ezt Cavaraggio (*Still life with fruit on a Stone Ledge and carafe of white wine*;

és *Still life with melon, watermelon, pomegranate, grape and other fruits*, Pensionate del Saraceni, 1603) festményei igazolják (J. Janick, www.hort.purdue.edu; Szabó et al., 2005b).

Az LTR retrotranszpozonok, hasonlóan a retrovírusokhoz, a gazdasejt aktuális tRNS állományát használják szaporási ciklusuk első lépéséhez az RNS szál szintéziséhez, amely közvetlenül az 5'LTR szakasz 3' végén kezdődik 1-3 nt-ot követően a PBS szekvenciával. Ez a szekvencia általában 18 bp hosszú, PBS (primer kapcsoló hely, primer binding site). Az evolúció során a legnagyobb mennyiségben előforduló tRNS és a mt-tRNS-t felhasználó retroelemek szaporodtak fel legnagyobb számban a genomokban (Neuvéglise et al., 2002). A met-tRNS 3'-végi, aminosav kötő tripletje CCA, melynek komplementer szekvenciája a PBS-ben GGT. A tervezett PBS-specifikus primereink 3'-vége ezért minden esetben a CCA volt (Kalendar és Schulman, 2006).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényminták feltárása: A középkori debreceni magok a volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt, míg a 15. századi budai magok a budai királyi vár (Árpád Házi IV. Béla Király, 1243) Zsigmond-kori szárnyának ásatásai során feltárt kutak növényleteiből származnak (Nyékhelyi, 2003). A 18. századi Pannonhalmi lelet botanikai gyűjtemény anyaga (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest). A feltárások során a kutakból hideg, nedves állapotban előkerült magvakat flotálásos módszerrel dolgoztuk fel 0.5-, 1.0-, 2.0- és 4.0 mm lyukbőségű szitasorozaton, az esetleges mai növénymaradványokkal való keveredés elkerülésére, zárt laboratóriumi körülmények között (2006-ban). A flotált magvak tárolása -20 °C-on történt. A régészeti kormeghatározás alapján a minták eredetét a 15. század, illetve a 18. század első felére azonosítottuk.

Magbiológiai-feldolgozás: A magbiológiai feldolgozásra elválasztott mintákat infravörös fényben szárítottuk (15 W), és határoztuk meg Schermann határozókulcs alapján (Schermann, 1966).

Összehasonlító mai fajták: A régészeti minták fajtaköri besorolásához és fenotípus rekonstrukciójához 5 magyar, 9 külföldi és 30 db tájfajtát vizsgáltunk meg kisparcellás kísérletben (5-5 növény/fajta), három ismétlésben felnevelve (1. táblázat). A morfológiai felvételezést 25 bélyeg (Agrobotanikai Központ, Tápíószele) alapján végeztük el (OMMI, 2004) (2. táblázat).

DNS-izolálás: A genomikus DNS kivonásához CTAB extrakciós eljárás alapján (Bernatzky és Taksley, 1986) módszert használtunk. Ezen módszert kiegészítettük NaCl a poliszacharid, illetve PVP

(Polyvinylpyrrolidone) (Hanania et al., 2004) hozzáadásával a polifenol (Lodhi et al., 1994) szint csökkentése érdekében. A fenol oxidációjának (Loomis, 1974) megakadályozása céljából Sódium-biszulfátot használtunk. 0.1 g magot porítottunk cseppfolyós nitrogénben, majd 1000 µl Homogenizációs pufferben (1M hexilene-glycol, 10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.5% triton, 5 mM β-mercaptoethanol) szuszpendáltuk. A mintákat 10000g 10 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a felső fázis eltávolítása után 1000 µl Mosó puffert adtunk hozzá (0.5 M hexilene glycol, 10m Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.5% triton, 5 mM β-mercaptoethanol), majd centrifugáltuk (10 perc 4°C-on 10000g). Eltávolítottuk a felúszó réteget. A mintákhoz 1000 µl Extrakciós puffert (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris, 5mM EDTA, 4% sodium biszulfát) + 1000 µl Lizis puffert (0.2 M Tris, 2% CTAB, 50mM EDTA, 4M NaCl, 1% PVP) és 4 µl Sarcosilt adtunk. Ezután 30 percig 65°C-on inkubáltuk, majd ezt követően azonos mennyiségű kloroform-izoamilalkoholt adtunk hozzá. Centrifugálás (20 perc 4°C-on 10000g) után a felúszó tiszta réteget új Eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd 500 µl Izopropanollal mostuk. 10 perc 10000g 4°C centrifuga, ezután 80%-os Ethanollal mosás, és 4 µl RN-áz kezelés. Az izolált DNS minőségét 0.8%-os agaróz gélen EtBr-os festéssel ellenőriztük, majd a pontos DNS koncentrációt a NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Delaware, USA – BioScience, Budapest) mértük meg (Gyulai et al., 2006).

cpDNA elemzés: A kloroplasztisz DNS elemzéséhez a trnV lokuszt vizsgáltuk [tRNA-Val (GAC)] 297 bp (cpval3P2) (102509-102805) 5'-AGT TCG AGC CTG ATT ATC CC-3'; valamint a 16S rRNA (cp16S5P1) 5'-GCA TGC CGC CAG CGT TCA TC-3' primerekkel (Al-Janabi, 1994).

