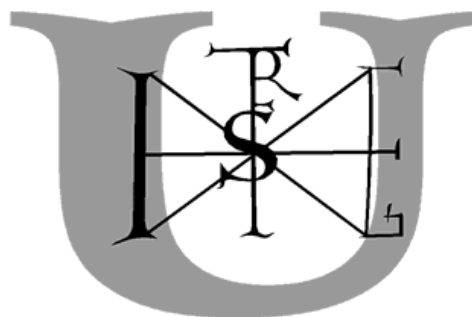


Szent István Egyetem
Gödöllő



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

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Tóth Zoltán

Gödöllő
2013

Doktori iskola Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

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

Tudományága: 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	7
2.1	A régészeti genetika (Muzeomika) és jelentősége	7
2.1.1	ősDNS leletek az állatvilágból	10
2.1.2	ősDNS leletek Humán vonatkozásai	18
2.1.3	ősDNS leletek a növényvilágból	23
2.1.4	Poszt-mortem DNS degradáció	30
2.1.5	Maillard-reakció következményei	36
2.1.6	ITS	38
2.1.7	SSR	39
2.1.8	cpDNS	41
2.1.9	Lcyb színgén	42
2.1.10	WGA.....	44
2.2	A görögdinnye genetikai jellemzése.....	45
2.2.1	A görögdinnye (<i>Citrullus lanatus</i>) rendszertani besorolása, fajtatípusai	45
2.2.2	A görögdinnye jellemzése.....	46
2.2.3	A görögdinnye (<i>Citrullus lanatus</i>) domesztikációja és mikroevolúciója.....	48
2.2.4	Régészeti és kultúrleletek.....	49
2.2.5	A görögdinnye hazai nemesítése.....	51
3.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	53
3.1	A régészeti növényanyag	53
3.1.1	Magbiológiai meghatározás	53
3.1.2	In vitro inkubáció.....	54
3.1.3	ősDNS-izolálás	54
3.2	Összehasonlító Citrullus fajták és tájfajták.....	55
3.2.1	Morfológiai vizsgálatok	55
3.3	Molekuláris vizsgálatok	58
3.3.1	ITS	58
3.3.2	SSR.....	58
3.3.3	cpDNS	59
3.3.4	Lcyb színgén	59
3.3.5	WGA.....	60
3.3.6	ALF	61
3.4	Szekvencaanalízis	61
3.5	Statistikai feldolgozás.....	62
4.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	63
4.1	Görögdinnyemagok feltárása	63
4.2	A mai fajták morfológiai összehasonlítása görögdinnye-típusok szerint	64
4.3	DNS izolálás az archeológiai, és a mai fajtákból.....	68
4.4	Teljes genom felszaporítása (WGA)	70
4.5	Összehasonlító molekuláris vizsgálatok	71
4.5.1	ITS elemzés	71
4.5.2	SSR elemzések.....	71
4.5.3	cpDNS elemzés.....	75
4.5.4	lcyb színgén szekvenca elemzése.....	76
4.6	Szekvencaanalízis és fajtarekonstrukció klaszter analízis alapján	77
4.6.1	Sejtmagi DNS analízis	77
4.6.1.1	ITS szekvenciák	77
4.6.1.2	SSR elemzés	79
4.6.1.3	A kloroplasztisz DNS (cpDNS) elemzése	81
4.6.1.4	lcyb színgén elemzése.....	86
4.6.2	Fajtarekonstrukció	89
4.7	Új tudományos eredmények.....	90
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	91
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	92
7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	97
8.	AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK.....	117
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	120

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
cpDNS	kloroplaszt DNS
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 ₂ :	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 láncreakció
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 1980-as évek közepéig a kutatók úgy gondolták, hogy csak a biokémiailag 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 fennmaradásához. Ezért megfelelő körülmények között a DNS túlélése biztosított (Smith *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 2000; Pruvost *et al.*, 2007). Az ősdNS kutatásokkal 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 történő – felszaporítását (amplifikációját) (Gyulai *et al.* 2006).

A vizsgálataimban felhasznált *Citrullus* magvak egyrésze a debreceni volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak növényanyaga, melynek 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) kerültek felszínre (Nyékhelyi, 2003). A budavári ásások során 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 maradhettek a magvak jó megtartásúak, ezáltal lehetőséget adva a sikeres DNS-izoláláshoz és felszaporításhoz. A molekuláris vizsgálatok lehetőséget nyújtottak a középkori Magyarországon termesztett és fogyasztott ősi *Citrullus* típusok azonosítására. A negyvennégy mai *Citrullus* fajjal és fajtával (hazai-, külföldi-, táj- és termesztett fajták) történő molekuláris és morfológiai összehasonlítás alapján megállapítható volt az ősi növények morfortípusa és elkészíthető volt a pontos rokonsági kapcsolatokat feltáró molekuláris klaszter analízis.

