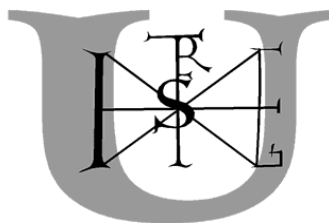


Szent István Egyetem  
Gödöllő



# **A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) domesztikációja és molekuláris evolúciója**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Tóth Zoltán

Gödöllő  
2013

**Doktori iskola** Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

**Vezető** Dr. Heszky László  
egyetemi tanár,  
az MTA rendes tagja  
SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet  
Gödöllő

**Tudományág** Agrártudományok

**Programvezető** Dr. Heszky László  
egyetemi tanár,  
az MTA rendes tagja  
SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet  
Gödöllő

**Témavezető** Dr. Gyulai Gábor  
egyetemi tanár, az MTA doktora  
a biológiai tudományok kandidátusa  
SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet  
Gödöllő

.....  
Dr. Gyulai Gábor  
témavezető

.....  
Dr. Heszky László  
programvezető

.....  
Dr. Heszky László  
a doktori iskola vezetője

## TARTALOMJEGYZÉK

1. CÉLKITŰZÉS.....	5
2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	6
2.1 A régészeti genetika (Muzeomika) és jelentősége .....	6
2.1.1 ősdNS leletek a növényvilágból.....	6
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	8
3.1 A régészeti növényanyag .....	8
3.1.1 Magbiológiai meghatározás.....	8
3.1.2 In vitro inkubáció.....	8
3.1.3 ősdNS-izolálás .....	8
3.2 Összehasonlító Citrullus fajták és tájfajták.....	8
3.3 Molekuláris vizsgálatok.....	9
3.3.1 ITS .....	9
3.3.2 SSR.....	9
3.3.3 cpDNS .....	9
3.3.4 Lcyb színgén.....	10
3.3.5 WGA .....	10
3.3.6 ALF .....	10
3.4 Szekvencaanalízis.....	10
3.5 Statisztikai feldolgozás.....	10
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS .....	11
4.1 Görögdinnyemagok feltárása.....	11
4.2 A mai fajták morfológiai összehasonlítása görögdinnye-típusok szerint.....	11
4.3 DNS izolálás az archeológiai, és a mai fajtákból.....	11
4.4 Teljes genom felszaporítása (WGA).....	11
4.5 Összehasonlító molekuláris vizsgálatok .....	11
4.5.1 ITS elemzés .....	11
4.5.2 SSR elemzések .....	11
4.5.3 cpDNS elemzés .....	12
4.5.4 lcyb színgén szekvenca elemzése .....	12
4.6 Szekvencaanalízis és fajtarekonstrukció klaszter analízis alapján .....	12
4.6.1 Sejtmagi DNS analízis.....	12
4.6.1.1 ITS szekvenciák .....	12
4.6.1.2 SSR elemzés.....	13
4.6.1.3 A kloroplasztisz-DNS (cpDNS) elemzése.....	15
4.6.1.4 A lcyb színgén elemzése .....	17
4.6.2 Fajtarekonstrukció .....	18
4.7 Új tudományos eredmények .....	19
5. ÖSSZEFOGLALÁS.....	20
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	21
7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK.....	22
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	24

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	adenin
ABI prism:	ABI PRISM® 310 DNS Szekvenáló
aDNA:	(ancient DNA) ősdNS
ALF:	Automata Lézer Fluorométer
AP-PCR:	(Arbitrarily Primed PCR) Véletlenszerűen kapcsolt PCR
bp:	bázispár
C	citozin
CAPS:	Cleaved amplified polymorphic sequence
cM:	centiMorgan
cp:	(Chloroplast) kloroplaszt
DNS:	Dezoxi-ribonukleinsav
dNTP:	Dezoxi-nukleotid-trifoszfátok
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
EST:	(Expressed Sequence Tag) Expresszálódó szekvencia részletek
EtBr:	Etídium-bromid
G	guanin
GC:	Gázkromatográfia
IMA:	Inter Mikroszatellita Amplifikáció
ITS:	(Internal Transcribed Spacer) Belső átíródó rDNS spacer
LB:	Luria-Bertani féle táptalaj
MDA:	Multiple Displacement Amplification
MgCl <sub>2</sub> :	Magnézium-klorid
mM:	millimol
MS:	Murashige és Skoog alaptáptalaj
MSD:	Multiple Strand Displacement
mtDNS:	Mitokondriális DNS
Na-OCl:	Nátrium-hipoklorit
ng:	nanogramm
PCR:	(Polimerase Chain Reaction) Polimeráz lánreakció
pg:	pikogramm
pM:	pikomol
PTB:	N-fenilsav thiazólium-bromid
QTL:	(Quantitative Trait Loci) Kvantitatív tulajdonság lókusza
rbcL:	kloroplaszt ribulózbifoszfát-karboxiláz
rDNS:	riboszómális DNS
RNS:	Ribonukleinsav
SDS:	Nátrium-dedocil-szulfát
SNP:	(Single Nucleotid Polymorphism)
SSR:	(Simple Sequence Repeat) Egyszerű szekvencia ismétlődés
T	Timin
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometán
Tris-HCl:	Tris hidroklorid
UV:	Ultra-ibolya sugárzás
WGA:	(Whole Genom Amplification) Teljes genom felszaporítás
μl:	mikroliter

## 1. CÉLKITŰZÉS

A 80-as évek közepéig a kutatók úgy gondolták, hogy csak a biokémiaiilag stabilabb molekulák, mint pl. a lignin állhat ellen az élőlény pusztulását követő lebomló folyamatoknak, míg a DNS teljes pusztulása miatt nem vizsgálható. A DNS az idő múlásával degradálódik, azonban szerencsés körülmények (alacsony hőmérséklet (Ottoni *et al.*, 2009), gyors kiszáradás, magas sókoncentráció, száraz körülmények) között kevésbé károsodik (Mateiu *et al.*, 2008; Rambaut *et al.*, 2009), ezáltal lehetőséget biztosítva az ősdNS vizsgálatához. Ezért megfelelő körülmények között (hideg, száraz, alacsony oxigén) a DNS túlélése biztosított (Smith *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 2000; Pruvost *et al.*, 2007). Ezzel egy új tudományterület, az archeogenetika született meg, amely lehetővé teszi az évszázadok, évezredek óta konzerválódott növényi maradványok DNS-ének kinyerését, és a PCR technológia felhasználásával visszanyert kis mennyiségű örökítőanyag, - akár egy kópiából - az ősi DNS amplifikációját.

A vizsgálatainkban felhasznált *Citrullus* magvak egyrésze a debreceni volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak növényanyaga, melyek kora a 13. századra datálható. A 15. századi *Citrullus* magvak a budai királyi vár (Árpád-házi IV. Béla Király, 1243) Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje), régészeti feltárása (1999) során (Budapest I. Ker., Szent György tér, Teleki palota, 8 sz. kút) (Nyékhelyi, 2003) kerültek felszínre. Az ásások folyamán nagy mennyiségű növénymaradvány került elő, 195 növényfaj több mint 3 millió maglelete (Gyulai *et al.*, 2006). A 19. századi *Citrullus* mag botanikai gyűjtemény anyaga, az un. Pannonhalmi Apátság botanikai gyűjteményéből bocsátották rendelkezésünkre (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest).

A DNS megmaradásának szempontjából a kedvező környezeti körülmények eredményeképp maradhattak a magvak jó megtartásúak, ezáltal lehetőséget adva a sikeres DNS-izolálásnak és felszaporításnak. A molekuláris vizsgálatok lehetőséget nyújtanak a középkori Magyarországon termesztett és fogyasztott ősi *Citrullus* típusok azonosítására. A negyvennégy mai fajtával (hazai-, külföldi-, táj- és termesztett fajták) való molekuláris és morfológiai összehasonlítás alapján megállapítható az ősi növények habitusa és elkészíthető a pontos rokonsági kapcsolatokat feltáró klaszter analízis.

Munkánk célja a 13.- 15.- és 19. századi régészeti- és herbáriumi magleletek *Citrullus* magvainak archeogenetikai feldolgozása, amely során az alábbi feladatokat tűztük ki célul:

1. Kiiszapoljuk, kiválogatjuk és meghatározzuk a 13.- 15.- és 19. századi *Citrullus* dinnyemag leleteket.
2. Kimutatjuk, és izoláljuk a magmaradványokban fennmaradt ősdNS-t, meghatározzuk degradációjának mértékét, és összehasonlítjuk a mai fajták DNS mintáinak sejtmagi (nDNS) és kloroplasztisz DNS (cpDNS) mintáival.
3. Igazoljuk a sejtmagi (nDNS) riboszómális DNS (rDNS) ITS (internal transcribed spacer) lókuszának elemzésével a *Citrullus* fajok *molekuláris domesztikációs* lépéseit, valamint a magok exogén/endogén fertőzésmentességét, és kizárjuk az exogén fertőzött magvakat.
4. Meghatározzuk a sejtmagi nSSR lókuszek elemzésével a mikroszatellita lókuszek *molekuláris evolúcióját* 44 mai fajtával történő összehasonlításban (8 magyar fajta, 10 külföldi fajta, és 25 tájfajta).
5. A cpDNS lókuszek elemzésével új *Citrullus* haplotípusokat határozzunk meg.
6. Igazoljuk a teljes genom amplifikálás (WGA) alkalmazhatóságát az ősi DNS mintákban, megvizsgáljuk a szekvenciahűségét, és meghatározzuk a felszaporítás határfokát.
7. Fajtarekonstrukciót végzünk az ősdNS minták SSR és cpDNS fragmentum mintázata alapján az ősi *Citrullus* növényanyag genotípusának meghatározására *molekuláris dendrogram* elemzéssel.
8. Rekonstruáljuk a régészeti *Citrullus* leletek fenotípusát 44 mai fajtával való morfológiai (24 morfológiai marker alapján) összehasonlításban *morfológiai dendrogram* elemzéssel.
9. Azonosítjuk a régészeti *Citrullus* magleletek fenotípusos tulajdonságait, különös tekintettel a hússzín (*lcyb* gén) meghatározására.

## 2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A régészeti genetika (Muzeomika) és jelentősége

Az archeogenetika a természettudományok egyik legújabb tudományterülete, amely alig két évtizedes múltta tekint vissza, ennek ellenére gyors tempóban fejlődő terület, állandóan megújuló módszerekkel, technikákkal.

Az archeogenetika segítségével a kihalt élőlények évszázadok és évezredek óta konzerválódott sejtjeiből ősDNS rekonstruálható (Brown, 1999; Cooper és Poinar, 2000; Gugerli *et al.*, 2005). Molekuláris módszerek és technikák segítségével tanulmányozhatjuk a különböző élőlények evolúciós fejlődését, valamint összehasonlíthatjuk a már kipusztult élőlények és a mai leszármazottainak vélt egyedek genetikai állományát, meghatározhatjuk genetikai távolságukat (Hofreiter *et al.*, 2001). Ezáltal fény derülhet nagyobb léptékű evolúciós változásokra az állat és növényvilágban egyaránt. A polimeráz láncreakció (PCR) kifejlesztése segítségével rutinszerűvé vált az akár egyetlen kiindulási molekulából történő DNS felszaporítás, hatalmas előrelépést jelentve az ősDNS kutatásokban (Pääbo *et al.*, 1988; Pääbo, 1989b; Thomas *et al.*, 1989).

Az archeogenetika mint önálló tudomány, éppen a PCR-eljárást (Mullis, 1986) kifejlesztő Cetus (USA) vállalat laborjában kezdődött a 140 éves, múzeumban őrzött, kihalt lófajta a quagga (*Equus quagga*) bőrmintájából kivont ősDNS vizsgálatával (Higuchi *et al.*, 1984). Az archeogenetikai kutatócsoportok az első időszakban állati és emberi (múmia) bőrből próbálkoztak DNS kivonással (Higuchi *et al.*, 1984; Pääbo, 1985, 1989b), azonban ezekről a munkákról később kiderült, hogy az izolált DNS számos esetben modern emberi (Cooper és Poinar, 2000; Hofreiter *et al.*, 2001; Pääbo *et al.*, 2004; Malmstrom *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2007), vagy bakteriális, illetve gomba eredetű szennyeződés eredményei.

A múzeumokban tárolt növényi és állati maradványok is jelentős segítséget nyújtanak az archeogenetikai kutatások fejlődéséhez (Suarez és Tsutsui, 2004), és tették lehetővé számos állat és növényfaj esetében az évszázadok, évezredek óta konzerválódott szövetekből ősDNS kivonását és rekonstruálását (Brown, 1999; Cooper és Poinar, 2000; Gugerli *et al.*, 2005; Gyulai *et al.*, 2006).