SSR-elemzés (sárgadinnye és görögdinnye specifikus primerek): A sárgadinnye specifikus primer vizsgálatok során 47 mikroszatellita primer-párból 16 bizonyult hatékonynak (3. táblázat). A PCR reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük el 10-50 ng templát DNS, 10-20 pM primer, 1×-es koncentrációjú PCR puffer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% zselatin) 1-2 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP és 1 egység Taq polimeráz (Sigma) felhasználásával. A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen módosítottuk: 2 perc 95°C, majd 5× ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 65°C, 1 perc 72°C, majd 35× ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 55°C, 1 perc 72°C, végül 5 perc 72°C (*-Touch down 65°C-55°C). A reakciótermékek szeparálását horizontális (1.5%) agaróz gélen végeztük EtBr-os festést alkalmazva (60 W, 1 óra). Majd a pontos allél azonosítást ALF express, lézer fluorométerrel végeztük el (Gyulai et al., 2006).

A vizsgált dinnye fajok, fajták és tájfajták (1-44) eredete és kódszáma: sártök (1-3) (*Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6) (*C. lanatus citroides*) és görögdinnye (7-44) (*C. lanatus lanatus*)

#	Fajtanév(1)	Latin név(2)	Kód (Tápiószele)(3)
1	Finn 168	<i>Citrullus colocynthis</i>	RCAT036168
2	Belga 172	<i>Citrullus colocynthis</i>	RCAT036172
3	Portugál 547	<i>Citrullus colocynthis</i>	RCAT035547
4	Szeged 099	<i>Citrullus lanatus citroides</i>	RCAT036099
5	Román 235	<i>Citrullus lanatus citroides</i>	RCAT035235
6	Újszilvás 816	<i>Citrullus lanatus citroides</i>	RCAT055816
7	Bácsbokod 917	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035917
8	Napsugár 257	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00257/05
9	Sándorfalva 105	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT036105
10	Dévaványa 101	<i>Citrullus l. lanatus</i>	5101/02
11	Szentesi sugárhasú 260	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00260/05
12	Belij dinij 152	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT036152
13	Ráckeve 812	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT055812
14	Csárdaszállás 113	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035113
15	Tura 389	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035389
16	Biri 114	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035114
17	Klondike R7 096	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT036096
18	Charleston gray 263	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00263/05
19	Taktaharkány 790	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034790
20	Túrkeve 112	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035112
21	Ukrainskij 545 149	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT036149
22	Szirma 782	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034782
23	Marsowszky 256	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00256/05
24	Háromfa 754	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034754
25	Debrecen 111	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035111
26	Sibiriak 098	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT036098
27	Nagyecsed 775	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034775
28	Nagykálló 785	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034785
29	Hevesi 258	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00258/05
30	Nagyvárad 767	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034767
31	Nyírbátor 155	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035155
32	Oros 862	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035862
33	Rákóczi falva 145	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035145
34	Kömörő 762	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034762
35	Nyíregyháza 778	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034778
36	Keckeméti vöröshúsú 259	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00259/05
37	Ilk 236	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035236
38	Pusztadobos 146	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT035146
39	Gyöngyös 969	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034969
40	Crimson sweet 262	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00262/05
41	Kibéd 172	<i>Citrullus l. lanatus</i>	5172./02
42	Sugar baby /Génbanki 261	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00261/05
43	Lipót 970	<i>Citrullus l. lanatus</i>	RCAT034970
44	Korai kincs 255	<i>Citrullus l. lanatus</i>	00255/05

Table 1: List of watermelon entries studied: colocynth (syn.: bitter apple) (1-3) (*Citrullus colocynthis*), citron melon (syn.: tsamma) (4-6) (*C. lanatus citroides*) and watermelon (7-44) (*C. lanatus lanatus*) samples
Cultivar names(1), Latin names(2), Accession #(3)

A mai görögdinnye (*Citrullus*) fajok és fajták morfológiai jellemzéséhez alkalmazott 25 fenotípusos bélyeg (OMMI és ABI Tápiószele) és digitalizált súlyozott értékei