Munkám célja a 13. 15. és 19. századi mintákból szelektált *Citrullus* magok archeogenetikai feldolgozása, mely során az alábbi feladatokat tűztem ki célul:

1. Kiiszapolom, kiválogatom és meghatározom a 13.- 15.- és 19. századi *Citrullus* dinnyemag leleteket.
2. Kimutatom, és izolálom a magmaradványokban fennmaradt ősdNS-t, meghatározom degradációjának mértékét, és összehasonlítom a mai fajták DNS mintáinak sejtmagi (nDNS) és kloroplasztisz DNS (cpDNS) próbáival.
3. Igazolom 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 kizárom az exogén fertőzött magvakat.
4. Meghatározom a sejtmagi nSSR lókuszok elemzésével a mikroszatellita lókuszok *molekuláris evolúcióját* 44 mai fajtaival történő összehasonlításban (8 magyar fajta, 10 külföldi fajta, és 25 tájfajta).
5. A cpDNS lókuszok elemzésével új *Citrullus* haplotípusokat határozok meg.
6. Igazolom a teljes genom amplifikálás (WGA) alkalmazhatóságát az ősi DNS mintákban, megvizsgálom a szekvenciahűségét, és meghatározom a felszaporítás hatásfokát.
7. Fajtarekonstrukciót végzek az ősdNS minták SSR és cpDNS fragmentum mintázata alapján az ősi *Citrullus* növényanyag genotípusának meghatározására *molekuláris dendrogram* elemzéssel.
8. Rekonstruálom a régészeti *Citrullus* leletek fenotípusát 44 mai fajtaival való morfológiai (24 morfológiai marker alapján) összehasonlításban *morfológiai dendrogram* elemzéssel.
9. Azonosítom 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 múltra tekint vissza, ennek ellenére gyorsan 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; Hofreiter, 2011). 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; Woide *et al.*, 2010; Ginolhac *et al.*, 2012; Scubert *et al.*, 2012; Stiller és Fulton, 2012; Fulton és Stiller, 2012).

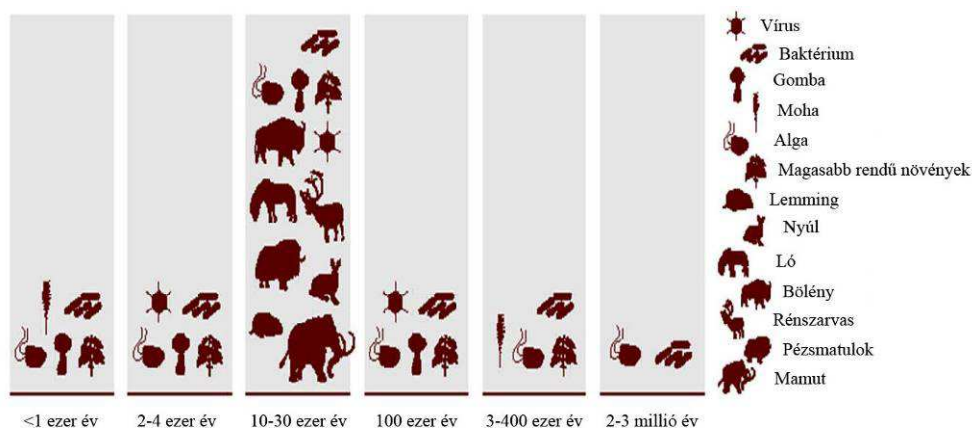
Az archeogenetika mint önálló tudomány, éppen a PCR-eljárást (Mullis, 1986) kifejlesztő Cetus (USA) vállalat laborjában kezdődött a 140 éves, múzeumban őrzött, kihalt lófajta a quagga (*Equus quagga*) bőrmintájából kivont ősDNS vizsgálatával (Higuchi *et al.*, 1984). Az archeogenetikai kutatócsoportok 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. Megjegyzendő, hogy a korai eredmények szakmai elfogadtatása nem volt egyszerű, miután a DNS-károsodásokban és azok kijavításában szakértő kutatók szerint a mintákban nem maradhat ép DNS az oxidatív károsodások miatt. Később bizonyítást nyert, hogy a valóban előforduló DNS-degradáció jelentős lehet, különösen a feltárás helyének talajviszonyai miatt, de mégsem lehetetlen az archeo leletekből autentikus DNS-t izolálni (Binlader és Willerslev, 2010).

Ilyen kétes eredmények voltak a növényi maradványokban több millió évig (17-20 millió) (Yang, 1997; Bada *et al.*, 1999) túlélő DNS sikeres izolálását (Golenberg *et al.*, 1990; Soltis *et al.*, 1992) közlő publikációk. Továbbá a DNS izolálás több millió éves dinoszaurusz csontokból (Woodward *et al.*, 1994), borostyánból kinyert rovar ősdNS (Cano *et al.*, 1992 a,b, 1993 a; Desalle *et al.*, 1992, 1993, 1994; Poinar *et al.*, 1993), és az életre kelhető baktériumok izolálása 3 millió éves leletekből (Shi *et al.*, 1997) később került megcáfолásra (Spencer és Howe, 2004). A publikált eredmények egy része a kísérletektől független laboratóriumokban való megismétlése nem volt sikeres, illetve a várt eredmények elmaradtak (Sidow *et al.*, 1991; Austin *et al.*, 1997 a,b). Próbálkozások történtek 250 millió éves rétegekből feltárt baktériumokból (Vreeland *et al.*, 2000; Fish *et al.*, 2002), 20 millió éves borostyánba (Pääbo és Wilson, 1991; Kim *et al.*, 2004) zárt dipterákból (Austin *et al.*, 1997 a,b), 40 millió éves borostyánba zárt méhből (Cano *et al.*, 1992a), 120 millió éves zsizsiból (Cano *et al.*, 1993 b), természetből (Desalle *et al.*, 1992) és rovargyomorból (Cano és Borucki, 1995), 250 és 415 millió éves sókristályba zárt baktériumokból (Vreeland *et al.*, 2000; Fish *et al.*, 2002), több millió éves mikrobából (Fletcher *et al.*, 2003) és néhány ezer éves baktériumból ősdNS kinyerésére is (Taylor *et al.*, 2007; Stakhov *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008; Lowenstein, 2009; Preus *et al.*, 2011).