A 80-as évek közepéig a kutatók úgy gondolták, hogy csak a biokémiaiilag stabil molekulák, mint a lignin képesek fosszilizációs folyamatokkal járó lebomlást túlélni, míg a gének (DNS molekulák) teljes pusztulásuk miatt nem vizsgálhatók (Briggs *et al.*, 2000, Chalfoun és Tuross, 1999; Threadgold és Brown, 2003). A növényi és állati maradványokban fellelhető DNS-t az idő múlásával a különböző nukleázok lebontják (Higuchi *et al.*, 1984), azonban szerencsés körülmények között, mint pl. alacsony hőmérséklet, gyors kiszáradás, magas sókoncentráció mellett a DNS kevésbé degradálódik (Shen-Miller, 2002; Poinar *et al.*, 2003; Willerslev *et al.*, 2003).

Az európai archeogenetikai kutatások (Svédország) az egyiptomi múmia-kutatásokkal (Pääbo, 1985), és az első sikeres csontból történő DNS kivonással (Hagelberg *et al.*, 1989; Sykes, 1991, 2001, 2003) kezdődtek.

Hazánkban az archeogenetikai kutatások egyrészt humán (Kalmár, 2000; Fletcher *et al.*, 2003; Bogacsi-Szabó *et al.*, 2006; Mende, 2006), másrészt növényi archeogenetikai vonalon (Lágler, Gyulai *et al.*, 2005; Szabó, Gyulai *et al.*, 2005a) indultak.

#### 2.1.1 ősDNS leletek a növényvilágból

A növények esetében a legnagyobb problémát a mintavételezés jelenti, hisz rendkívül nehéz jómegtartású, DNS izolálásra alkalmas növénymaradványt feltárni. Idővel a növényi szövetek elbomlanak, és csak kivételesen szerencsés 'tárolási' körülmények között maradhatnak fenn növénymaradványok hosszú ideig. A növényi archeogenetikai kutatások egyrésze a mezőgazdaság kezdeteit (Freitas *et al.*, 2003), fejlődési folyamatait (Jaenicke-Despres *et al.*, 2003), és a géncsaládok evolúcióját vizsgálja (Allaby *et al.*, 1999).

A növényi mitokondriumban majdnem tízszer lassabban mennek végbe mutációk, mint a kloroplaszt DNS-ben, és százszor lassabban, mint az állati mitokondriumban (Soltis *et al.*, 1992). Ezért használják gyakrabban a mitokondriális vizsgálatokat növényekben.

A termesztett növények domesztikáció során végbement ugrásszerű változására a legjobb példát a kukorica régészeti genetikai vizsgálata szolgáltatta. Száraz körülmények között fennmaradt mexikói kukoricamagokból sikerült sejtmagi DNS-t izolálni, szekvenálni, és igazolni a teozintéből való szelekcióját, amely alig 6,300 évvel ezelőtt mehetett végbe a mai Mexikó területén (Goloubinoff *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999; Whitt *et al.*, 2002; Jaenicke-Despres *et al.*, 2003). A ma ismert legkorábbi kukorica-leletek Mexikóból, Kr.e. 5200-3400 közötti időből kerültek elő. A kezdetleges domesztikációt követően a kedvező morfológiai és biokémiai tulajdonságok szelekciója folytatódott, ami a feltárások során talált kukoricacsöveken is látható. A már azonosított növény szerkezetért, a raktározó fehérjékért, és a rosttermelésért felelős gének szekvenciájának variabilitása (allélikus diverzitás) a korai szelekciónak köszönhető (Wang *et al.*, 1999; Whitt *et al.*, 2002), és alacsonyabb a kukoricán belül, mint a teozintében. A DNS szekvenciáknak köszönhetően meghatározták a domesztikációban bekövetkezett fordulat (allél variabilitás csökkenése) pontos idejét (-4400 éve), és időtartamát (2500 év) (Jaenicke-Despres *et al.*, 2003).

A búza, vagy a szőlő eredetét még nem sikerült felderíteni. Búza esetében jelentős kutatások folynak vaskori ősdNS kinyerésére búza eredet vizsgálatokra (Brown *et al.*, 1999; Allaby *et al.*, 1999; Blatter *et al.*, 2002; Schlumbaum *et al.*, 2007).

Az archeológia és az archeobotanika régi, de ma is aktuális kérdése a szőlő eredete, domesztikációja, elterjedése, és nemesítése. A szőlő gazdasági és kulturális jelentősége ie. I. évszázadban alakulhatott ki, köszönhetően az Európa mediterrán részén kialakuló bortermelésnek és kereskedelemnek. Mikroszatellita markerekkel sikerült nukleáris DNS szekvenciákat felszaporítani 1700 és 2600 éves szőlőmagvakból, ami kiindulópontot adhat az ősi és ma termesztett fajták eredetéhez (Manen *et al.*, 2003; Thomas és Scott, 1993; Vouillamoz *et al.*, 2006). A sztratifikáció különleges esete a szibériai állandóan fagyott (permafrost) talajrétegekből feltárt magok DNS állományának elemzése (Abbott és Brochmann, 2003). Szibéria állandóan fagyott talajából (10 000-400 000 éves) számos faj mintáját sikerült elemezni, és 19 különböző növényi taxonból (*Poales*, *Liliales*, *Ericales*, *Malvales*, *Brassicales*, *Fagales*, *Fabales*, *Rosales*) ősdNS-t kivonni (Willerslev *et al.*, 2003, 2007). A talaj különböző mélységeiből (sztratifikált) feltárt növénymagvak ősdNS elemzése további számos virágos növényfaj (McGraw, 1993; Morris *et al.*, 2002) és páfrány (Schneller *et al.*, 1998) mikroevolúciós fejlődését tárta fel.

#### *Herbáriumi leletek:*

A herbáriumi gyűjtemények is jelentős mértékben járultak hozzá számos faj mikroevolúciós elemzéséhez (Savolainen és Reeves, 2004; Hodkinson *et al.*, 2007). Egyes vélemények szerint a herbáriumi minták nem lehetnek öregebbek, mint 500 év, csak így biztosítható a megfelelő DNS kinyerhetősége (Savolainen *et al.*, 1995) (ld. a 100 éves nád (*Phragmites australis*) végzett eredmények (Saltonstall, 2002, 2003). Viszont vannak régebbi leletek, a 4 000 éves tengeri fűből (Raniello és Procaccini, 2002) és a 3,600 éves Japán cédrusból (Tani *et al.*, 2003) izolált DNS vizsgálatokban..

A hazai növényi archeogenetikai kutatások az 1,600 éves- (Gyulai *et al.*, 2001, 2006), illetve 600 éves köles (Lágler, 2007; Lágler, Gyulai *et al.*, 2005, 2006), valamint a 600 éves sárgadinnye mikroevolúciós kutatásaira összpontosított (Szabó, Gyulai *et al.*, 2005a,b, 2006, 2007). További jelentős hazai eredmények születtek középkori magleletek DNS vizsgálatában (Bacsó *et al.*, 2004; Bisztray *et al.*, 2004; Bodor *et al.* 2004).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1 A régészeti növényanyag

A 13. századi debreceni *Citrullus* lelet, a volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak növényanyaga. A 15. századi *Citrullus* lelet a budai királyi vár (Árpád Házi IV. Béla Király, 1243) Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje), régészeti feltárása során (Budapest I. Ker., Szent György tér, Teleki palota, 8 sz. kút) került felszínre (Nyékhelyi, 2003). A 18. századi *Citrullus* lelet botanikai gyűjtemény anyaga, az ún. Pannonhalmi Apátság botanikai gyűjteményéből bocsátották rendelkezésünkre (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest). A 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 magvak tárolása -20 °C-on történt. A magokat flotálásos módszerrel iszapoltuk ki, majd laboratóriumi körülmények között határoztuk meg (Schermann, 1966). Felületi (Hofreiter *et al.*, 2001) sterilizálás után a magokat három hónapig F6 steril táptalajon (Gyulai *et al.*, 2006) inkubáltuk a különböző eredetű fertőzések elkerülésének kizárására. A nem fertőzött régészeti magokból valamint a mai termesztett fajtákból (Agrobotanikai Intézet, Tápiószele) DNS-izolálást végeztünk.

##### 3.1.1 Magbiológiai meghatározás.

A magbiológiai meghatározást számítógépes képanalizáló szoftver segítségével (a Tápiószelei Agrobotanikai Intézet segítségével) végeztük. A feldolgozás során sztereo-binokuláris mikroszkóp alatt a magvakat és a terméseket az egyéb szerves és szervetlen maradványoktól, szennyeződésektől elkülönítettük. A szervetlen maradványok mellett sok és változatos szervesanyag maradványt is találtunk: bőr, faszén, csigahéj töredék, rovar töredék, nyű/báb, giliszta maradványok, csont, hajszalak, stb. Ezek egykori hulladékok vagy véletlenszerűen a kutakba került szennyeződések lehettek. Ezt követően került sor a „finom válogatásra”. A mag- és termésmaradványokat - megtartásuktól függően - különböző taxonokig határoztuk meg. A meghatározás határozókönyvek (pl. Schermann, 1966) és archeobotanikai cikkek segítségével történt, és a meghatározott növénytani anyagot minden esetben összehasonlító mag- és termésgyűjteményben található recens magvakkal és termésekkel vetettük egybe. A határozókönyvek és a szakcikkek alapján azonban nem minden darab volt azonosítható biztonsággal. Ezért azokat minden esetben recens mag- és termésgyűjteményben található összehasonlító anyaggal vetettük egybe.

##### 3.1.2 In vitro inkubáció

Az ép régészeti magvak felületi fertőtlenítését követően (HgCl<sub>2</sub>, Na-OCl) félsteril körülmények között 20°C-on csíráztattuk az esetleges túlélő embriók izolálásához (Gyulai *et al.*, 1992). A sejtenyészetek indításához, a fertőtlenítést követően továbbra is az aerob kórokozóval fertőzött magvak kiszűréséhez steril szövettenyészeti technikát, és növényi hormonokkal kiegészített in vitro táptalajt alkalmaztunk (Gyulai *et al.*, 1995).

##### 3.1.3 ősDNS-izolálás

A genomikus DNS kivonásához CTAB extrakciós eljárás alapján (Bernatzky, 1986) módszert használtunk. Ezen módszert kiegészítettük NaCl a poliszacharid, illetve PVP (Polyvinylpyrrolidone)(Hanania, 2004) hozzáadásával a polifenol (Lodhi *et al.*, 1994) szint csökkentése érdekében. A fenol oxidációjának (Loomis, 1974) megakadályozása céljából Nátrium biszulfátot használtunk. 0,1 g magot porítottunk cseppfolyós nitrogénben, majd 1000 µl Homogenizációs pufferben (1M hexilene-glicol, 10mM Tris (pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% triton, 5mM 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.5% triton, 5mM 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. 10perc 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).

#### 3.2 Összehasonlító *Citrullus* fajták és tájfajták

Az vizsgálataink során a régészeti *Citrullus* leletek genotípusának, fenotípusának azonosításánál, és fajtaköri besorolásánál a tápiószelei génbank *Citrullus* gyűjteménye képezte az összehasonlítás alapját. 5 magyar 9 külföldi és 30 tájfajtát vizsgáltunk meg. A mai fajták morfológiai felvételezését 24 fenotípusos bélyeg (Agrobotanikai Központ, Tápiószele) alapján végeztük el, 3 kisparcellás kísérletben ismétléssel. A fajtarekonstrukcióban vizsgált mai sártök (1-3, *Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6, *Citrullus lanatus*



*citroides*) és görögdinnye (7-44, *Citrullus lanatus*) fajták és tájfajták, eredete és kódszáma (ABI Tápiószele) (Tóth *et al.*, 2007b). A beállított kísérlet parcellái 2X5 méter nagyságúak voltak. A vizsgálatokban felhasznált faj, illetve fajtákat parcellánként 3 ismétlésben ültettük el. Az egyes parcellákon belül 1,5x1,5 méter terület jutott egyedenként. Az egyes parcellák között egy-egy 40cm széles művelő úttal, melyről a növényvédelmi munkákat végezték.

### 3.3 Molekuláris vizsgálatok

#### 3.3.1 ITS

A munkánk során egy korábban egyszerűsített PCR amplifikáció és szekvenáló módszert (Hsiao *et al.*, 1995) használtunk az alábbi módosításokkal: Az alkalmazott primerekkel (ITS1/ITS4) a teljes ITS szakaszt (ITS1-5.8S-ITS2) szaporítottuk fel. (Garcia-Mas *et al.*, 2004). A primerpár szekvenciája (Hsiao *et al.*, 1995):

ITS L: 5'-cgcgtttacaaacaattgtcc-3'  
 ITS 4/1: 5'-acactacggtggtgatccg-3'  
 ITS4/2: 5'-gtcccccaaggatgacgc-3'

#### 3.3.2 SSR

Az összehasonlító SSR vizsgálatokban 47 mikroszatellita oligonukleotid-párból 12 bizonyult hatékonynak (1. táblázat). A PCR reakciót 25 µl végtér fogatban végeztük el 30 ng templát DNS, 10-20 pM primer, 1x-es koncentrációjú PCR puffer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP és 1 egység (U) Taq polimeráz (Sigma) felhasználásával. A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen módosítottuk: 2 perc 95°C, majd 5 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 62°C, 1 perc 72°C, majd 30 x 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 elválasztását horizontális (1,5%) agaróz gélen végeztük EtBr-os festést alkalmazva (60 W, 1 óra).