1. Növény-fejlődési erély	11. Terméskezdemény-alak	20. Termés-hús szín
3 gyenge	3 gömbölyű	1 fehér
5 közepes	5 ovális	2 citromsárga
7 erős	7 hengeres	3 aranyásárga
2. Szár-főinda hossza	12. Terméskezdemény szőrözöttség	4 halvány rózsaszín
1 nagyon rövid	1 nagyon ritka	5 rózsaszín
3 rövid	3 ritka	6 narancssárga
5 közepes	5 sűrű	7 skarlátvörös
7 hosszú	7 nemezes	8 kármínpiros
9 nagyon hosszú	9 tövises	9 málnaszínű
3. Szár-szőrözöttség	13. Termés-alak	21. Hús-konzisztencia
3 gyenge	1 lapított	1 szemcsés
5 közepes	2 gömbölyű	2 zsenge, lágy
7 erős	3 tompa elliptikus	3 nyálkás
4. Levéllemez-alak	5 ovális	4 durva
3 keskeny	6 körte-alakú	5 telt, kemény
5 közepes	7 hengeres	6 kemény
7 széles	14. Termés-felszín	7 vattaszerű
5. Levél-szín	3 sima	22. Hús-le vesség
1 sárga	5 barázdált	3 száraz
3 zöld	7 érszerű kidudorodások	5 kevésnedvű
5 sötétzöld	9 egyenetlen,	7 nedvdús
7 szürkészöld	15. Termés-héj színe	9 nagyon leves
9 galambszürke	1 fehéres	23. Hús-íz
6. Levél-hossz	2 sárgás	1 keserű
1 nagyon apró	3 krém	3 íztelen
3 apró	4 szalmasárga	5 gyengén édes
5 közepes	5 narancs	7 édes
7 nagy	6 világoszöld	9 nagyon édes
9 nagyon nagy	7 zöld	24. Mag-szín
7. Levél-szeldeltség	8 sötétzöld	1 fehér
1 nincs	9 feketészöld	2 krém
2 nagyon gyenge	16. Termés-héj rajzolat	3 szürke
3 gyenge	1 nincs	4 dohányszínű
5 közepes	2 van	5 világosbarna
7 erős	17. Termés-héj rajzolat típus	6 olajzöld
9 nagyon erős	1 hálózatos	7 barna
8. Levél-lebeny	2 hálós csíkok	8 piros
3 keskeny	3 fonalas csíkok	9 fekete
5 közepes	4 márványozott	25. Érési csoport
7 széles	5 keskeny tövis-alakú csíkok	1 korai nap
9. Virág szírom-méret	6 széles tövis-alakú csíkok	3 középkorai
3 apró	7 füzérszerű csíkok	5 középpérésű
5 közepes	8 széles elmosódó csíkok	7 középkései
7 nagy	9 mozaikos	9 kései
10. Virág szíromlevél-alak	19. Termés-héj szilárdság	
3 kerek széles	3 nem szilárd	
5 kerek keskeny	5 közép szilárd	
7 kihegyesedő	7 szilárd	

Table 2: List of the morphological characters of watermelon (*Citrullus*) according to the combined standards of Descriptor Lists of ABI (AgroBotanical Institute, Tápiószele, Hungary) and the National Institute for Quality Control (OMMI, Budapest, Hungary)

Az alkalmazott (1-9) sárgadinnye- (Katzir et al., 1996; Danin-Poleg et al., 2001); és (10-16) görögdinnye-specifikus (Jarret et al., 1997), valamint a (17) cpDNS (Al-Janabi et al., 1994) primerek adatai

#	Lokusz(1)	primer-pár szekvenciák(2)	ismétlődő szekvencia(3)
1.	CmCT44	tcaactgtccatttctcgtg ccgtaaacgacgaaacccttc	(CT) ₁₀ TGTT(CT) ₃
2.	CSTAO50	gaattatgcagatgggtctt caagaagatcaaatgatagc	(TA) ₄ (TTC) ₃ G(TA) ₅ TG(TA) ₂
3.	CmTC51	attgggtttctttgaggtga ccatgtctaaaaactcatgttg	(CT) ₃ GA(TC) ₉ (CT) ₅
4.	CMCT126	ctttagtgtgagattggtgg gcacatcattggagtaactg	(CT) ₉
5.	CmTC158	ccccatattcatcaaaact tcagctcacttttccattca	(TC) ₁₁ (ATT) ₆
6.	CmTC 168	atcattggatgtggattctc acagatggatgaaaccttag	(TC) ₁₄
7.	CMACC 146	caaccaccgactactaagtc cgacaaaccatccgataa	(ACC) ₉
8.	CmCT 170 b	attcccaactaaactaaacc cacaacacaatcatccttg	(CT) ₈
9.	CSLHCPA	tctccatgtttgattcttt accacaataataatcaaca	(GA) ₉
10.	CI 1-06	caccctctccagttgtcattcg aaggctcagaaagcggcatagg	(CT) ₁₀
11.	CI 1-12	gcctttgaaagagagttgctcg gcgctcccttttacc	(GA) ₁₅
12.	CI 1-20	cgcgctgaggaccctata aaccgctcaatcaattgct	(CT) ₁₈
13.	CI 1-21	accctcgtctgctgtattca tgtcccaccaacatttcatt	(ATT) ₁₀ (CT) ₁₉
14.	CI 2-23	gaggcggaggagttgagag acaaaacaacgaaaccatagc	(CT) ₁₅
15.	CI 2-61	ttctgctcagttttctcaat catcttcaaaaaaggctaag	(CT) ₁₈
16.	CI 2-140	ctttttctctgattgactgg actgtttatcccgaactcaact	(GA) ₂₀
17.	Clp12	agttcgagcctgattatccc gatgaacgtggcgcatgc	

Table 3: Sequence data of simple sequence repeat primers (SSR) primer data according to (1-9) Katzir et al. (1996), Danin-Poleg et al. (2001), (10-16) and Jarret et al. (1997), and (17) cpDNA primer sequence (Al-Janabi et al., 1994)
Loci(1), Primer sequences(2), Core sequences(3)

Szekvenciaelemzés. Az SSR fragmentumokat automata fluoreszcens DNS szekvenátorral (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer) elemeztük, mindkét irányban elvégezve a szekvenálást. A szekvenciákat ChromasPro (version 1.11) programmal illesztettük (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Queensland, Ausztrália). A szekvenciák összehasonlítását Bioedit programmal készítettük (BioEdit Sequence Alignment Editor, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA). Az ellenőrzésekben a GCG-10 (Genetics Computer Group, Oxford Molecular Group Inc., Madison, Wisconsin, USA; Wisconsin Package, Version 10.3) szoftvert alkalmaztuk. A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analízishez az NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) programot alkalmaztuk.