Az esetek legnagyobb részében a téves eredmények humán és mikrobiális eredetű szennyeződések téves felszaporításából származtak. Különösen az emberi régészeti DNS-minták „modern” DNS-el való szennyeződése jelentett és jelent a mai napig is súlyos problémát (Gigli *et al.*, 2009; Deguillux *et al.*, 2011). Az emberi eredetű szennyeződések elkerülése céljából az izolálási folyamatok jelentős fejlesztéseken mentek keresztül az évek során (Boessenkool *et al.*, 2012). Ezt tükrözi az a változás is, amely a vizsgálatoknál alkalmazandó kontrollok számának alakulásában érzékelhető. Míg 1989-ben három szempontot vettek figyelembe, addig 2005-ben már nyolc szabálynak kellett megfelelni a kutatást végzőknek (Pääbo *et al.*, 2004). Valószínűleg ezek a rigorózus kontrollok is eredményezték, hogy ma már igen kevesen foglalkoznak emberi régészeti leletek DNS vizsgálatával, sokkal kedveltebb a barlangi medve (Krause *et al.*, 2008) vagy bölénycsontok (Gilbert *et al.*, 2005) vizsgálata, ahol az azonos fajból származó DNS-el való szennyeződés lehetősége kizárható. Bár ezen minták esetében is előfordult akár 20 különböző emberi DNS-el való szennyeződés kimutatása is (Hofreiter *et al.*, 2001).

A kezdeti időszakban született és később megcáfolt kísérleti eredmények ellenére lehetségesnek tűnik, akár 55 millió éves kőületek (Yakutföld, Szibéria) lenyomataiból (*Myrtaceae: Paramyrtacarpus plurilocularis* és *Paramyrtaciphyllum agapovii*) ősDNS kinyerése. Ezen feltevést erősíti az is, hogy kutatók 1995-ben Krétakori dinoszaurusz tojásból sikeresen izoláltak ősDNS-t (Schweitzer *et al.*, 2005). A legkorábbi krétakori dinoszaurusz lelet 68 millió éves, mely esetében csontokból és tojáshéjból vontak ki sikeresen ősDNS-t (Godefroit *et al.*, 2008). A legújabb eljárásokban lehetőség nyílik nukleinsav specifikus festékek alkalmazásával az ősDNS kimutatására a növényi, állati és emberi leletekből (Ozerov *et al.*, 2006).

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, 2011; Rohland, 2012; Bolnick *et al.*, 2012; Benoit *et al.*, 2012).



1. ábra: Az eddig feltárt növényi és állati fossziliák és leletek az ősDNS fennmaradásának időfüggvényében (Hebsgaard *et al.*, 2008).

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 (1. ábra) 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).

Vélemények szerint a mai technikai háttérrel 1 millió év az az idő intervallum, ameddig a növényi és állati DNS optimális körülmények között fennmaradhat (Lindahl, 1972, 1993; Wayne *et al.*, 1999; Hofreiter *et al.*, 2001; Pääbo *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2007; Hofreiter, 2007; Hebsgaard *et al.*, 2008; Marchant, 2011, Campbel és Hofreiter, 2012; Campos *et al.*, 2012) és belőle ősdNS vonható ki.

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 az állatvilágból

A régészeti genetika kezdetét az első mamutleletek (nem közölt eredmények), és a 140 éves, múzeumban őrzött, kihalt lófajta a quagga (*Equus quagga*) bőrmintájából kivont ősdNS vizsgálatától számítjuk (Higuchi *et al.*, 1984). Amelyből 2005-ben amerikai kutatók mtDNS-t is izoláltak, ami segítségével tisztázták a kihalt quagga kérdéses filogenetikai kapcsolatait a ló és a zebra rokonságában (Leonard *et al.*, 2005). Ezt követte az ausztráliában őshonos ragadozó kutyaféle, a kihalt erszéyes farkas (Thomas *et al.*, 1989; Krajewski *et al.*, 1992, 1997) molekuláris vizsgálata. Az utolsó jégkorszak botanikai elemzése (Taberlet és Cheddadi, 2002; Brewer *et al.*, 2002; Litt *et al.*, 2003; Stehlik, 2003), valamint a fennmaradt jégbe fagyott állatok (10-40,000 éves) ősdNS elemzése napjainkban is folyik, beleértve a mastodon (*Mammuth americanum*) kutatásokat (Hagelberg *et al.*, 1994; Hoss *et al.*, 1994; Noro *et al.*, 1998; Greenwood *et al.*, 1999, 2001a,b; Debruyne *et al.*, 2003; Gibbons, 2005; Bottjer *et al.*, 2006; Poulakakis *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2006; Debruyne és Barriel, 2006; Binladen *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2007; Hofreiter, 2008). Hasonló kísérletek folynak napjainkban 800,000 éves kihalt törpe elefánttal (Poulakakis *et al.*, 2002, 2006; Orlando *et al.*, 2007), gyapjas rinocérosszal (Orlando *et al.*, 2003b, Boeskorov *et al.*, 2011) (2. ábra), 500 éves őstulokkal (Gravlund *et al.*, 2012), illetve a világon először 12000 éves gímszarvasból izolált DNS-el (Stankovic *et al.*, 2011).