1. táblázat. Az SSR vizsgálatokhoz alkalmazott 12 primerpár szekvenciája (Katzir *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 1997, Jarret *et al.*, 1997).

#	lókus	primer-pár szekvenciák	Hivatkozás
1.	CmTC 51	attggggtttctttgaggtga ccatgtctaaaaactcatgtgg	Katzir <i>et al.</i> , 1996
2.	CmTC 168	*atcattggatgtgggattctc acagatggatgaaaccttagg	Katzir <i>et al.</i> , 1996
3.	CMACC 146	caaccaccgactactaagtc cgaccaaacccatccgataa	Katzir <i>et al.</i> , 1996
4.	Bngl 339	ccaaccgtatcagcatcage gcagagctctcatcgtcttctt	Smith <i>et al.</i> , 1997
5.	Bngl 118-2	gccttcagccgcaacct cactgcatgcaaaaggcaaccaac	Smith <i>et al.</i> , 1997
6.	Bngl 161	gctttcgtacacacacattca atggagcatgagcttgcatttt	Smith <i>et al.</i> , 1997
7.	Phi 121	aggaaaatggagccgggtaacca ttggtctggaccaagcacatacac	Smith <i>et al.</i> , 1997
8.	Phi 118-2	atcggatcgctgcccgtcaaa agacacgacggtgtgtccatc	Smith <i>et al.</i> , 1997
9.	Cl 1-06	cacctcctccagttgtcattcg aaggctcagcaaacggcatagg	Jarret <i>et al.</i> , 1997
10.	Cl 1-20	cgcgctgaggaccctata aacgctcctcaatcaattgc	Jarret <i>et al.</i> , 1997
11.	Cl 2-23	gaggcggaggagttgagag acaaaacaacgaaacctatgc	Jarret <i>et al.</i> , 1997
12.	Cl 2-140	cttttctctgatttgactgg actgtttatcccgacttacta	Jarret <i>et al.</i> , 1997

#### 3.3.3 cpDNS

A kloroplaszt molekuláris elemzést két cpDNS (ycf9; trnVAL) (1. táblázat) primer felhasználásával végeztük. A PCR reakciót 25 µl végtér fogatban végeztük el 30 ng templát DNS, 10-20 pM primer, 1x-es koncentrációjú PCR puffer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP és 1 egység (U) Taq polimeráz (Sigma) felhasználásával. A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen módosítottuk: 2 perc 95°C, majd 5 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 62°C, 1 perc 72°C, majd 35 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 57°C, 1 perc 72°C, végül 5 perc 72°C (\*-Touch down 65°C - 55°C). A reakciótermékek elválasztását horizontális (1,5%) agaróz gélen végeztük EtBr-os festést alkalmazva (60 W, 1 óra).

2. táblázat. A cpDNS vizsgálatokhoz alkalmazott primerpár szekvenciája (Al-Janabi *et al.*, 1994, Dane *et al.*, 2004).

#	lókus	primer-pár szekvenciák	hivatkozás
1.	clp12	agttcgagcctgattatccc gatgaacgctggcggcatgc	Al-Janabi <i>et al.</i> , 1994
2.	ycf 9	aattagaggagggtctcttgc ataataggctagctctgcactgatg	Dane <i>et al.</i> , 2004

### 3.3.4 *Lcyb* színgén

Az *lcyb* színgén molekuláris elemzését egy színgén (*lcyb*) (2. táblázat) primer felhasználásával végeztük, A PCR reakciót 25 µl végtérfoogatban végeztük el 30 ng templát DNS, 10-20 pM primer, 1x-es koncentrációjú PCR puffer (50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% zselatin), 1-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTP és 1 egység (U) Taq polimeráz (Sigma) felhasználásával. A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen módosítottuk: 2 perc 95°C, majd 5 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 65°C, 1 perc 72°C, majd 35 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 60°C, 1 perc 72°C, végül 5 perc 72°C (\*-Touch down 65°C - 55°C). A reakciótermékek elválasztását horizontális (1,5%) agaróz gélen végeztük EtBr-os festést alkalmazva (60 W, 1 óra).

3. táblázat. A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) *LCYB/lcyb* színgén vizsgálatokhoz alkalmazott 2 primerpár szekvenciája (Bang *et al.*, 2007).

#	lókusz	primer-pár szekvenciák	hivatkozás
1.	LCYB 314	cctgttctctggagttctt gaaaaagtgagtggtgagga	Bang <i>et al.</i> , 2007
2.	LCYB 1134	aatgatggtgtgaccattcaag cttacaatccaggctaccagg	

### 3.3.5 WGA

A WGA felszaporítás lépéseit a következőképpen hajtottuk végre: (a) Fragmentálás: A DNS-ből ddH<sub>2</sub>O-val 1 ng/µl koncentrációjú oldatot készítettünk, a mintákhoz 1 µl 10 x fragmentáló puffert és 9 µl DNS-t (1 ng/µl) adtunk, és 4 percig 95°C-on denaturáltuk (PCR-készülékben, majd jégfürdő, és rövid centrifugálás). (b) Genomi könyvtár készítése: A mintánkhöz 2 µl 1 x Könyvtár Preparáló Puffert, majd 1 µl stabilizáló puffert adtunk. Enyhe vortexelés, majd rövid centrifugálás után 2 percig 95°C-on denaturáltuk, rövid centrifugálás után ismét jégre helyeztük a mintákat. A következő lépésben 1 µl Könyvtár Preparáló Enzimet adtunk a mintákhoz, majd enyhe vortexelés után ismét jégfürdőt alkalmaztunk. Ezt követően egyetlen ciklusból álló PCR reakciót indítottuk a következő paraméterekkel: 16°C/20 perc, 24°C/20 perc, 37°C/20 perc, 75°C/5 perc, tárolás 4°C. (c) PCR amplifikálás / 2: A genomi könyvtárhoz mintánként 60 µl PCR mastermix-et adtunk: 7.5 µl 10X Amplification Master Mix, 47.5 µl nukleáz mentes víz, 5.0 µl WGA phi29 DNS polimeráz. Az így kapott 75 µl végtérfoogatú oldatból újabb PCR reakciót indítottuk: 95°C/3 perc, majd, 14 ciklusban: 94°C/15 mp; 65°C/5 perc, és 4°C, majd tárolás -20°C.

### 3.3.6 ALF

Az ALF SSR primer párok egyik tagját Cy5 fluoreszcens molekulával jelöltük (Gyulai *et al.*, 2006). A Cy5 abszorpciója 643 nm-en, emissziója 667 nm-en veszi föl a maximális értéket. Az SSR fragmentek szeparálását ALF express II DNA Analyser (*automated laser fluorometer*) készülékkel ReproGel High Resolution PAGE gél (24%) (Amersham) alkalmazásával, rövid thermoplate-en végeztük (850 V., 50 mA., 50 W, 50°C, 120 perc). Az adatok feldolgozása ALFwin Fragment Analyser 1.03 szoftverrel történt. A futtatásokhoz Cy5-el jelölt külső és belső molekulatömeg markereket alkalmaztunk standardként (Gyulai *et al.*, 2006).

### 3.4 Szekvenciaanalízis

A fragmentumok gélből történő visszaizolálását és tisztítását követően BigDye Terminátor szekvenáló kit felhasználásával végeztük el (Applied Biosystems BigDye v 3.1) ABI Prism 3100 DNS szekvenátorban. A fragmentumokat a szekvenálás előtt klónozó vektorba építettük (pGEM- TEasy vektor kit, Promega). A visszaizolálás után, 10 perc, 14,000 rpm, 4°C-on centrifugáltuk. A templáthoz 5 µl az alábbi klónozó mixet adtunk (2 µl desztillált víz, 1 µl pGEM- TEasy vektor , 1 µl T4 DNS ligáz és 1 µl 2x Rapid Ligation Buffer). Ezt követően 3 órán át inkubáltuk a mintákat 22°C-on, majd a mintákhoz 50 µl *E. coli* JM109 sejtet valamint 10 µl plazmid DNS-t mértünk. 20-25 perc jégfürdő után 60 mp 42°C-os hősokk következett, majd jégre helyezve 250 µl folyékony LB tápoldatot adtunk a mintákhoz. 12,000/perc fordulatszámmal 1 percig töményítettük a sejteket, és 50 µl tápoldatban szuszpendálva antibiotikummal kiegészített táptalajra szélesztettük. A klónozás sikerességét a kinövő kolóniákból indított kolónia-PCR-rel ellenőriztük, és ezt követően mintánként 3 klónt szekvenáltunk meg. A szekvenáláshoz az ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer eljárást alkalmaztuk.

### 3.5 Statisztikai feldolgozás

A statisztikai elemzéseket a Microsoft Excell, valamint az SPSS 16 programcsomaggal végeztük. Az egyes lókuszok variabilitását a PIC érték (polymorphism index content) meghatározásával végeztük, amelynek kiszámításához az Anderson *et al.*, (1993) formulát alkalmaztuk:  $PIC = 1 - \sum_{n-i} P_i^2$ , ahol a pi érték az i allél gyakorisága. A szekvencia illesztéshez a BioEdit Sequence Alignment Editor (NCSU, USA) (Hall, 1999) és CLUSTALW EMBL-EBI (Thompson *et al.*, 1994); a blast elemzéshez a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), a szekvencia elemzéshez az NCBI (National Center for Biotechnology Information) programokat alkalmaztuk (Altschul *et al.*, 1997). A kladogram elemzéshez az SPSS-16 (Jaccard Similarity Index; Jaccard, 1908; Average Linkage, within group), MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2007) programokat alkalmaztuk.

#### 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

##### 4.1 Görögdinnyemagok feltárása

A 13. századi *Citrullus* magok a debreceni volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak ásatásai során előkerült növényleleteiből származnak. A 15. századi *Citrullus* magvak a budai királyi vár (Árpád-házi IV. Béla Király, 1243) Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje) régészeti feltárása (1999) során (Budapest I. Ker., Szent György tér, Teleki palota, 8 sz. kút) (Nyékhelyi, 2003) kerültek feltárássra. Az ásatások során nagy mennyiségű növénymaradvány került elő, 195 növényfaj több mint 3 millió maglelete (Gyulai *et al.*, 2006). A régészeti kormeghatározás alapján (pénzek, edények stb.) a *Citrullus* magok eredete a 15. század első felére volt azonosítható (Nyékhelyi, 2003). A 19. századi *Citrullus* lelet botanikai gyűjtemény anyaga, az un. Pannonhalmi Apátság botanikai gyűjteményéből bocsátották rendelkezésünkre (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest) (Vörös, 1971).

##### 4.2 A mai fajták morfológiai összehasonlítása görögdinnye-típusok szerint

A régészeti minták fenotípus rekonstrukciójához 44 mai fajtát vizsgáltunk meg kisparcellás kísérletben. A parcellák 2 x 5 méter méretűek voltak. Faj illetve fajtákat parcellánként 3 ismétlésben ültettük el. Körülbelül 1,5 x 1,5 méter terület jutott egyedenként. A mai fajtákat mag, héj és hússzín szerint csoportosítottuk. A morfológiai felvételezést 25 bélyeg (Agrobotanikai Központ, Tápiószele) alapján végeztük el. Az elemzés során a Jaccard (1908) indexek segítségével elkészítettük az összehasonlító dendrogramot (Szabó *et al.*, 2005a,b). A görögdinnye fajtatípusokba történő besorolását megnehezíti a rendkívüli szín és forma gazdagság a terméshéj, terméshús és a mag tekintetében. A felvételezett adatok alapján a 44 vizsgált görögdinnyefajta és tájfajta elkülöníthető volt a *Citrullus lanatus lanatus* a *Citrullus lanatus citroides* és a *Citrullus colocynthis* elterjedt fő típusok szerint.

##### 4.3 DNS izolálás az archeológiai, és a mai fajtákból

A régészeti mintákból származó, valamint a mai *Citrullus* magokból izolált DNS mennyiségi és minőségi jellemzőit NanoDrop UV spektrofotométerrel mértük meg, amely alkalmas volt a legpontosabb abszorpciós elemzésekre is (A260/280 és A260/230). A régészeti mintákból kis mennyiségű, töredezett DNS-t kaptunk, 100-3000 bp nagyságban, míg ezzel szemben a mai fajtákból nagy mennyiségű, kompakt DNS-t izoláltunk.

##### 4.4 Teljes genom felszaporítása (WGA)

A felszaporítás hatékonyságát minden esetben agaróz gélen ellenőriztük. Az egységnyi (9 ng) DNS mintákból történő teljes genom amplifikálás (WGA) hatékonysága a régészeti *Citrullus* leletek (13. sz, 15. sz, 19. sz); és két mai fajta (2,4), valamint a kontrol humán DNS (1) és a DNS-mentes minta (3) kontrolljában. A teljes genom amplifikáció (WGA) hatékonysága az izolált (a) és WGA amplifikált (b) *Citrullus* DNS minták mennyiségi (ng/μl) és UV-spektrofotometriás minőségi értékeiben (A260/A280, A260/A230) valamint (c) a WGA- amplifikáció hatékonysága.