LTR retrotranszpozon izolálás. Összesen 51 PBS primert teszteltünk, melyből mindegyik mutatott amplifikációt. A fragmentumoknak azonban csak közel a fele származik PBS-komplementer szekvenciákból, a többi fragmentum a genomban statisztikusan előforduló egyéb szekvencia. Ez a technika is alkalmas volt nagy érzékenységgű genom összehasonlításra, melyet elvégeztünk a mai görögdinnye fajtákon és a régészeti leletek DNS mintáiban is, és leírtuk a görögdinnye első retroelemét (CiLa-1).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A mai fajták morfológiai elemzése – Morfológiai dendrogramm (SPSS 11.0 programmal).

Az elemzés során a kapott mátrix alapján páronként összehasonlítva a Jaccard (1908) indexeket meghatároztuk a fajták genetikai hasonlósági koefficiensét, és megrajzoltuk az összehasonlító dendrogrammot (Szabó et al., 2005a, b).

A görögdinnye fajtatípusokba történő besorolását megnehezíti a rendkívüli szín- és formagazdagság a

termés héj, terméshús és a mag tekintetében (1. ábra).

A felvételezett adatok alapján a 44 vizsgált görögdinnyefajta és tájfajta elkülöníthető volt a *Citrullus lanatus* és a *Citrullus colocynthis* elterjedt fő típusok szerint (2. ábra).

1. ábra: A vizsgált mai *Citrullus* fajok és fajták (1-44) terméshéj, -hús és mag típusa (színes méretskála: 25 cm)



Figure 1: Comparative analysis of rind, flesh and seed types of *Citrullus* samples studied (color scale bars indicate 25 cm)

1b. ábra: A vizsgált régészeti görögdinnye (*Citrullus l. lanatus*) 13. sz. (Debrecen), 15. sz. (Budapest); és takarmánydinnye (*Citrullus l. citroides*) 18. sz. (Pannonhalma) magok morfológiája (mérce 1 cm)



Figure 1b: Seed morphology (groups and individuals) of ancient seeds (*Citrullus l. lanatus*) from 13th cent. (Debrecen); 15th cent. (Budapest) and 18th cent. (*Citrullus l. citroides*) (Pannonhalma)

2. ábra: Morfológiai dendrogram a mai görögdinnye (*Citrullus*) fajok és fajták (1-44) rokonsági kapcsolatainak meghatározására (ld. 1. táblázat)