2. ábra: A 40,000 éves gyapjas rinocérosz múmia (Boeskorov *et al.*, 2011)

Az archeogenetikai vizsgálatokhoz a kihalt, de múzeumokban tárolt állatok sikeres molekuláris vizsgálatai adták meg a kezdő lökést, és a továbbiakban is nagyban hozzájárulnak a kihalt állatok filogenetikai vizsgálataihoz (Suarez és Tsutsui, 2004; Bruyn *et al.*, 2011; Taleb-Hossenkhan *et al.*, 2012). Mára a kihalt állatokkal végzett sikeres vizsgálatok száma meghaladja a százat (Kuch *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2007; Clack *et al.*, 2012).

Az állatokon végzett archeológiai vizsgálatok esetében egy probléma kiküszöbölhető, mivel a kísérletek nagyrészt a szekvenciaazonosság a kihalás előtti azonos taxonómiai csoportba való tartozást támasztja alá, illetve a mai fajok DNS-ével a keveredés kizárt.

Emlős leletek:

Mamut (*Mammuthus primigenius*): A kezdeti időszakban a kutatók mamutcsontokból próbálták kivonni a csontvelői DNS-t, de a csontvelő súlyosan károsodik a fagyban, a szőrszálban viszont meglepően jól megmarad. Elsőként 1977-ben Russel Higuchi-nak sikerült az utolsó jégkorszakból (10,000 éve) fennmaradt jégbe fagyott mammutborjú szöveteiből DNS-t izolálni (Higuchi *et al.*, 1984). A Mamut Genom Projekt-jének kutatócsoportja áttörésnek tekinthető eredményt ért el a kihalt állatok genomszekvenciájának földelítése területén. Újgenerációs DNS-szekvenáló készülékek segítségével 4 milliárd bázis sorrendjét határozták meg a mamut genomjában. A kutatócsoport a mamut nukleáris örökítőanyagának szekvenálásához két mamutmúmia szőrzetéből kivont ősdNS-t használt (Poinar *et al.*, 2006; Debruyne *et al.*, 2003, 2008b; Gilbert *et al.*, 2008a; Miller *et al.*, 2008). Az egyik példány 20,000 éve, a másik legalább 60,000 éve pusztult el, és tetemüket viszonylag épen megőrizte a szibériai örökfagy. A szőrzetből származó DNS használatának több előnye is van a csontokból származó DNS-sel szemben (Begston *et al.*, 2011). Egyrészt könnyebben eltávolíthatók róla a mindig jelenlévő szennyező baktériumok és gombák, illetve a

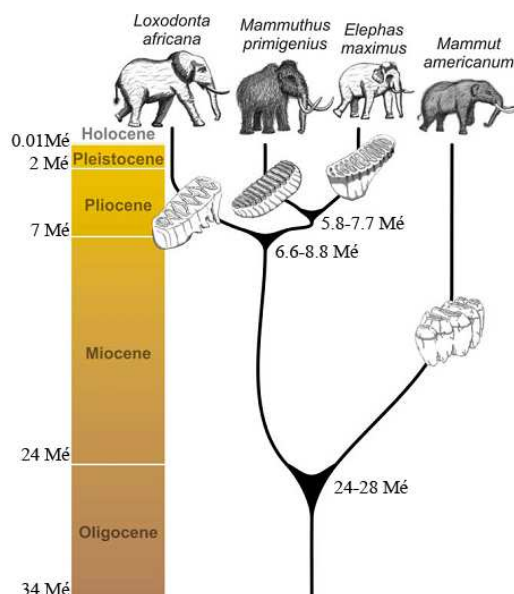
szőrszálban lévő keratin védőburokként óvja a DNS-t, ezáltal kevésbé károsodik az idők folyamán, mint egy csontból származó minta (Campos *et al.*, 2011). Vélemények szerint, a teljes mamutgenom 4 milliárd bázispárból áll, nagyjából ennyire becsülik a ma élő afrikai elefánt genomjának nagyságát. Noha a szekvenálás során több mint 4 milliárd DNS-bázisból álló adatállomány gyűlt össze, jelenleg csupán 3,3 milliárd bázist társítottak a mamut genomjához. Elképzelhető, hogy a fennmaradó DNS egy része is a mamuthoz kapcsolható, de a többi rész valószínűleg más szervezetekhez (baktériumokhoz, gombákhoz) tartozik, amelyek szennyeződésként kerültek a mintába, amelyek elkülönítéséhez összehasonlításként az afrikai elefánt vázlatos genomszekvenciáját használták (Miller *et al.*, 2008). A két állat génállománya csak 0,6 százalékban különbözik, ez nagyjából fele akkora, mint az ember és legközelebbi rokona, a csimpánz közötti genetikai különbség. A felszaporított mamut szekvenciáját összehasonlítva az afrikai elefánt szekvenciákkal (*Loxodonta africana*) megbecsülhető volt a két faj evolúciós szétválásának ideje, amely 5-6 millió évvel ezelőtt történhetett (Poinar *et al.*, 2006).