##### 4.5 Összehasonlító molekuláris vizsgálatok

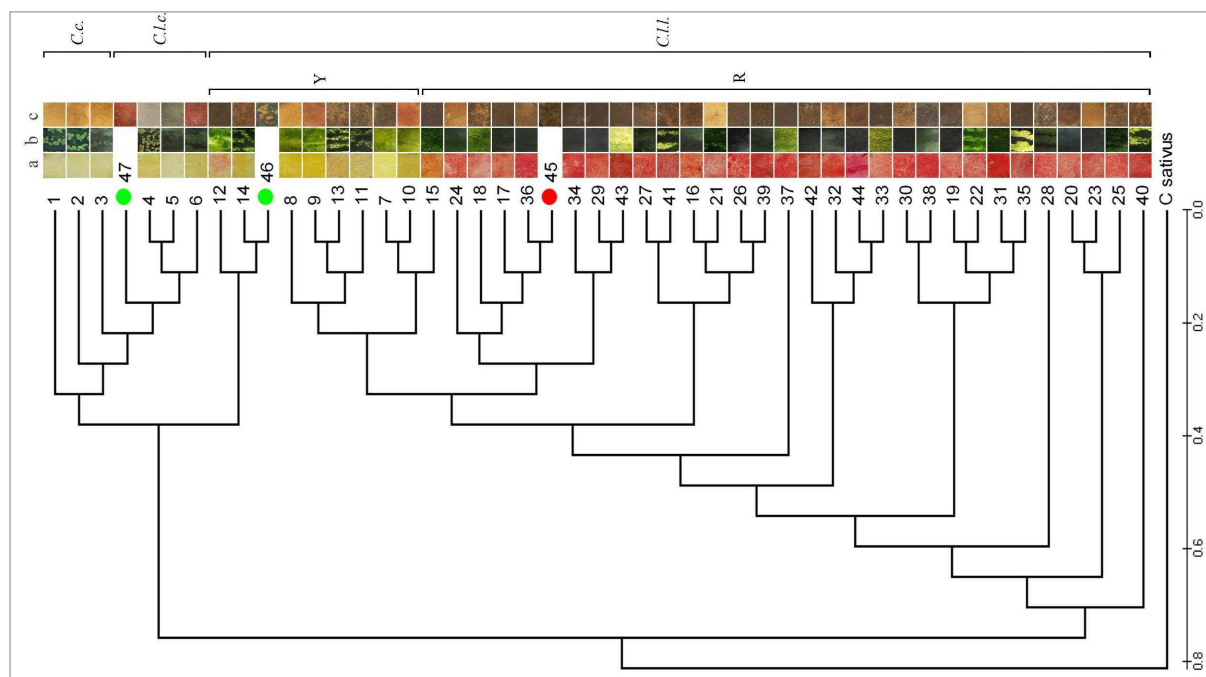
###### 4.5.1 ITS elemzés

A molekuláris vizsgálatokban először ITS elemzést végeztünk a régészeti és mai *Citrullus* mintákban. Az alkalmazott primerek (Hsiao *et al.*, 1995) alapján az alábbiak szerint módosítottuk. Amely primerek használatával egy közel 610 bp és egy kisebb 130 bp nagyságú fragmentumot szaporítottunk fel a régészeti és a mai *Citrullus* mintákból.

###### 4.5.2 SSR elemzések

Az SSR analízis során 47 mikroszatellita oligonukleotid-párt teszteltünk, amelyből 16 bizonyult hatékonyak (Katzir *et al.*, 1996; Danin-Poleg *et al.*, 2001), a primerek 80%-ával, azaz 12 primerrel kaptunk megismételhető amplifikációt a mai, és a régészeti mintákban. A mikroszatellita lókuszokat ALF módszerrel hasonlítottuk össze. A vizsgált 44 mai *Citrullus* fajtát és a régészeti mintákat 12 SSR markerrel vizsgáltuk, melyekben 23 lókuszon összesen 701 fragmentumot azonosítottunk. Végül a 12 SSR primer adatainak felhasználásával molekuláris dendrogram (1. ábra) elemzést végeztünk a mai

(1-44), valamint a régészeti *Citrullus* leletekben (45-47), az uborka (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával.



1. ábra: Molekuláris dendrogram elemzés a mai (1-44), valamint a régészeti (45-47) *Citrullus* mintákban a 12 SSR mikroszatellita lókuszon, 23 allél, 701 fragmentuma alapján, az uborka (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával (SPSS16), a hús (a), héj (b) és magszín (c) feltüntetésével.

A molekuláris dendrogram elkészítése után láthatóvá vált, hogy a három régészeti *Citrullus* lelet, három egymástól eltérő csoportba rendeződött a mai *Citrullus* fajtákkal. A dendrogram elemzése során elmondható, hogy a 13. századi debreceni lelet a #17 (Klondike) és #36 (Kecskeméti vöröshúsú), a 15. századi budai a #12 (Belyj dlinnij) és #14 (Csárdaszállás), míg a 19. századi *Citrullus* maglalet a #4 (Szeged), #5 (Román 235), #6 (Újszilvás) mai fajtákkal mutatja a legközelebbi rokonságot.

#### 4.5.3 cpDNS elemzés

A kloroplasztisz (cpDNS) két lókuszon elemeztük: a *ycf9-orf62* (a PSII PsbZ protein központi alegységét kódoló génje) és *trnVAL-rps12* (a valin tRNS-t és a 12S riboszómális protein-t kódoló gének) szakaszain. Az *ycf9-orf62* primer esetében egy 640 bp hosszúságú fragmentet, míg a *trnVAL-rps12* kloroplaszt primer esetében 296 bp szakaszt szaporítottunk fel.

#### 4.5.4 lcyb színgén szekvencia elemzése

A sejtmagi *lcyb* színgén szekvencia elemzése során az *lcyb* gén (2146 bp) két szakaszának (314-591 bp; 1134-1233 bp) PCR felszaporítását és szekvencia elemzését végeztük el. Az *lcyb* gén esetében egy 277 és egy 99 bp hosszúságú fragmentet szaporítottunk fel.

### 4.6 Szekvencaanalízis és fajtarekonstrukció klaszter analízis alapján

#### 4.6.1 Sejtmagi DNS analízis

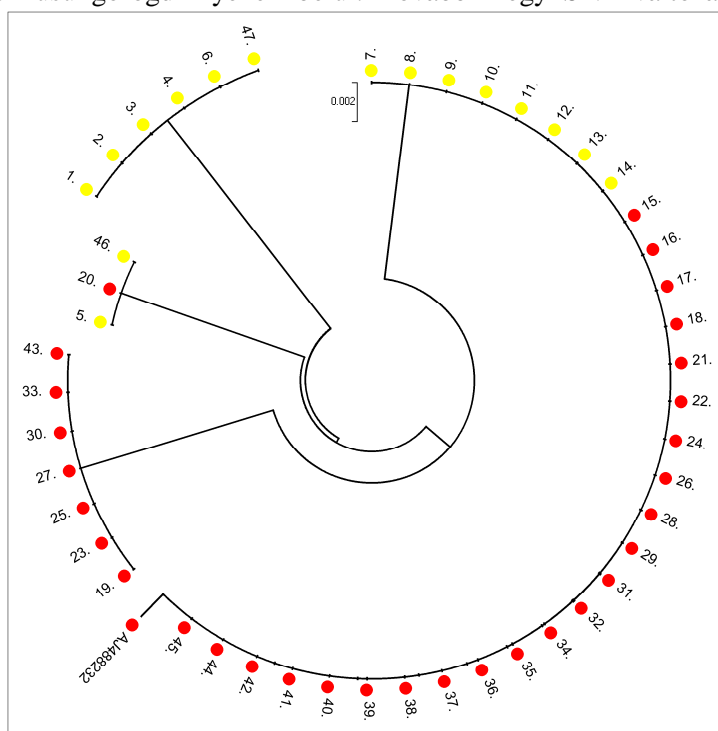
##### 4.6.1.1 ITS szekvenciák

ITS elemzés az ITS1-5.8S-ITS2 rDNS lókuszon. Az evolúciósan konzervatív ITS szekvenciák elemzése alapján kirajzolódott a legősibb *Citrullus* fajta a cv. Túrkeve (#20), amely annak ellenére, hogy piros húsú fajta, a sártók (#1-3) és a takarmánydinnye (#4-6) fajtákkal valamint a 19. századi (#47) mintával mutatott közeli genetikai rokonságot az #1-6 mintákra jellemző (C)<sub>8</sub> deléziós-allél hordozásával (385 bp - 392 bp), amely lókuszon a Túrkeve (#20), és a 15. századi (#46) *Citrullus*

heterozigóta:  $(C)_8 / (C)_3$ . Az #5 sártök minta szintén heterozigóta ezen a lókuszon, amely egy édes húsú sártökfajtát feltételez, további szelekcióra (afrikai úti leírások és magyar termesztők tapasztalata szerint is). A #7-18, 21-22, 24, 26, 28, 29, 31, 32, 34-45 görögdiényekben  $(C)_3$  deléció van a  $(C)_8$  deléciós lókuszon. A sártökökre és takarmánydiényekre és a #47 (19. századi) mintára egy további (ATT) deléció (45-47 bp) jellemző, amely lókuszon az #5, a #20 mai, és #46-os (15. századi) régészeti *Citrullus* minták heterozigóták. Egy további  $(C)_8$  deléciót (385 bp-392 bp) mutattunk ki az #1-6 fajtákban sártök, takarmánydiénye és a 19. századi (#47) mintában, amellyel molekulárisan igazoltuk a 19. századi magminta fajtabesorolását (takarmánydiénye: *Citrullus lanatus citroides*).

Ezt az eredményt a mag morfológiai vizsgálatok is előre jelezték. Ezen az ITS lókuszon az #5 sártök, a #20 görögdiénye (cv. Túrkeve), valamint a 15. századi archeo minta (#46) heterozigóta allél megoszlást mutatott, amely eredmény jelzi, hogy a 15. századi (#46) régészeti diénye a domesztikációban ősbibb fajta lehetett, mint a kétszáz évvel korábbi 13. századi (#45) diénye. A #19, 23, 25, 30, 33 és 43 fajtákban nem  $(C)_8$ , hanem csak  $(C)_1$  deléciót azonosítottunk, amely eredmény kijelölte ezt a rokonsági kört a vörös húsú görögdiényeken belül. További négy SNP változást mutattunk ki: egy T-inszercióval (393. bp) és három szubsztitúcióval ( $C \rightarrow T$  a 407. nt-on; és két  $T \rightarrow C$  az 545. és az 575. nt-on). Ezek az SNP-szubsztitúciók az #1-6 mintákban, valamint az ezeken az SNP pontokon is heterozigóta mintákban (#20, cv. Túrkeve; és a 15. századi #46) archeo minta; ld. az #5 sártök minta is heterozigóta) van jelen. Végül a három régészeti és 44 mai *Citrullus* szekvenciájának felhasználásával elkészítettük az ITS dendrogrammot (MEGA4) (2. ábra).

2.ábra: Molekuláris dendrogram elemzés a mai (1-44)-, valamint a régészeti *Citrullus* mintákban az ITS1-5.8S-ITS2 lókuszon (MEGA4) az AJ488232 görögdiénye (*Citrullus lanatus lanatus*) génbanki adat összehasonlításával.



#### 4.6.1.2 SSR elemzés

A  $(CT)_{26-30}$  nSSR (C11-20) lókuszon (183 bp) végzett teljes szekvencia elemzés (3. ábra), illesztés és BLAST analízis során egy  $(CT)_4$  inverziót (133-140 bp) azonosítottunk minden *Citrullus* mintában. Továbbá, egy  $(CT)_3$  - deléciót (126-131 nt) mutattunk ki csak a *Citrullus lanatus lanatus* görögdiénye mintákban, számos heterozigóta fajtával. Ez az eredmény, azért jelentős, mert igazolja, hogy hogyan alakul ki egy egyszerű  $(CT)_{26-30}$  SSR-ből egy összetett, fragmentálódott SSR:  $(CT)_{26-30} \rightarrow (CT)_{18}-C-(TC)_4-T-(CT)_5$ , amely várhatóan tovább fragmentálódik majd az elkövetkező évszázadokban. Az nSSR dendrogram elemzések a 15. és a 19. századi *Citrullus* a mai sárga húsú *Citrullus*-ok közé, míg a 13. századi *Citrullus* a mai vörös húsú görögdiényekhez sorolta.

Az eredmények a megerősítésére, a hússzín fajtarekonstrukció igazolásához az *lcyb* gént elemeztük, ugyanis az *lcyb* gén két allélje szelektív markere a sárga és vörös diényhús megjelenésének (Bang *et al.*, 2007).