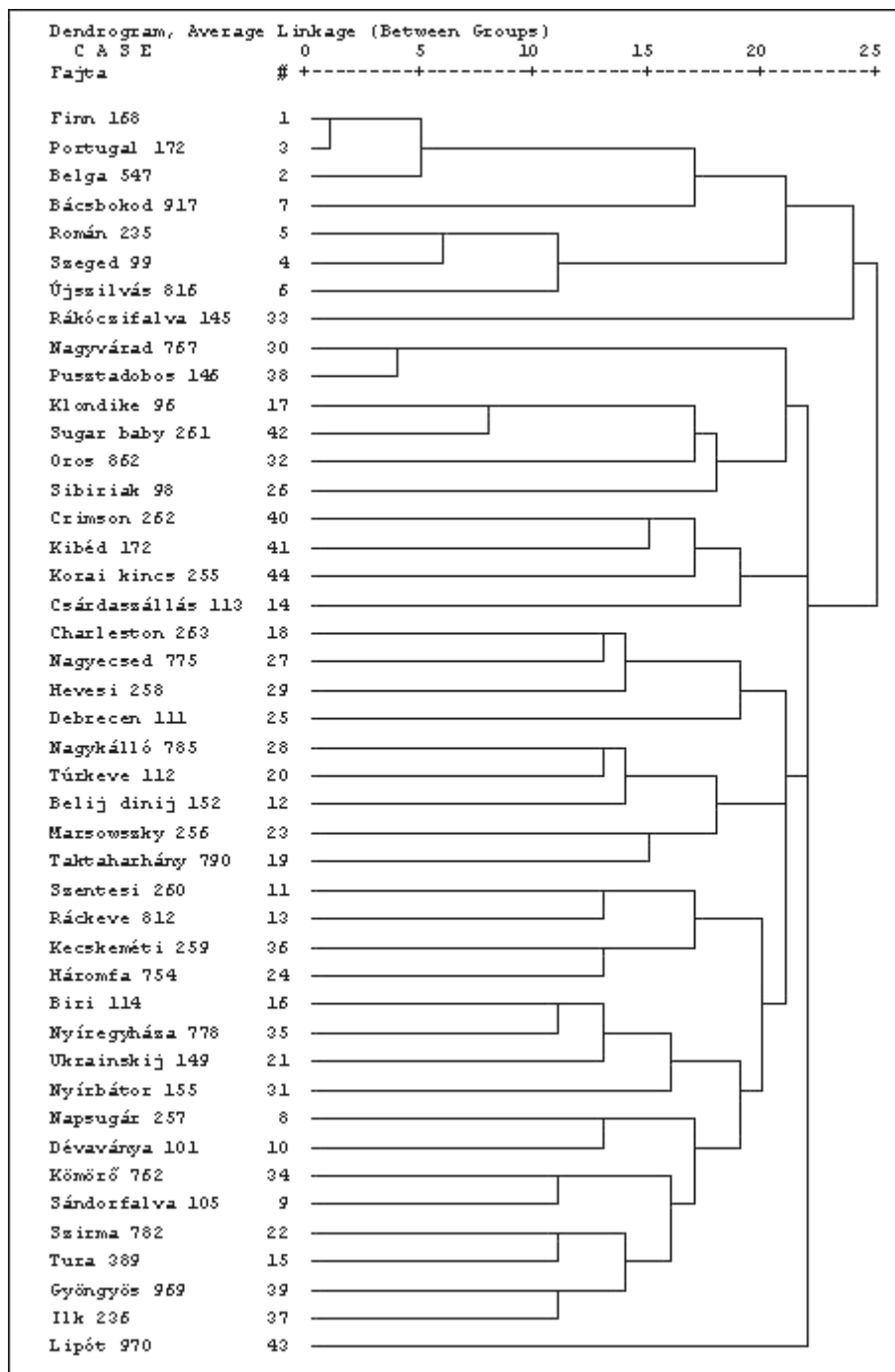


Figure 2: Cluster analysis of watermelon (*Citrullus*) species, cultivars and landraces studied (1 to 44) (listed in Table 1)

DNS izolálás. A középkori mintákból kis mennyiségű, töredezett, de PCR amplifikációra alkalmas DNS-t sikerült izolálni, a mai fajtákból nagy mennyiségű, jó abszorpciós értékeket mutató, kompakt DNS-t vontunk ki.

Molekuláris elemzés. A genom elemzés széleskörben alkalmazott területe a kodominánsan öröklődő mikroszatellita lokuszok (SSR) szekvencia elemzése (Gyulai et al., 2006; Lágler et al., 2005;

Szabó et al., 2005a). A genom mikroszatellita szakaszaiban az ismétlődő belső szekvencia 1-5 nt hosszúságú mono- (A)_n, di- (AT)_n, tri- (ATC)_n, tetra (AGTC)_n és pentamer (AGTCT)_n felépítésű. Ezek az alapszekvenciák 10-80 egymásutáni kópiaszámmal (*tandemszám*), megközelítően 100 bp végső hosszúságban fordulnak elő a genomban egy fajspecifikus (Röder et al., 1998; Danin-Poleg et al., 2001) 18-28 bp hosszúságú 5' és 3' irányból is lezáró határoló szekvenciával (Lagercrantz et al., 1993).

A mikroszatelliták szekvenciájuk alapján két csoportra különíthetők, az egyszerű (*perfect*) SSR-ok, pl. (ATG)₁₀; és az összetett (*imperfect*) SSR-ok, melynek két típusa, a megszakított, pl. (AT)₁₀CACA(AT)₆, és az összetett (*compound*) SSR, pl. (AT)₁₀(CA)₁₀. A mikroszatellita szakaszok gyakorisága eltér a növényekben és az állatokban. A növényi genomban ötször kevesebb SSR található, mint az állatokban, pl. egy közel 20 bp hosszú SSR, amely az emberi genomban 6 Kbp-ként fordul elő, a *Brassica* fajokban csak 19 Kbp-ként található (Lagercrantz et al., 1993). A növényi genom legelterjedtebb dinukleotid SSR szekvenciája az AA/TT motívum, ennél kevesebbszer fordul elő az AT/TA és CT/GA motívum. Ez a három dinukleotid-SSR (átlag 1-6-szoros ismétlődéssel) teheti ki az összes növényi SSR-ok közel 75%-át (Lagercrantz et al., 1993).

Vizsgálatainkban két sejtmagi nSSR lokusz (3. ábra) és egy cpDNS lokusz (4. ábra) teljes szekvencia elemzését végeztük a 13. századi debreceni és 15. századi Buda, a 18. századi pannonhalmi, valamint mai görögdinnye fajtákban.

Megállapítottuk, hogy a görögdinnye mikroevolúciója során a (CT)₂₆ nSSR lokuszon (196 bp) egy (CT)₃ (114-119 nt)-, a cpDNS trnV-es (Jarret et al., 1997) lokuszán (trNS-Valin; 299 bp), pedig két szubsztitúciót azonosítottunk (102.198 és a 102.209 nt.-ben) (5. ábra). A mikroszatellita szekvenciák evolúciója nem csak *indel* változásokkal, hanem az egyszerű SSR szekvenciákból kialakuló összetett SSR-okkal is nyomon követhető (Messier et al., 1996; Kutil és Williams, 2001; Orti et al., 1997; Taylor et al., 1999; Toth et al., 2000). Vizsgálatainkban a (CT)₂₆₋₃₀ nSSR lokusz (196 bp) 122-130 bp szakaszán egy (CT)₄ inverziót is azonosítottunk, amely által a (CT)₂₆₋₃₀ egyszerű mikroszatellita lokusból kialakuló (CT)₁₇-C-(TC)₃-T-(CT)₅ összetett mikroszatellita születését detektáltuk. Eredményeink igazolják, továbbá, hogy a sejtmagi mikroszatellita allélek polimorfizmusa mindig egy teljes SSR alapszekvencia, egyszerűes vagy többszörös, kieséséből illetve beépüléséből (*indel*) adódik, és sohasem a lezáró szakaszok mutációjából (Gyulai et al., 2006; Weber és Wong, 1993; Lágler et al., 2006; Lágler, 2008).