Újabb nagyszerű leletként 2007-ben egy 10,000 éves mamutbébi (3. ábra) került elő az oroszországi Jamal-félszigeten. A hathónapos korában elpusztult borjú 130 centiméter magas volt, és testét teljes egészében megőrizta a jégtakaró.



3. ábra: A 10,000 éves mamutborjú feltárása és kiemelése Szibériában (Miller *et al.*, 2008).

A 2007-ben Alaszkában feltárt jégbe fagyott 50-130 ezer éves kihalt mastodonból (*Mammuth americanum*) komplett mitokondriális genomot sikerült szekvenálni amerikai kutatóknak (Rohland *et al.*, 2007), amely segítségével fejlődéstanilag sikerült a mastodont rendszerezni (Rohland *et al.*, 2010) (4. ábra). Megállapítható, hogy a több ezer éve kihalt mastodon az evolúciót tekintve megközelítőleg 24-28 millió éve különült el a ma élő elefántoktól.

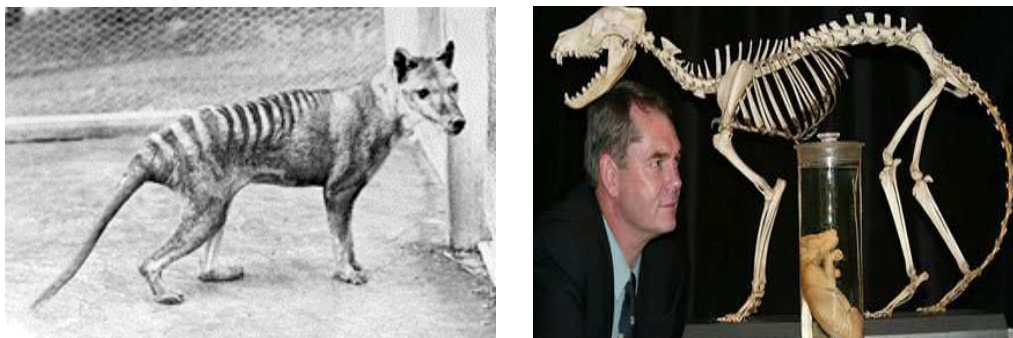


4. ábra: A több ezer éve kihalt mastodon ('amerikai mamut') és az eurázsiai mamut rokonsági kapcsolata a ma élő elefánt fajokkal (Mé - millió év) (Rohland *et al.*, 2007).

A kiterjedt mamut kutatások segítségével elérhetővé válhat a teljes mamut genom szekvenálása (Noguchi *et al.*, 2006; Rompler *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2007, 2008b), elsősorban a legújabb technikának, az emulziós PCR-nek (Margulies *et al.*, 2006) és piroszekvenálásnak (Ronaghi *et al.*, 1996, 1998; Gowda *et al.*, 2006) köszönhetően. Ez a módszer nem az időigényes gélelektroforézist alkalmazza, hanem a DNS polimeráz aktivitását detektálja ELIDA módszerrel (enzimatiszus luminometriás pirofoszfát beépülés követésével - enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate) úgy, hogy a DNS szintézise során, a nukleotid beépülésekor felszabaduló pirofoszfát molekulát (PPi) ATP-vé konvertáló *ATP-szulfuriláz* enzim aktivitását méri. A detektálás *luziferáz* (szentjános bogár enzime) módszerrel (foton detektálás) történik. A módszer zajszintjét a minimumra lehetett csökkenteni a dATP helyett történő tiofoszfát dATP α S (*deoxyadenosine α -thiotriphosphate*; syn. *5'adenozin foszfoszulfát - APS*) alkalmazásával, amelyet a DNS polimeráz nem érzékel, viszont a luciferáz enzimmal kevésbé lép keresztreakcióba (Ronaghi *et al.*, 1996, 1998).

Erszénes farkas (*Thylacinus cynocephalus*): A 20. század elején kihalt erszénes farkasból (5. ábra) izolált ősdNS (egy felnőtt állat erszényéből származó kölyök, amelyet száz éve konzerváltak, és egy százéves erszénes farkas bőrből), illetve a világ más tájairól származó erszénes ragadozók mtDNS-ének (*cytokrom b* gén, *Col2a1* gén) vizsgálatával sikerült bizonyítani (Miller *et al.*, 2009), hogy a kihalt tasmániai farkas közelebb állt az evolúciós fejlődésben a többi ausztráliai erszéneshez, mint a dél-amerikai ragadozó erszénesekhez

(Thomas *et al.*, 1989; Krajewski *et al.*, 1992, 1997). Az eredmények tovább erősítették a teóriát, hogy a két kontinensen az erszényes ragadozók fejlődése, és morfológiai tulajdonságainak kialakulása párhuzamos módon ment végbe (Krajewski *et al.*, 1997). A kutatóknak, azóta sikerült a kölyökegyed tartósított teteméből kivont DNS-molekulák elemzése révén számos gént beazonosítaniuk (Pask, 2008).