## 4.6.1.3 A kloroplasztisz-DNS (cpDNS) elemzése

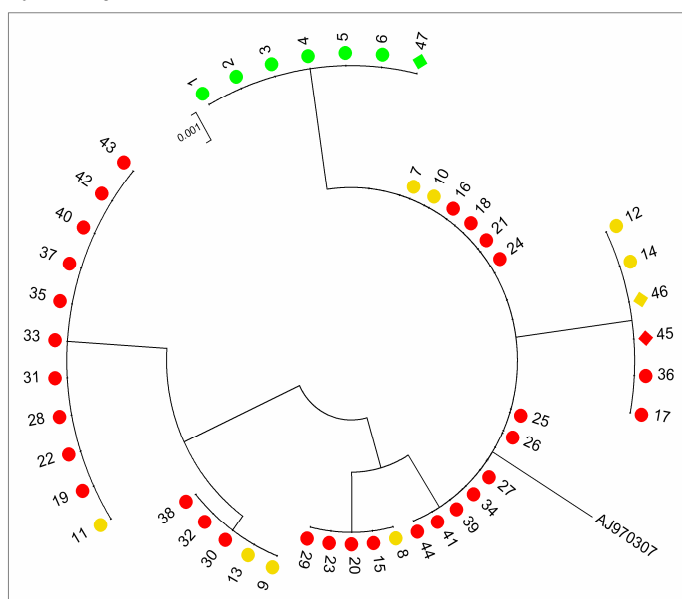
A kloroplasztisz (cpDNS) két lókuszon elemeztük: a *ycf9-orf62* (a PSII PsbZ protein központi alegységét kódoló génje) és *trnVAL-rps12* (a valin tRNS-t és a 12S riboszómális proteint kódoló gének) szakaszain. A kloroplasztisz DNS (cpDNA) vizsgálatával további citotípus azonosítást végeztünk. Az *ycf9-orf62* (640 bp) lókuszt 320. nt-ján azonosított transzverzió (T=A → A=T) megerősített (Dane *et al.*, 2007) egy fajspecifikus, citoplazma-marker alkalmazhatóságát a genotípus azonosításában.

A vizsgált takarmánydinnyékben (*Citrullus lanatus citroides*) és a görögdinnyékben (*Citrullus lanatus lanatus*). kimutatott 132 bp hosszú szakasz deléciója (389-520 bp) (Dane *et al.*, 2007) elkülönítette a sártököt (*Citrullus colocynthis*) a takarmánydinnyétől (*Citrullus lanatus citroides*) és a görögdinnyétől (*Citrullus lanatus lanatus*). Ezen felül egy inszerció pontot (ATAGC) is azonosítottunk (576-581 bp), amely a takarmánydinnyékben (*Citrullus lanatus citroides*) és a görögdinnyékben (*Citrullus lanatus lanatus*) megtalálható, de a vizsgált sártök (*Citrullus colocynthis*) mintákban nem. A deléció és inszerció segítségével a sártök (*Citrullus colocynthis*) maximálisan elkülöníthető a takarmánydinnye (*Citrullus lanatus citroides*) és a görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*) fajtától, a minták hússzínétől függetlenül.

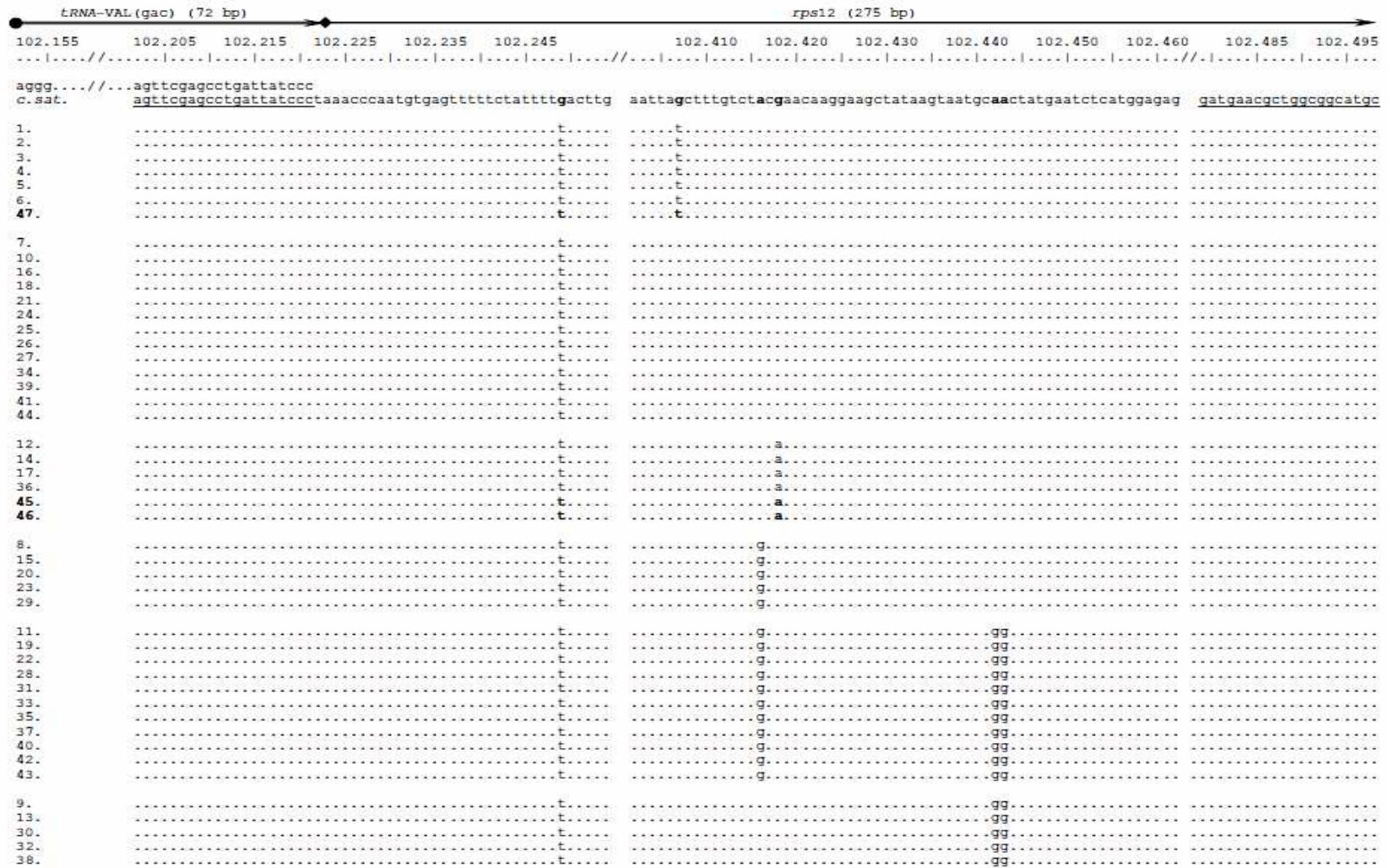
Az *ycf9-orf62* lókuszt szekvenciáinak felhasználásával elkészítettük a 44 mai és három régészeti *Citrullus* minta cluster analízisét, amellyel jól elkülöníthetők az egyes *Citrullus* fajcsoportok egymástól. A cpDNS elemzés a *tRNA-Val - rps12* lókuszon (5. ábra): A cpDNS *tRNA-Val - rps12* lókusztán (296 bp) (Jarret *et al.*, 1997) minden *Citrullus* minta egy G→T szubsztitúciót mutatott a 102.249. nt-on összehasonlítva az adatbankban elérhető legközelebbi rokon fajjal az uborkával (*Cucumis sativus*, AJ970307). A sártök (*Citrullus colocynthis*, #1-3) és a takarmánydinnye fajták (*Citrullus lanatus citroides* # 4-6), valamint a 19. századi (#47) cpDNS mintái egy további G→T szubsztitúciót mutattak a 102.407. nt-on, ahol minden görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*), az uborkához hasonlóan G-t tartalmazott. Ezzel az eredménnyel egy cpDNS-alapú markert azonosítottunk, amely elkülöníti a sártök (*Citrullus colocynthis*) és a takarmánydinnyét (*Citrullus lanatus citroides*) a görögdinnyétől (*Citrullus lanatus lanatus*). A 13. és 15. század minták egy kisebb mai csoporttal (cv. #12, Belyj Dlinnij 152; #14, Csárdaszállás 113; #17, Klondike R7 096; és #36, Kecskeméti vöröshúsú 259) mutattak citotípus rokonságot a 102.418. nt-on mutatott (G→A) szubsztitúció eredményeként.

Az az eredmény, hogy az ITS szekvenciák alapján feltételezett legősibb, ma is természetű görögdinnye fajta (#20, cv. Túrkeve) nem került ebbe a csoportba, feltételezi, hogy a görögdinnye nem obligát anyai öröklődést mutat (a megporzó pollennel is átjuthat a kloroplasztisz), amely hibrid citoplazma (cibrid) folyamatos kialakulását eredményezi. További A→G szubsztitúciót (102.416. nt) a #8, #15, #20, #23, #29 fajtákban, valamint egy háromszoros A→G szubsztitúciót (102.416. nt, 102.442. nt és 102.443. nt) azonosítottunk nyolc fajtában (#11, #19, #22, #28, #31, #33, #35, #43), valamint egy kétszeres A→G szubsztitúciót (102.442. nt és a 102.443. nt) három fajtában (#9, #13, #32, #38). Ezzel az eredménnyel újabb *Citrullus* citotípus csoportokat különítettünk el a diverz citoplazmájú görögdinnyéken belül. A *tRNA-Val - rps12* szekvenciák felhasználásával elkészítettük a három régészeti és 44 mai *Citrullus* fajta molekuláris dendrogramját. (4. ábra).

4. ábra: Molekuláris dendrogram elemzése a mai (1-44), valamint a régészeti *Citrullus* mintákban (45-47) a *trnVAL-rps12* cpDNA lókuszon végzett szekvencia elemzése alapján (MEGA4), az uborka AJ970307 (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával.



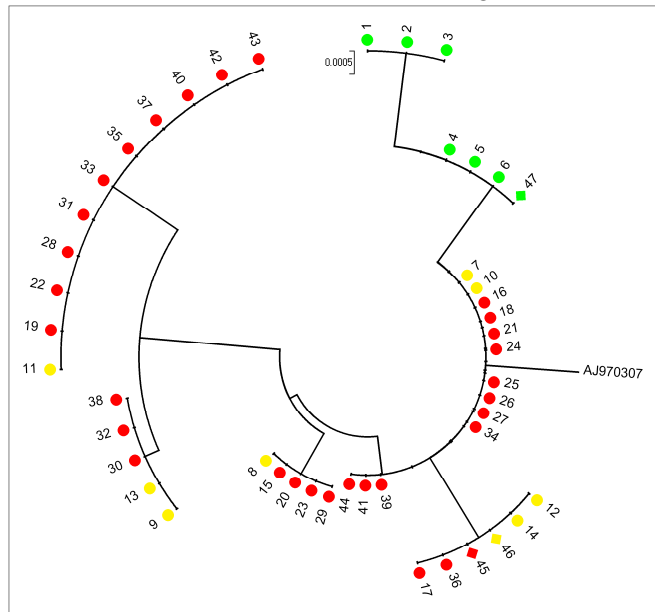




5. ábra: A régészeti és a 44 mai *Citrullus* minta elemzése a cpDNS a *tRNA-Val* - *rps12* lokuszon összehasonlítva az adatbanki szekvenciával, kiemelve a szubsztitúciós pontokat (102.407, 102.416, 102.418, 102.442, 102.443 nt).



A két cpDNS lókuszt felhasználásával megrajzoltuk az egyesített kloroplasztisz molekuláris dendrogramot (6. ábra), ami további finomelemzést tett lehetővé az eddig elkészített két cpDNS molekuláris dendrogramon túl. Ugyanis jól látható, hogy a két kloroplasztis együttes használatával az egyes *Citrullus* taxonok teljesen elkülöníthetők, és a régészeti minták beazonosíthatók: sártökök (*Citrullus colocynthis*) (#1-3), takarmánydinnyék (*C. l. citroides*, # 4-6, és a Pannonhami maglelet), valamint részletes citoplazma típusokra különböztethetők a görögdinnye minták (#-44, és 13.sz. és 15.sz. lelet) (6. ábra).



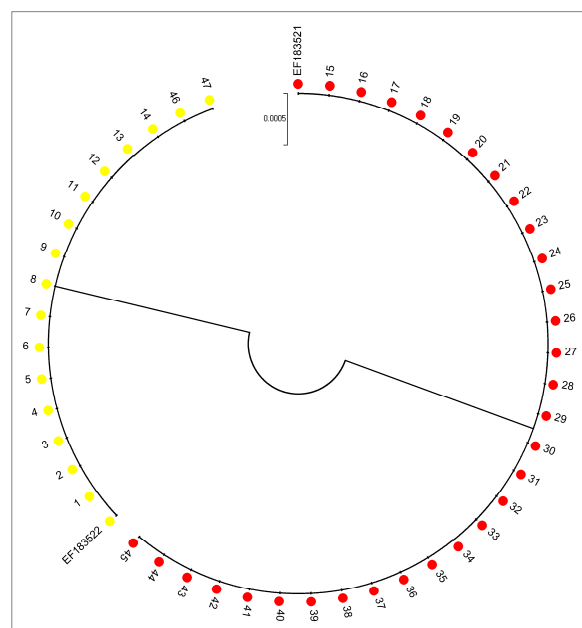
6. ábra: Molekuláris dendrogram elemzése a mai (1-44), valamint a régészeti *Citrullus* mintákban (45-47) az *yef9-orf62*, *trnVAL-rps12* cpDNS lókuszon végzett szekvencia elemzése alapján (MEGA4) az uborka AJ970307 (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával.