3. ábra: Szekvencia elemzés a (CT)₂₆₋₃₀ nSSR (C1 1-20) dinukleotid mikroszatellita lokuszon (190 bp) a középkori és a mai görögdinnye (*Citrullus lanatus*) fajtákban, a primer-pár megjelölésével

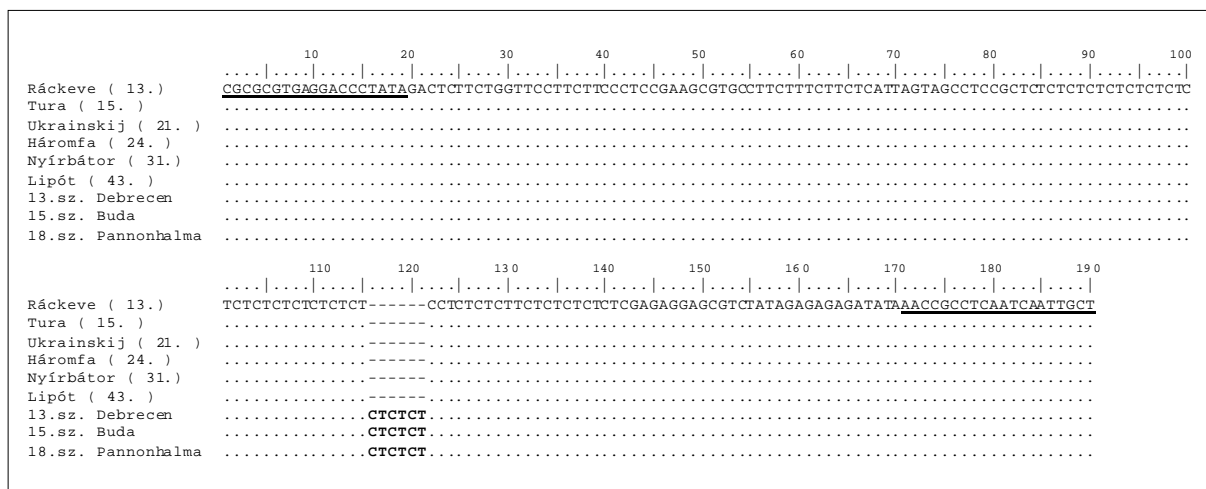


Figure 3: Sequence alignment of microsatellite at (CT)₂₆₋₃₀ locus in the medieval and current watermelon (*Citrullus lanatus*) varieties

A 13. és 15. századi, valamint a 18. századi mintában is sikerült kimutatni retrotranszpozon eredetű fragmentumokat, még a nagy molekula tömegű (3 Kbp) frakciókban is. Az egyik (2251. sz.) LTR retrotranszpozon szekvencia (1.163 nt) 284 nt hosszú szakasza megtalálható volt a görögdinnye gyümölcs magi nucellusz-specifikus fehérje gén (WM403) határoló (flanking) szekvenciájába épülve (AF008925) (1.711-1.408 nt). Ez a 284 nt hosszú retrotranszpozon szekvencia elemzése azt igazolja, hogy TRIM (*terminal repeat retrotransposon in miniature*) vagy szolo-LTR-t (csupán két, egy

korábbi transzpozon 5' és a 3' LTR-szakaszának rekombinációs terméke, a teljes belső domén elvesztésével) mutattunk ki a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*). Az új LTR retrotranszpozon a CiLa-1 (*Citrullus lanatus*) elnevezést kapta (NCBI, EU009625).

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A magleleteket Gyulai F. bocsátotta rendelkezésünkre, a szekvencia elemzésben Lágler R. és Bitsánszky A. közreműködött.

4. ábra: Szekvencia elemzés a Clp-12 cpDNS (tRNS-Val) lokuszon (299 bp) a középkori és a mai görögdinnye (*Citrullus lanatus*) fajtákban, a *Cucumis sativus* génbanki adathoz illesztve