5. ábra: A XX. század elején kihalt tasmán farkas, csontváza és 140 éves embriója (Pask, 2008).

Vadló (*Equus ferus*): A jelenkori és különböző archeológiai (svéd és alaszka 28,000 éves leletek) vadló leleteken végzett kísérletek igazolták a fajon belüli nagyfokú mtDNS variabilitást (Vila *et al.*, 2001; Lippold *et al.*, 2011). Ennek magyarázatát nem a ló mitokondriális örökítőanyag evolúciós rátájának felgyorsulásában, vagy a vadlovak DNS-ének a génállományba való recens bejutásában látták, hanem a vadlovak és a modern lovak mtDNS-ének a házasítás korai szakaszában bekövetkezett keveredésében (Orlando *et al.*, 2003a, 2008a;). Az utóbbi években a molekuláris biológia új eszközöket adott a lófajták és alfajták kapcsolatát vizsgáló tudósok kezébe (Cai *et al.*, 2009, Kimura *et al.*, 2010). A mitokondriális DNS-ben bekövetkező mutációk alapján kiszámítható, hogy az *Equus caballus*, a mai háziló őse 1,7 millió évvel ezelőtt alakulhatott ki Észak-Amerikában. Ezt még inkább alátámasztja a Yukon lovon (*Equus lambei*) végzett vizsgálat (Forstén *et al.*, 1992). Ez a faj volt az utolsó észak-amerikai lófaj, mielőtt a ló eltűnt volna a kontinensről, maradványait az alaszka jéggel borított területek őrizték meg. A vizsgálat azt derítette ki, hogy a fajta genetikailag azonos az *Equus caballus* alfajjal (Hofreiter *et al.*, 2001).

Barlangi medve (*Ursus spelaeus*): A barlangi medve esetében (Hofreiter *et al.*, 2002; Orlando *et al.*, 2002) sikerült mitokondriális DNS-t izolálni, és ezt összehasonlítani a ma élő 8 és 2 kihalt medvefaj mitokondriális DNS-ével (Krause *et al.*, 2008). Ma már lehetséges az utolsó jégkorszak (késői pleisztocén) előtti és alatti élővilágban felmerülő populációgenetikai kérdések megválaszolása a mtDNS szekvenciák alapján. Az organelum DNS szakaszokat

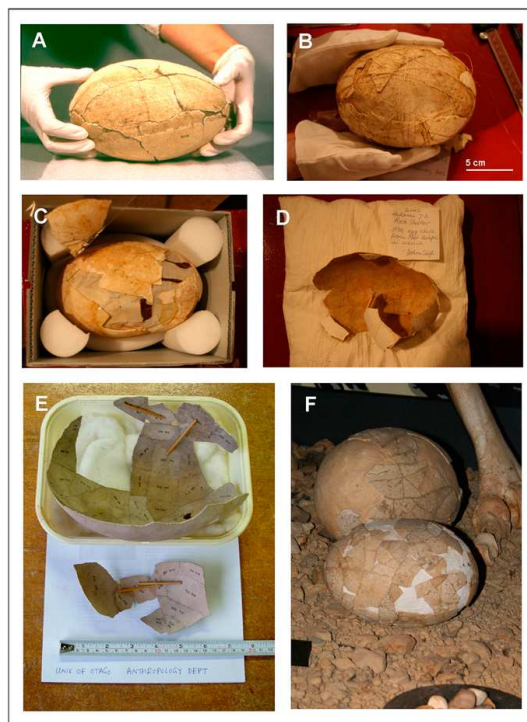
”konzerválódott egység”-ként felhasználva a populációgenetikai vizsgálatokban, sikerült az alaszakai barnamedve (*Ursus arctos*) mitokondriális DNS típusát kimutatni a különböző szeparált földrajzi helyeken élő barnamedve populációban (Valdiosera *et al.*, 2003, 2008; Bon *et al.*, 2011), és a 30,000 évvel ezelőtt élő populációkból is (Leonard *et al.*, 2000). Ami a kis populációkon bekövetkezett hosszútávú elkülönülést követő alacsony mtDNS variabilitás következménye (Pääbo, 2000). A közelmúltban sikerült az első rövid nukleáris DNS szakaszok izolálása, amplifikálása a pleisztocén korból fennmaradt állat leletekből (Greenwood *et al.*, 1999). Hasonló kísérletek folynak egyéb jégkorszak előtti időből származó barlangi medve (*Ursus spelaeus*) (Valdiosera *et al.*, 2006), és jégkorszaki barna medve (Leonard *et al.*, 2000; Loreille *et al.*, 2001; Barnes *et al.*, 2002; Hofreiter *et al.*, 2002) leletek mitokondriális és sejtmagi DNS-ének kivonásával. Az ilyen kutatások lehetővé teszik a kihalt állatok genetikai távolságának közvetlen meghatározását egymástól, és más még élő rokonaiktól.