#### 4.6.1.4 A *lcyb* színgén elemzése

A *lcyb* gén (2146 bp) két szakaszának (314-591 bp; 1134-1233 bp) PCR felszaporítása és szekvencia elemzése során két hússzín-kapcsolt nukleotid szubsztitúciót (SNP) azonosítottunk a (Bang *et al.*, 2007) próbák alkalmazásával. A domináns *LCYB* gén a sárga hússzínhez mutatott kapcsoltságot, míg a recesszív *lcyb* allél a vörös színhez (Bang *et al.*, 2007). A két allél szekvenciája mindössze két SNP lókuszon tért el az 518. és az 1182. nukleotidban. A 19. (#47) és a 15. (#46) századi, valamint a mai sártök (# 1-3), takarmánydinnye (# 4-6) és a sárga húsú görögdinnye (# 7-14) minták mindegyike a homozigóta, domináns *CY*-típusú (kanári sárga - canary yellow) *LCYB* allélt hordozta mindkét SNP lókuszon (G=C bp az 518. nt-on és T=A bp a 1182. nt-on), amelyek a sárga/fehér hús-színhez kapcsoltsak. Viszont a 13. (# 45) századi minta együtt a mai vöröshúsú *Citrullus* fajtákkal (#15 - 44) a vörös színhez kapcsolts recesszív *lcyb* allélt hordozta (T=A bp az 518. nt-on, és G=C bp az 1182. nt-on).

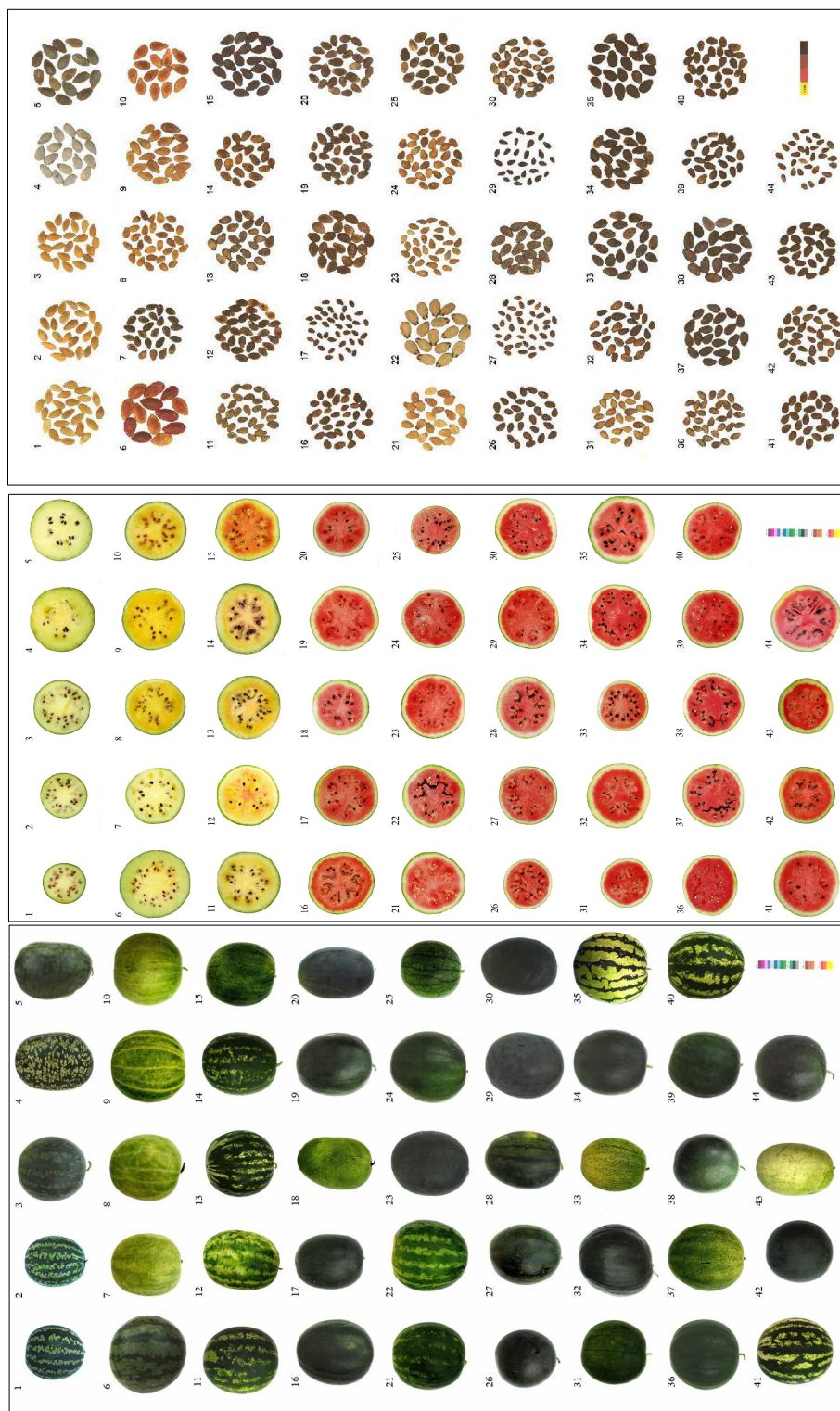
Egyik sártök és takarmánydinnye (mint evolúciósan ősbibb taxonok) sem hordozták a vörös színgén markert, amely jelzi, hogy a recesszív vörös színgén csak később jelent meg a domesztikáció/evolúció során. Ezt az eredményt egy korábbi vizsgálat igazolta, kimutatva a vörös hússzín és a cukortartalom kódoló géneinek kapcsoltságát (Hashizume *et al.*, 2003) és ezzel egyben a 'kapcsolt szelekciós' preferenciájukat (u.i. egy vörös húsú dinnye mindig édesebb volt, míg a fehér/sárga húsú görögdinnyék között előfordulhatott keserű fajta is, pl. *Citrullus lanatus citroides*). Az *lcyb* szekvencia felhasználásával elkészítettük a 44 mai és 3 régészeti *Citrullus* molekuláris dendrogramját (7. ábra) (Mega4).

7. ábra: Molekuláris dendrogram elemzése a mai (1-44), valamint a régészeti *Citrullus* mintákban (45-47), az *lcyb* gén lókuszon végzett szekvencia elemzése alapján (MEGA4), a *Citrullus lanatus lanatus* vörös EF183522 és sárga EF183521 allélek génbanki adatainak összehasonlításával.



## 4.6.2 Fajtarekonstrukció

A morfológiai, ITS, SNP, SSR, cpDNS, *lcyb* színgén allélgyakoriság adatai alapján elvégzett cluster analízisben megállapítható a régészeti *Citrullus* magvak legközelebbi genetikai rokonsága a mai fajtákkal (8. ábra), amely szerint a régészeti minták citotípusa, mint az egyik legősibb *Citrullus* citotípus máig fennmaradt a mai fajtákban. Az elemzések alapján rekonstruálható volt a 13. századi (pirosbélű) a 15. századi (sárgabélű, hasonló a mai #20, cv. Túrkeve fajtához), valamint a 19. századi (sárgabélű) takarmánydinnye feno- és genotípusa.



8. ábra: Az összehasonlító elemzésekhez alkalmazott mai sártök (1-3, *Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6, *Citrullus lanatus* *citroides*) és görögdinnye (7-44, *Citrullus lanatus*) fajták és tájfajták héj, hús és magtípusai (színes méret 1cm) (Tóth *et al.*, 2007b).

## 4.7 Új tudományos eredmények

1. Kivontuk a 800-, 600- és 170 éves *Citrullus* magvak ősdNS állományát (6 - 10 ng DNS/ 1 g mag), és meghatároztuk a degradáció mértékét 44 mai fajttal történő összehasonlításban. A mai fajták DNS mennyisége átlag 200 - 800 ng DNS/ 1 g mag volt.
2. A sejtmagi rDNS ITS (ITS1-5.8S-ITS2) szekvencia elemzése alapján azonosítottuk a legősibb mai görögdinnye fajtát (cv. Túrkeve, #20). A ITS szekvenciák elemzésével elkülönítettük és a további vizsgálatokból kizártuk az exogén/endogén fertőzött régészeti magokat.
3. Igazoltuk a teljes genom amplifikáció (WGA) alkalmazhatóságát az ősdNS minták nagy mennyiségű és szekvenciahű felszaporíthatóságára. A WGA amplifikáció során a fragmentumokban egyetlen hibás amplifikációt sem azonosítottunk.
4. A sejtmagi nSSR lókuszek elemzésével a mai *Citrullus* fajtákban (1-44) és a régészeti leletekben fajtarekonstrukciót végeztünk molekuláris dendrogram elemzésével. A molekuláris dendrogram elemzését morfológiai dendrogram (24 fenotípusos bélyeg) elemzésével vetettük össze. A sejtmagi DNS 12 SSR-lókuszn, 23 allélt és 701 SSR fragmentumát határoztunk meg, mely alapján előzetes fajtarekonstrukciót végeztünk a régészeti leletek fenotípusának meghatározásában.
5. A hússzín-rekonstrukció meghatározására a sejtmagi *lcyb* (*likopin*  $\beta$ -cikláz) szekvencia elemzését végeztük el, amely alapján DNS szekvencia szerint mutattuk ki a régészeti leletek (és mai dinnye fajták) hús szín típusait.
6. Mindhárom régészeti leletben kloroplasztisz DNS (cpDNS) szekvenciákat mutattunk ki, a régészeti leletekben és a mai fajtákban hat (*trnVAL-rps12*), illetve további kettő (*Ycf9*) haplotípust azonosításával.
7. A DNS minták szekvencia elemzése során 12 SSR lókuszt (összesen 9212 nt), egy színgén (100862 nt), egy ITS lókuszt (összesen 28670 bp hosszú) és két cpDNS (összesen 43992 nt) lókuszt szekvenciáját határoztunk meg.
8. A vizsgálatok alapján fajtarekonstrukciót végeztünk, amely szerint a 13. századi lelet piros húsú görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*), a 15. századi görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*) és a 19. századi takarmánydinnye sárgahúsú (*Citrullus lanatus citroides*) fajta típusba tartozott.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A régészeti *Citrullus* magvak maradványaiból izolált archeo örökítőanyag vizsgálataihoz elkészítettük 44 mai *Citrullus* mikroszatellita kontroll ujjlenyomat mintázatát. A régészeti növénymagvak jó állapotban maradtak fenn, köszönhetően a feltárt kutakban lévő nedves, iszapos, anaerob körülményeknek. A fertőzésmentes magból egy-mag módszerrel izolált ösDNS-t 0,8%-os agaróz gélen kimutattuk és meghatároztuk a DNS degradáció mértékét a mai fajták összehasonlításában.

Az ITS1-5.8S-ITS2 régióban az rDNS mutációs pontokon kimutatható SNP (single nucleotide polymorphism) analízissel. Az adatbankban közölt szekvenciák mellett új mutációs (SNP) pontokat azonosítottunk: négy SNP változást mutattunk ki. Egy T-inszerciót (393. bp) és három szubsztitúciót (C→T a 407. nt-on; és két T→C a 545. és a 575. nt-on). Ezek az SNP-szubsztitúciók az #1-6 mintákban, valamint az ezeken az SNP-en is heterozigóta mintákban (#20, cv. Túrkeve; és a 15. századi #46). A #7-18, 21-22, 24, 26, 28, 29, 31, 32, 34-45 görögdinnyékben (C)<sub>3</sub> deléciót határoztunk meg a (C)<sub>8</sub> deléciós lókuszon. A sártökökre és takarmánydinnyékre és a régészeti #47 (19. századi) mintára egy további (ATT) deléció (45-47 bp) jellemző, amely lókuszon az #5, #20 mai és #46-os (15. századi) régészeti *Citrullus* minták heterozigóta genotípust mutattak. Egy további (C)<sub>8</sub> deléciót (385 bp-392 bp) mutattunk ki a #1-6 fajtákban (sártök és takarmánydinnyék), valamint a 19. századi (#47) mintában, amellyel molekulárisan igazoltuk a 19. századi magminta fajtabesorolását (takarmánydinnye: *Citrullus lanatus citroides*). Ezen az ITS lókuszon az #5 sártök, a #20 görögdinnye (cv. Túrkeve), valamint a 15. századi archeo-minta (#46) heterozigóta allél megoszlást mutatott. A #19, 23, 25, 30, 33 és 43 fajtákban nem (C)<sub>8</sub>, hanem csak (C)<sub>1</sub> deléciót azonosítottunk. Az evolúciósan konzervatív ITS szekvenciák elemzése alapján kirajzolódott a legősibb görögdinnye fajta a cv. Túrkeve (#20), amely annak ellenére, hogy piros húsú fajta, a sártök (#1-3) és a takarmánydinnye (#4-6) fajtákkal valamint a 19. századi (#47) mintával mutatott közeli genetikai rokonságot az #1-6 mintákra jellemző (C)<sub>8</sub> deléciós-allél hordozásával (385 bp - 392 bp).