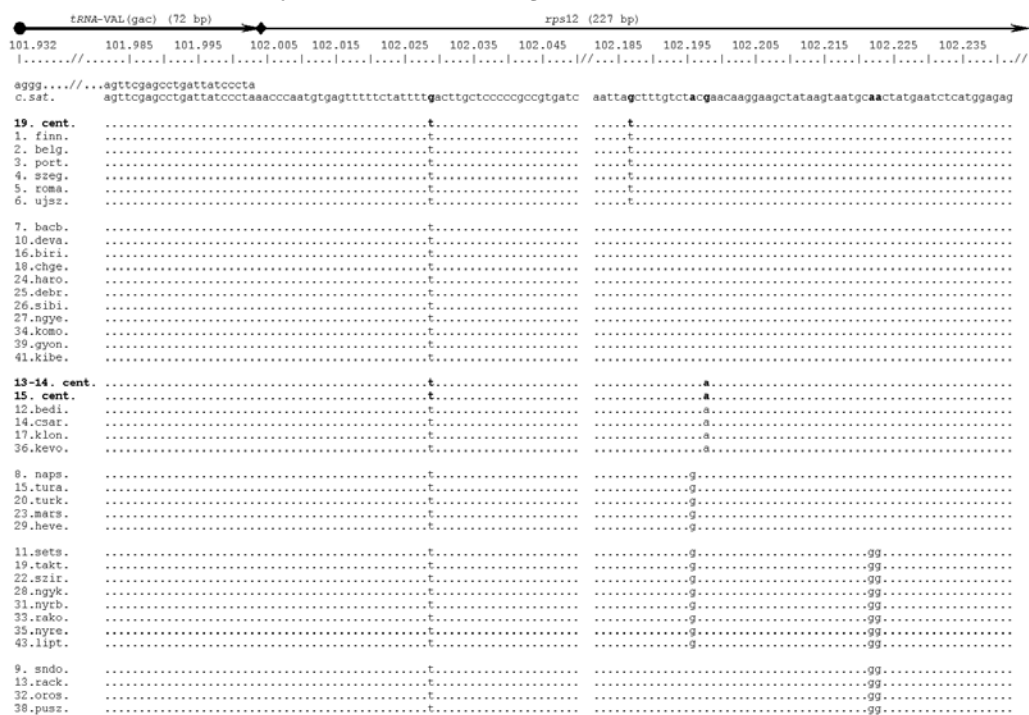


Figure 4: Sequence alignment of microsatellite at Clp-12 cpDNA (tRNA – Val) locus (299 bp) in the medieval and current watermelon (*Citrullus*) species and varieties

5. ábra: Molekuláris dendrogram (MEGA 4) a cpDNS tVal SNP szekvenciája alapján a mai és a régészeti *Citrullus* fajokban és fajtákban (a hússzín jelölésével), az uborka (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával

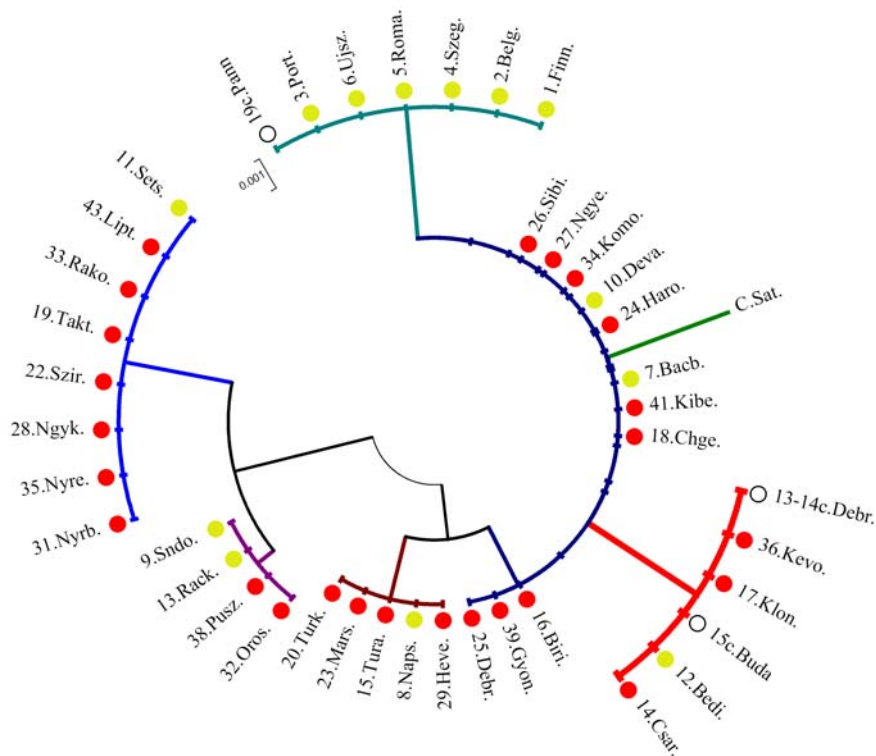


Figure 5: Molecular dendrogram MEGA4 of cpDNA (tRNA-Val) of *Citrullus* entries (flash colours are indicated) listed in Fig 2. (scale bar indicates nt substitutions per locus)