Madár leletek:

Moa (*Dinornis robustus*): Az Új-Zélandon kihalt moa esetében a múzeumokban megőrzött csontok adták a lehetőséget a faj evolúciós kérdéseinek tisztázására, összehasonlítva más röpképtelen madárfajjal (futómadarak), mint a napjainkban Új-Zélandon élő kiwivel (Shepard *et al.*, 2012), az afrikai struccal, a dél-amerikai nandúval, vagy az ausztráliai emuval és kazuárral. A teljes DNS állomány rekonstruálása terén az első sikerek 2001-ben születtek, amikor egy 400 éves moa teljes mitokondriális DNS állományának (16,500 nt) bázispárorsorrendjét határozták meg (Cooper *et al.*, 2001a). A hosszú-PCR (long range PCR) (Cheng *et al.*, 1994) technikával elkészített mitokondriális térkép lehetőséget adott az evolúciós fejlődési utak felvázolásához és segítséget nyújt a moa rendszertani helyének pontos feltérképezésében a futómadarak között. Továbbá sikerült igazolni a nagytermetű moa madarak eredetét, valamint azt, hogy ez a faj kétszer kolonizálta Új-Zélandot (Baker *et al.*, 2005).

A mitokondriális DNS szekvenciák a moa ausztráliai származását, futómadár rokonságát bizonyította, szemben a szintén új-zélandi kihalással veszélyeztetett kiwivel (Cooper *et al.*, 1992). A nukleáris DNS szekvenciák nemhez kapcsolt lókuszainak vizsgálatával sikerült az előzőleg különböző moa fajnak leírt hím és női egyedeket azonosítani, és 9-re csökkenteni a kihaltak hitt moa fajok számát (Bunce *et al.*, 2003; Huynen *et al.*, 2003). Szintén kutatások

folynak a Moa tojásának morfológiai rekonstruálására archeo tojásleletek felhasználásával (Allentoft és Rawlence, 2011; Huynen *et al.*, 2012). A kísérletekben sejtmagi és mitokondriális DNS-t egyaránt felhasználtak melyet a tojás külső és belső felületéről izoláltak (Huynen *et al.*, 2009) (6. ábra) .



6. ábra: Több ezer éves Moa tojás (Huynen *et al.*, 2009)

Dodó galamb (*Raphus cucullatus*): Csontjait csak a 20. században találták meg, és ekkor kiderült, hogy valójában egy íbiszféle madár volt. A maradványokban fellelt mtDNS *cytochrome b* és *12S rRNS* szakaszainak vizsgálata szerint a dodók ősei nem a közelebbi Afrikából, hanem a távolabbi Délkelet-Ázsiából érkeztek. A molekuláris elemzés kimutatta (Roberts és Solow, 2003), hogy a dodó és legközelebbi rokona, a szintén kihalt Rodrigues-szigeti galamb (*Pezophaps solitaria*) vagy remetegalamb egy közös, galamszerű (Pereira *et al.*, 2007) ősből fejlődött ki. Legközelebbi rokonaik a ma Délkelet-Ázsiában élő sörényes galamb (*Caloenas nicobarica*), az új-guineai koronásgalamb (*Goura spp.*) és Szamoa szigetvilágának fogasgalambja (*Didunculus strigirostris*). A dodó ezek alapján nem rokona más röpképtelen madaraknak, mint például az afrikai struccfélék, a dél-amerikai nandufélék, az ausztráliai emufélék (Heupink *et al.*, 2011), az új-guineai kazuárfélék, az új-zélandi kiwifélék, valamint a már kihalt moa- (Új-Zéland) és elefántmadár-féléknek (Madagaszkár). A madárfélék genetikai vizsgálatait során megállapításra került, hogy genetikai anyag kinyerését legsikeresebben csontból, illetve szőrből és tojáshéjből (Oskam *et al.*, 2010, 2011,

2012) lehetséges. A tollmaradványokban található maradvány DNS mennyisége számottevően elmarad az egyéb maradványokban fellelhető DNS mennyiségétől (Olsen *et al.*, 2011).

Rovar leletek:

A miocén korból (5-25 millió éve) származó borostyánba zárt dipterákból (Austin *et al.*, 1997a,b; Gutiérrez és Marín, 1998), zsizsiból (Cano *et al.*, 1993b), és természetből (Desalle *et al.*, 1992), valamint rovargyomorból (Cano és Borucki, 1995), vagy sókristályból (Vreeland *et al.*, 2000; Fish *et al.*, 2002) nem tudtak DNS-t izolálni reprodukálhatóan, köszönhetően annak, hogy az így fennmaradt állati maradványokban számos fizikai, kémiai és biológiai változás ment végbe. 1982-ben 40 millió éves borostyánkőbe zárt rovarból izoláltak szöveteket, de DNS szekvenciákat nem tudtak reprodukálni (Poinar *et al.*, 1993). A szikláshegységben 50 éve kihalt 400 éves szöcske leletekből sikerült kutatóknak ősdNS-t izolálni, és a kihalt rovar fajt filogenetikailag rendszerezni (Chapco *et al.*, 2004). Hasonó kísérleteket folytattak feltárt bogár és bogár páncél maradványokból (*Carabidae*) kinyert ősdNS-sel (Balke *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009) (7. ábra).