A mikroszatellita analízisben 16 SSR lókuszt közül a régészeti mintákban 12 SSR primerpár adott megismételhető, és a fajra jellemző mérettartományban alléleket, melyekben 23 lókuszon összesen 701 SSR fragmentumot azonosítottunk. Átlagosan 2,1 allélszámot azonosítottunk, a következő megoszlásban: bng1161 (2 allél), bng118-2 (5 allél), phi118-2 (2 allél), bng1339 (2 allél), phi121 (2 allél), cmacc146 (2 allél), cmct51 (2 allél), cl 1-06 (3 allél), cl 1-20 (2 allél), cl 2-23 (2 allél), cmct168 (1 allél) és cl 2-140 (1 allél). Az allélek között 6-20 nukleotid közötti különbséget állapítottunk meg. Az SSR allélek visszaizolálása után meghatároztuk a fragmentumok pontos bázissorrendjét. A kapott alléleket bináris kódolása után SPSS 16 statisztikai programmal értékeltük Jaccard index alapján. A 13. századi debreceni minta a #36 (kecskeméti vöröshúsú) és #17 (Klondike) mai mintákkal; a 15. századi budai minta a #12 (Belyj Dlinnij) és #14 (Csárdaszállás); míg a 19. századi pannonhalmi mint a #4 (Szeged), #5 (Román 235) és #6 (Újszilvás) mai mintákkal mutatta a legközelebbi rokonságot.

A kloroplasztisz DNS (cpDNS) vizsgálatával további citotípus azonosítást végeztünk. A *ycf9-orf62* lókuszt megerősített egy fajspecifikus, citoplazma-marker alkalmazhatóságát a genotípus azonosításában, továbbá a *tRNA-Val - rps12* lókuszon végzett vizsgálatokkal egy cpDNS-alapú markert azonosítottunk, amely elkülönítette a sártök (*Citrullus colocynthis*) és a takarmánydinnyét (*Citrullus lanatus citroides*) a görögdinnyéktől (*Citrullus lanatus lanatus*).

A sejtmagi *lcyb* színgén szekvencia elemzése során két hússzín-kapcsolt nukleotid szubsztitúciót (SNP) azonosítottunk. A domináns *LCYB* gén a sárga hússzínhez mutatott kapcsoltságot, míg a recesszív *lcyb* allél a vörös színhez. A két allél szekvenciája mindössze két SNP lókuszon tért el egy-egy nukleotidban. A 13. századi (# 45) minta együtt a mai vöröshúsú *Citrullus* fajtákkal (#15 - 44) a vörös színhez kapcsolts recesszív *lcyb* allélt hordozta, míg a 15. (#46) és a 19. (#47) századi régészeti minta a homozigóta, domináns *CY*-típusú (kanári sárga - canary yellow) *LCYB* allélt hordozta mindkét SNP lókuszon.

Összefoglalva, megállapítható, hogy a régészeti minták citotípusa, mint az egyik legősibb görögdinnye citotípus máig fennmaradt a mai fajtákban. Az elemzések alapján rekonstruálható volt a 13. századi (pirosbélű) a 15. századi (sárgabélű, hasonló a mai #20, cv. Túrkeve fajtához), valamint a 19. századi takarmánydinnye feno- és genotípusa.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Több mint 800 éves *Citrullus* növénymaradványok regenerálási, és összehasonlító molekuláris vizsgálatával archeogenetikai kutatásokat végeztünk. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a régészeti magvak hamar elvesztik csírázókéességüket. *In vitro* körülmények között sterilizált magvak közül jól szelektálhatók az exogén fertőzöttségű magvak.

Az alkalmazott DNS izolálási módszerrel megfelelő minőségű és mennyiségű ősdNS izolálható a régészeti magokból. A különböző molekuláris módszerekkel kiszűrhető az endogén eredetű vagy egyéb DNS kereszt-szennyeződések, és kimutatható a DNS fragmentumok amplifikálhatósága, illetve degradáltsága. A kapott eredményeink alátámasztják az SSR, cpDNS és ITS módszer alkalmasságát a *Citrullus* fajták közti szekvencia heterogenitás kimutatására, és a mai kontroll fajták, valamint a régészeti minták rokonsági kapcsolatára. Az archeo DNS-sel végzett összehasonlító molekuláris vizsgálatok nélkülözhetetlen adatokat nyújthatnak az emberi ételmezésben már több mint 6000 éve fontos szerepet játszó növényfajok mikroevolúciós, és domesztikációs kérdéseinek tisztázásához. A régészeti mintákban megőrzött gének DNS szekvenciáinak klónozásával és mai fajtákba történő génátvitellel az archeogenetika a görögdinnye molekuláris nemesítéséhez adhat új lehetőségeket az évszázadok alatt kiszelektálódott tulajdonságok rekonstrukciójához.

## SUMMARY

Watermelon seeds excavated at both medieval sites analyzed in the study presented appeared to be extremely well preserved due to anaerobic conditions at site Debrecen (13th cent.), and in the slime of a deep well in Budapest (15th cent.) covered by water, apparently used as dust holes in the Middle Ages (Gyulai *et al.*, 2006). The herbarium sample seeds from the 19th cent. were stored under precise conditions in glass containers (Vörös, 1971).

Molecular dendrogram of the study presented based on 701 SSR fragments in total identified at eleven nuclear microsatellite (nSSR) loci revealed that middle age samples show close lineages to ancient varieties currently growing in Hungary with red flesh colour. Allelic diversity of microsatellites were reliably detected in aDNAs of 300 – 1,100-year old seagrass (*Posidonia oceanica*) (Raniello and Procaccini 2002). SSRs were used to morphologically reconstruct 600-year old melon (*Cucumis melo*) (Szabó *et al.*, 2005a) and millet (*Panicum miliaceum*) (Lágler *et al.*, 2005; Lágler, Gyulai *et al.*, 2006). SSR analysis was also applied to herbarium samples of common reed (*Phragmites australis*) of about 100-year-old to track plant invasion in North America (Saltonstall, 2003). Results of seed morphology correlated strongly to molecular results. The 13th -14th cent. sample (Debrecen) showed similarity to cv. 'Kecskeméti vöröshéjú'; the 15th cent. sample (Budapest) showed similarity to cv. 'Belyj dlinnij' (# 12). These results also reflect the preferential cultivation of red flesh – and not yellow flesh- watermelon in the Middle Age of Hungary. Red flesh watermelon also appeared in the painting of Still Life with Melons and Carafe of White Wine (1603 b.c.) painted by Caravaggio (Janick, 2004; Janick *et al.*, 2007). Molecular data obtained might provide further tools for watermelon breeders. The 170-year-old herbarium sample (Pannonhalma, Hungary) showed close molecular similarity to citron melon (*Citrullus lanatus citroides*) cv. 'Újszilvás' which reflects the importance of citron melon as fodder in the Middle-Age Hungary.

Watermelons are divided into several morphological types; based on fruit weight as personal size with to 2.7 kg / 6 lbs, icebox type to 6.8 kg/15 lbs, and picnic type above 6.8 kg/15 lbs. Fruit shapes are round to cylindrical. Unexpectedly, the most ancient, 5000 year old record in Pharaohs tomb (3.100 – 2.100 b.c., Old Kingdom,) shows not round but elongated fruit with green strips (Manniche, 1989; Janick *et al.*, 2007). Fruit rind (exocarp) varies from thin to thick and brittle to tough with colors from pale green to dark green, with or without whitish strips, or small whitish spots. The most ancient European color wall paintings (1517) show watermelons with pale green rind (Janick *et al.*, 2007) which indicate an ancient rind type, as a QTL locus (gs) responsible for dark-green rind was found to be dominant over the light-green rind (Hashizume *et al.*, 2003).

Flesh color of watermelons varies from white; to yellow - canary yellow - salmon yellow - orange mainly due to pigment compositions of xanthophylls. The pink - red - purple colors mainly due to pigments of lycopenes. Genes coding for white flesh color (w) were QTL-mapped (quantitative trait loci) on chromosome (syn.: linkage group) 6 (Hashizume *et al.*, 1996). Genes responsible for yellow and red color were mapped on chromosome 2. These gene loci indicate the transition colors between yellow and red (canary yellow, pale yellow) (Hashizume *et al.*, 2003). QTL responsible for red flesh color had another locus on chromosome 8. This locus showed genetic linkage with QTL for high sugar content (Hashizume *et al.*, 2003). This result strongly indicate the reason of over numbered red flesh watermelons compared to cultivars with white and yellow flesh colors, as selection for sweeter watermelons during domestication has been coupled with selection for red flesh color at the same time (Hashizume *et al.*, 2003). Some further genetic loci for color determination were recently determined by breeding tools (crossings), namely Y (red, dominant), yo (orange, recessive), y (salmon yellow, recessive), C (canary yellow, dominant) and c (red, recessive), respectively (reviewed in Bang *et al.*, 2007).

The enzyme *LCYB* (*lycopene β-cyclase*) encoded by *lcyb* gene play a central role in plant color development by converting lycopene to carotenoids with ring structure. SNP (single nucleotide polymorphism) markers in *lcyb* gene (NCBI EF183521) were which discriminated yellow and red flesh watermelons (Bang *et al.*, 2007). The 19th cent. and 15th cent. samples along with modern colocynts, citrons, and modern (# 7-15) yellow flesh watermelons (*Citrullus lanatus lanatus*) showed CY-type SNPs at both loci 518th (G=C) and 1182th (T=A) of *lcyb* gene. The 13th cent. sample and all red flesh modern watermelons (# 16 - 44) showed the red-type SNPs at both loci 518th (T=A) and 1182th (G=C) of *lcyb* gene. No colocynts and citrons were found with red flesh color.

## 7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

**Angol nyelvű tudományos folyóiratcikkek****Nemzetközi kiadás (5)**

1. Gyulai G, Z Szabó, B Wichmann, A Bittsánszky, LWaters Jr, **Z Tóth**, F Dane (2012) Conservation genetics - Heat Map analysis of nuSSRs of aDNA of archaeological watermelons (Cucurbitaceae, *Citrullus l. lanatus*) compared to current varieties. *Genes, Genomes and Genomics* 6 (SI1): 86-96.
2. Başlı Ag, G Gyulai, **Z Tóth**, A Güner, Z Szabó, VI Stakhov, L Murenietz, Sg Yashina, L Heszky, Sv Gubin (2009) Light and Scanning Electron Microscopic Analysis of *Silene stenophylla* Seeds Excavated from Pleistocene-Age (Kolyma). *Anadolu Univ J Sci and Technol* 10:161-167.
3. Güner A, G Gyulai, **Z Tóth**, Ga Başlı, Z Szabó, F Gyulai, L Heszky (2009) Grape (*Vitis vinifera*) seeds from Antiquity and the Middle Ages Excavated in Hungary - LM and SEM analysis. *Anadolu Univ J Sci Technol* 10:205-213.
4. Gyulai G, M Humphreys, R Lágler, Z Szabó, **Z Tóth**, A Bittsánszky, F Gyulai, L Heszky (2006) Seed remains of common millet from the 4<sup>th</sup> (Mongolia) and 15<sup>th</sup> (Hungary) centuries; AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries. *Seed Science Research* 16:179-191. (**IF: 1,892**)
5. Bittsánszky A, G Gyulai, M Humphreys, G Gullner, Zs Csintalan, J Kiss, Z Szabó, R Lágler, **Z Tóth**, H Renneberg, L Heszky and T Kőmíves (2006) RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic *gshI*-poplar clones (*Populus x canescens*) in response to paraquat exposure. *Z Naturforschung* 61c:699-730. (**IF: 0,756**)

**Hazai kiadás (3)**

6. Gyulai G, **Z Tóth**, Z Szabó, F Gyulai, R Lágler, L Kocsis, L Heszky (2009) Domestication Events of Grape (*Vitis vinifera*) from Antiquity and the Middle Ages in Hungary. *Hung Agric Res* 2009/4.
7. **Tóth Z**, G Gyulai, L Horváth, Z Szabó, L Heszky (2007) Watermelon (*Citrullus l. lanatus*) production in Hungary from the Middle Ages. *Hung Agric Res* 2007/4: 14-19.
8. Lágler R, G Gyulai, Z Szabó, **Z Tóth**, A Bittsánszky, L Horváth, J Kiss, F Gyulai, L Heszky (2006) Molecular diversity of common millet (*P. miliaceum*) compared to archaeological samples excavated from the 4<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> centuries. *Hung Agric Res* 2006/1:14-19.