IRODALOM

- Al-Janabi, S. M.-Honeycutt, R. J.-Peterson, C.-Sobral, B. W. S. (1994): Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: *Saccharum*. *Theor. Appl. Genet.* 88: 933-944.
- Arumuganathan, K.-Earle, E. D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 211-215.
- Bernatzky, R.-Taksley, S. D. (1986): Methods for detection of single or low copy quences in tomato on southern blots. *Breed.* 43: 367-375.
- Danin-Poleg, Y.-Reis, N.-Tzuri, G.-Katzir, N. (2001): Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. *Theor Appl Genet* 1002: 61-72.
- Gyulai, G.-Humphreys, M.-Lágler, R.-Szabo, Z.-Toth, Z.-Bittsánszky, A.-Gyulai, F.-Heszky, L. (2006): Seed remains of common millet from the 4th (Mongolia) and 15th (Hungary) centuries; AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries. *Seed Science Research* 16: 179-191.
- Hanania, U.-Velcheva, M.-Sahar, N.-Perl, A. (2004): An improved methods for isolating high-quality DNA from *Vitis vinifera* nuclei. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 173-177.
- Hartyányi, P.-Nováki, B. (1975): Samen- und Fruchtfunde in Ungarn von der Jungsteinzeit bis zum 18. Jahrhundert. *Agrártört. Szeml.* 17, 1-22. Supplementum.
- Jarret, R. L.-Merrick, L. C.-Holms, T.-Evans, J.-Aradhya, M. K. (1997): Simple sequence repeats in watermelon (*Citrullus Lanatus* (Thunb.) Matsum.). *Genome* 40: 433-441.
- Kalendar, R.-Schulman, H. A. (2006): IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1: 2478-2484.
- Katzir, N.-Danin-Poleg, Y.-Tzuri, G.-Karchi, Z.-Lavi, U.-Cregan, P. B. (1996): Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. *Theor Appl Genet* 93: 1282-1290.
- Kihara, H. (1951): Triploid watermelons. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 58: 217-230.
- Kutil, B. L.-Williams, C. G. (2001): Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. *J Herdity* 92: 327-332.
- Lagercrantz, U.-Ellegren, H.-Andersson, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111-1115.
- Lágler, R. (2008): Archaeogenetics of common millet (*Panicum miliaceum*): ISSR and SSR sequence heterogeneity from a medieval sample to current varieties. PhD Thesis, Gödöllő, Hungary.
- Lágler, R.-Gyulai, G.-Humphreys, M.-Szabó, Z.-Horváth, L.-Bittsánszky, A.-Kiss, J.-Holly, L.-Heszky, L. (2005): Morphological and molecular analysis of common millet (*P. miliaceum*) cultivars compared to an aDNA sample from the 15th century (Hungary). *Euphytica* 146: 77-85.
- Lágler, R.-Gyulai, G.-Szabó, Z.-Tóth, Z.-Bittsánszky, A.-Horváth, L.-Kiss, J.-Gyulai, F.-Heszky, L. (2006): Molecular diversity of common millet (*P. miliaceum*) compared to archaeological samples excavated from the 4th and 15th centuries. *Hung Agric Res* 2006/1: 14-19.
- Lippay, J. (1664): *Posoni kert. Posen.*
- Lodhi, M. A.-Ye, G. N.-Weeden, N. F.-Reisch, B. I. (1994): A simple and efficient method for isolation for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species.
- Loomis, W. D. (1974): Overcoming problems of phenolic and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles.
- Messier, W. S.-Li, H.-Stewart, C. B. (1996): The birth of microsatellites. *Nature*, 381 (6 June): 483.
- Neuvéglise, C.-Feldmann, H.-Bon, E.-Gaillardin, C.-Casaregola, S. (2002): Genomic evolution of the Long Terminal Repeat retrotransposons in Hemiascomycetous yeasts. *Genome research* 12: 930-934.
- Nyékelyi, B. D. (2003): *Monumenta Historica Budapestinensia XII. Historical Museum of Budapest, Hungary*, 1-102.
- Orti, G.-Pearse, D. E.-Avisé, J. C. (1997): Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10745-10749.
- Röder, M. S.-Korzun, V.-Wendehake, K.-Plaschke, J.-Tixier, M. H.-Leroy, P.-Ganal, M. W. (1998): A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Schermann Sz. (1966): *Magismeret, I, II. Akadémiai Kiadó, Budapest.*
- Szabó, Z.-Gyulai, G.-Humphreys, M.-Horváth, L.-Bittsánszky, A.-Lágler, R.-Heszky, L. (2005a): Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica* 146: 87-94.
- Szabó, Z.-Gyulai, G.-Horváth, L.-Bittsánszky, A.-Szani, Sz.-Lágler, R.-Kiss, J.-Gyulai, F.-Holly, L.-Heszky, L. (2005b): Genetic diversity of Hungarian melon landraces (*C. melo*) compared to an extinct sample from the Middle Ages. *Hung Agric Res* 2005/2: 18-22.
- Szikszai Fabriczius B. (1591): *Nomenclatura*. In: Melich J. (1906): *Szikszai Fabriczius Balázs latin-magyar szójegyzéke*.
- Taylor, J. S.-Durkin, J. M. H.-Breden, F. (1999): The Death of a Microsatellite: A Phylogenetic Perspective on Microsatellite Interruptions. *Mol. Biol. Evol.* 16 (4): 567-572.
- Toth, G.-Gaspari, Z.-Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Vavilov, I. N (1951): *The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants* (K. Starr Chester). 1951. *Chronica Botanica* 13:1-366.; és *Origin and Geography of Cultivated Plants* (fordította Doris Love) (1992). Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0-521-40427-4.
- Weber, J. L.-Wong, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123-1128.
- Zamir, D.-Navot, N.-Rudich, J. (1984): Enzyme polymorphism in *Citrullus lanatus* and *C. colocynthis* in Israel and Sinai. *Plant Syst. Evol.* 146: 163-170.
- Zhang, X.-Jiang, Y. (1990): Edible seed watermelons (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) in northwest China. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 13: 40-42.
- OMMI (2004): *National list of varieties*. Ed.: Neszmélyi, K. National Institute for Agricultural Quality Control, Budapest, Hungary.