**Angol nyelvű tudományos könyvfejezet****Nemzetközi kiadás (2)**

9. Gyulai G, **Z Tóth**, A Bittsánszky (2011) Flesh color reconstruction from aDNAs of *Citrullus* seeds from the 13th, 15th, and 19th cents (Hungary). In: *Plant Archaeogenetics*. Ed. by G Gyulai. Chapter 7. pp. 69-87. Nova Sci Publisher Inc., New York, USA. ISBN 978-1-61122-644-7.
10. Gyulai G, **Z Tóth**, A Bittsánszky, Z Szabó, G Gullner, J Kiss, T Kőmíves and L Heszky (2008) Gene up-regulation by DNA demethylation in 35S-*gshI*-transgenic poplars (*Populus x canescens*). in: *Genetically Modified Plants: New Research Trends*. Eds. T Wolf and J Koch, *Nova Science Publisher, Inc. USA*, Chapter 8, pp. 173-191. ISBN 978-1-60456-696-3.

**Magyar nyelvű tudományos folyóiratcikkek (6)**

11. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Heszky L (2008) Sejtmagi mikroszatellita és cpDNS szekveniók diverzitása görögdinnyében (*C. lanatus*). *Agr Vidékfejl Szemle* 2008/3(1): 1-5.
12. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Horváth L, Gyulai G, Heszky L (2007) Mikroszatellita lókuszok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*) a középkor óta; (CT)<sub>3</sub> deléció a (CT)<sub>26</sub> nSSR-ban. *Agrártud Közl* 27: 125-134.
13. Szabó Z, Gyulai G, **Tóth Z**, Heszky L (2007) SNP elemzés az rDNA ITS-5.8S-ITS2 lókuszán a mai és a középkori sárgadinnyében (*Cucumis melo*). *Agrártud Közl* 27: 27: 120-124
14. Bittsánszky A, Gyulai G, **Tóth Z**, Horváth M, Fekete I, Szabó Z, Heltai Gy, Gullner G, Kőmíves T, Heszky L (2008) Molekuláris nyárfanemesítés (*Populus x canescens*) ököremediációs alkalmazásra. *Agr Vidékfejl Szemle* vol. 3. 2008/2:184-189.
15. Lágler R, Gyulai G, Szabó Z, **Tóth Z**, Heszky L (2007) A köles (*Panicum miliaceum*) SSR- és ISSR szekvenió-stabilitása a 4. és 15. századi régészeti leletektől a mai fajtáig. *Agrártud Közl* 27: 10-19.
16. Horváth L, Gyulai G, Szabó Z, Lágler R, **Tóth Z**, Heszky L (2007) Morfológiai diverzitás sárgadinnyében (*Cucumis melo*); egy középkori típus fajtarekonstrukciója. *Agrártud Közl* 27: 84-90.

**Referált tudományos konferenciakötetek****Angol nyelvű (4)**

17. **Tóth Z**, G Gyulai, Z Szabó, F Gyulai, L Heszky (2008a) New *Citrullus* haplotypes at the tRNA-Val – rps12 locus of cpDNA. *Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae* (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008, pp.335-310.
18. **Tóth Z**, G Gyulai, Z Szabó, A Bittsánszky, L Heszky (2008b) Genotype (nSSR) and haplotype (cpDNA) identification in watermelons (*Citrullus l. lanatus*). *Gen. Meet. EUCARPIA*, Valencia, Spain, pp. 253-257.



19. Szabó Z, Gyulai G, **Tóth Z**, Bittsánszky A, Heszky L (2008) Sequence diversity at the loci of nuclear SSRs and ITS1-5.8S-ITS2 of rDNA of 47 melon (*Cucumis melo*) cultivars and an extinct landrace excavated from the 15<sup>th</sup> century. General Meeting EUCARPIA, Valencia, Spain, pp. 244-249.
20. Szabó Z, Gyulai G, **Tóth Z**, Heszky L (2008) Morphological and molecular diversity of 47 melon (*Cucumis melo*) cultivars compared to an extinct landrace excavated from the 15<sup>th</sup> Century. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008, pp.313-321.

#### Magyar nyelvű (4)

21. **Tóth Z**, Gyulai G, Kenéz Á, Szabó Z, Bittsánszky A, Lágler R, Gyulai F, Horváth L, Heszky L (2009) Molekuláris domesztikáció a *Citrullus* nemzetségben az ITS (ITS1-5.8s-ITS2), NSSR, SNP (*lcyb*) és cpDNS (*ycf9-orf62*; *trnval-rps12*) lókuszokon. Hagyomány és haladás a növénynevelésben. XV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, ISBN: 978-963-508-575-0, pp. 507-511.
22. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Heszky L (2008c) Az nSSR és cpDNS lókuszok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*). 4. Erdei Ferenc Tud. Konf., Kecskemét, aug.27-28. (ed Ferenc Á.), II. kötet pp.866-870.
23. Kenéz Á, Gyulai G, **Tóth Z**, Szabó Zoltán, Lágler R, Heszky L, Gyulai F (2009) Római Kori (Keszthely-Fenekpuszta, (5. sz.) Növényleletek Azonosítása: I. Egyszikűek. Hagyomány és haladás a növénynevelésben. XV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, ISBN: 978-963-508-575-0, pp. 233-237.
24. Bittsánszky A, Gyulai G, Gullner G, **Tóth Z**, Kiss J, Szabó Z, Heszky L, Kőmíves T (2009) Paraquat-toleráns nyárfa *in vitro* szelekciója és molekuláris jellemzése. Hagyomány és haladás a növénynevelésben. XV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, ISBN: 978-963-508-575-0, pp. 31-35.

#### Tudományos konferencia absztraktok

##### Angol nyelvű (6)

22. **Tóth Z**, Gyulai G, A Başlı, R Lágler, A Güner, Z Szabó, A Kis, A Bittsánszky, L Heszky (2007) Morphological and molecular reconstruction of 15<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> cent. watermelons (*C. lanatus*). IWGP14, 14<sup>th</sup> Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
23. **Tóth Z**, Gyulai G, Horváth L, Gyulai F (2006) Molecular and morphological reconstruction of a medieval melon (*Cucumis melo*). 36<sup>th</sup> International Symposium on Archaeometry (ISA 2006), május 2 - 6, Quebec City, Canada.
24. Lágler R, Gyulai G, A Güner, **Tóth Z**, A Kis, Z Szabó, Ga Başlı, A Bittsánszky, L Heszky (2007) Morphological and molecular analysis of ancient common millet (*P. miliaceum*) seeds. IWGP14, 14<sup>th</sup> Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
25. Stakhov V, Gyulai G, Szabó Z, Kovács L, Murennyet L, Lágler R, **Tóth Z**, Yashina S, Bittsánszky A, Heszky L, Gubin S (2007) Pleistocene-Age *Silene stenophylla* seeds excavated in Russia – A Scanning Electron Microscopic Analysis. Botany and Plant biology Joint Congress, Chicago, Illinois, USA, July 7-11. ID: 2131
26. Szabó Z, Gyulai G, Ga Başlı, **Tóth Z**, A Güner, R. Lágler, L Kovács, A Kis, A Bittsánszky, L Kocsis, L Heszky, F Gyulai (2007) Analysis of Grape (*Vitis vinifera*) Seeds from Antiquity and the Middle Ages Excavated in Hungary. 14<sup>th</sup> Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
27. Szabó Z, Gyulai G, Kovács L, **Tóth Z**, Lágler R, Bittsánszky A, Kocsis L (2007) Ancient DNA analysis and morphology of grape seeds from antiquity and the middle ages excavated in Hungary. Botany and Plant biology Joint Congress, Chicago, Illinois, USA, July 7-11. ID: 2119

##### Magyar nyelvű (14)

28. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Gyulai F, Horváth L, Kiss J, Heszky L (2008) Haplotípusok azonosítása görögdinnyében (*Citrullus lanatus*). XIV<sup>th</sup> Növénynevelési Tudományos Napok, MTA Budapest, 2008. március 12. p. 14.
29. **Tóth Z**, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Güner A, Başlı G, Bittsánszky A, Kis A, Heszky L (2007) A régészeti genetika születése Magyarországon – (ct)3 delécio és (ct)4 inverzió a görögdinnyé (*C. lanatus*) (ct)26-30 nSSR lókuszán a középkor óta. VII. Magyar Genetikai Kongresszus – 14. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, Balatonfüred, április 15-17. P111, 178-179
30. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Mórocz S, Hajósné N M, Lágler R, Kálmán L, Kiss J, Bock I, Bittsánszky A, Koncz S, Bottka S, Heszky L (2006) SSR és cpSSR lókuszok Q-PCR és ALF-SSR elemzése kukorica (*Zea mays* L.) vonalakban és hibridekben. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, p. 175.
31. Horváth L, Gyulai G, Szabó Z, Lágler R, **Tóth Z**, Bittsánszky A, Lehoczky P, Gyulai F, Heszky L (2007) Morfológiai diverzitás a sárgadinnyében (*Cucumis melo*); egy középkori típus fajtarekonstrukciója. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, p.79. Budapest.
32. Kis A, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Gubin Sv, **Tóth Z**, Stakhov V, Bittsánszky A, Yashina Sg, Heszky L (2007) Pleisztocén kori (Jégkorszak) *Silene* magvak morfológiai és molekuláris elemzése. VII. Magyar Genetikai Kongresszus-14dik Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, április 15-17. P064, 134.
33. Kis A, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Gubin, **Tóth Z**, Stakhov V, Bittsánszky A, Yashina Sg, Heszky L (2007) Morfológiai és molekuláris elemzés jégkorszaki *Silene* magokban. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, p.78. Budapest.
34. Lágler R, Gyulai G, Szabó Z, Bittsánszky A, **Tóth Z**, Kiss J, Gyulai F, Horváth L, Bock I, Holly L, Heszky L (2006) mtDNS RFLP-PCR, SSR és ISSR elemzés középkori köles (*Panicum miliaceum* L.) magvak DNS mintáiban. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, p. 120.
35. Lágler R, Gyulai G, Szabó Z, **Tóth Z**, Lehoczky P, Bittsánszky A, Horváth L, Heszky L (2007) A köles (*Panicum miliaceum*) SSR- és ISSR szekvencia-stabilitás a kölesben (*Panicum miliaceum*) a középkortól napjainkig. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, p.80. Budapest.
36. Lágler R., Gyulai G., **Tóth Z**, Szabó Z., Kis A., Bittsánszky A., Heszky L. (2007). A régészeti genetika születése Magyarországon – a köles (*P. miliaceum*) SSR- s ISSR szekvencia-stabilitása a 4.- és 15. századtól napjainkig. VII. Magyar Genetikai Kongresszus-14dik Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, április 15-17. P067, 138-139
37. Lehoczky P, Gyulai G, Szabó Z, Lágler R, **Tóth Z**, Kis A, Bittsánszky A, Bock I, Heszky L (2007) SNP-elemzés mai és középkori sárgadinnyé (*C. melo*) rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókuszán. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred – 14dik Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, április 15-17. P109, 176-177
38. Lehoczky P, Gyulai G, **Tóth Z**, Lágler R, Szabó Z, Bittsánszky A, Bock I, Heszky L (2007) Az rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókusz SNP-elemzése mai és középkori sárgadinnyében (*Cucumis melo*). XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, p.81. Budapest.
39. Szabó Z, Gyulai G, Lágler R, **Tóth Z**, Bittsánszky A, Lehoczky P, Heszky L (2007) A sárgadinnyé (*Cucumis melo*) A sárgadinnyében (*Cucumis melo*) sejtmagi mikroszatellita lókuszainak evolúciója a középkor óta. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, p.66. Budapest.
40. Szabó Z, Gyulai G, Lágler R, **Tóth Z**, Kis A, Bittsánszky A, Heszky L (2007) A részégeti genetika születése Magyarországon – a (ct)25 nSSR lókusz evolúciója a sárgadinnyében (*C. melo*) a középkor óta. VII. Magyar Genetikai Kongresszus – 14dik Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, Balatonfüred, április 15-17. P110, 177-178.
41. Szabó Z, Gyulai G, **Tóth Z**, Lágler R, Kiss J, Bittsánszky A, Gyulai F, Horváth L, Bock I, Holly L, Heszky L (2006) Sejtmagi mikroszatellita allélok diverzitása és ALF-SSR elemzése sárgadinnyében (*Cucumis melo*): molekuláris mikroevolúció a középkor óta. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, p. 158.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Gyulai Gábor tanár Úr témavezetését és a disszertációban tárgyalt tudományos eredmények elérésében nyújtott szakmai irányítását. Köszönöm a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és tudományos értékelésben nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Gyulai Ferencnek a régészeti magleletek azonosításában nyújtott segítségéért.

Köszönöm Prof. Dr. Heszky Lászlónak, és Prof. Dr. Kiss Erzsébetnek, hogy lehetővé tette számomra a tanszéki kutatásokat és támogatását

Köszönöm a nyugodt, tudományos és inspiratív munkahelyi légkört és a mindig áldozatkész segítségét közvetlen munkatársaimnak: Dr. Bitsánszky Andrásnak, Dr. Szabó Zoltánnak, Lágler Richárdnak; valamint a SzIE MKK GBI minden dolgozójának.

Köszönöm családomnak a támogatást, megértést és bizalmat, valamint az általuk kialakított alkotó légkört, melyet munkám során mindvégig éreztem.