7. ábra: Húszezer éves bogárpáncél (*Carabidae*) leletek (méretarány: 1mm) (Balke *et al.*, 2008).

2.1.2 ősDNS leletek Humán vonatkozásai

Az archeogenetikai munkák másik izgalmas területe az emberi leletek (Pääbo, 1999, Pääbo *et al.*, 1988, 1999; Alonso *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2001b, 2004; Jahren *et al.*, 2004; Malmstrom *et al.*, 2007; Kirsanow és Burger, 2012), az egyiptomi múmiák (a legrégebbi az i.e. 3300-ból) ősDNS kutatása (Pääbo, 1985, 1989b), valamint az emberi evolúció kutatása (Handt *et al.*, 1994b; Noonan *et al.*, 2006) (1. táblázat). Szintén nagy jelentőséggel bíró kutatások az első ősDNS klónok izolása volt 5600 éves (i.e. 2600-ból) egyiptomi múmiákból (Pääbo, 1985).

A legnagyobb nehézségekbe a kutatók az emberi maradványokon végzett kísérletek során ütköztek, mivel rendkívül nehéz volt elkülöníteni a vizsgálandó ősi mintát a laboratóriumok, és múzeumok környezetében jelenlévő emberi DNS szennyeződéstől. Így előfordulhat, hogy a vizsgált mitokondriális szekvencia nem más, mint egy nukleáris inszerció, és kontamináció eredménye (Zischler *et al.*, 1995a). Ennek köszönhetően az ősi DNS szekvenciák valójában kisebb hatással vannak a mai ember történelmének, és evolúciójának feltárására (Hofreiter *et al.*, 2003a). A vizsgálatokat tovább nehezíti, hogy a ma élő emberi populációk még a rendkívül gyorsan változó, mitokondriális genomon belül is hasonló DNS szekvenciákkal rendelkeznek.

1. táblázat. Néhány emberi DNS lókus, melynek régészeti leleteit tanulmányozták (Cavalli-Sforza, 2003). Rövidítések: mtDNS: mitokondriális DNS, ACE: angiotenzin konvertáló enzim, PDHA1: piruvát alegység β -dehidrogenáz E1.

genomi szakasz	vizsgált idő (év)
mtDNS	200,000
Y-kromoszóma	200,000
Xq13.3	500,000
β -globin	800,000
ACE	1,000,000
PDHA1	1,900,000

Múmia kutatások:

A legrégebbi (9,000 éves) mumifikálódott emberi lelet az angliai Cheddar városából került elő (Sykes, 2001, 2003). Ehhez a területhez kötődik napjaink híres hazai eredménye a 2-300 éves 'Váci múmiák' (2. táblázat) vizsgálata is (Nagy Károly, SOTE, Budapest kísérletei; Fletcher *et al.*, 2003). A múzeum embertani tárában őrzött váci múmiákból (8. ábra) vett DNS-minta (tüdőből, hasüregből, bordákból, hajból, fogakból származó minták) vizsgálatával fény derült arra, hogy a váci kriptában eltemetett 265 egyén 70%-nál volt kimutatható a tbc kórokozó baktériumának jelenléte. Ez azonban nem jelenti azt, hogy ők mindannyian tbc-ben haltak volna meg.



8. ábra: A budapesti Természettudományi Múzeumban őrzött 300 éves váci múmiák leletei (Nagy Károly kutatásai, SOTE; Fletcher *et al.*, 2003).

Sok érdekes eredmény vár megerősítésre, mint pl. az ausztrál 'Mungo Man' leletek ősdNS igazolása (Adcock *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2001b), amelyből sikerült végül a mitokondriumban tárolt információ egy kis részletét megszekvenálni. A DNS-szakasz aztán evolúció-genetikusok kezébe került, akik azt további kilenc, 15,000 évesnél nem régebbi ausztráliai lelettel, neandervölgyiek maradványaival (Green *et al.*, 2010), ma élő emberekkel, az emberszabásúak közül pedig csimpánzokkal és törpecsimpánzokkal hasonlították össze. Az ezen adatok alapján felrajzolt evolúciós fának a ma élő emberhez vezető ágához az összehasonlításba bevont fiatalabb ausztrál leletek szépen illeszkednek, viszont megállapítható, hogy a Mungo Man nem tartozik ide. Ebből a szakértők azt a következtetést vonták le, hogy a modern ember nagy valószínűséggel már a mai ember őseinek megérkezése előtt felbukkant az ötödik kontinensen, és a maga hatvanezer éves korával Mungo Man a legrégebbi ismert ember, aki anatómiailag kétség kívül modernnek tekinthető, de egy mára már kihalt evolúciós vonalat képvisel. Hasonló kísérletek folynak a kínai Han-dinasztia leleteivel is, ahol korabeli kétezer éves múmia májából sikeresen tisztítottak DNS-t (Wang és

Lu, 1981). 1989-ben Németországban 2,400 éves múmiából (Pääbo *et al.*, 1989a), 2010-ben az USA-ban 5000 éves fagyott emberi múmiából (Gould *et al.*, 2010), 600 éves szibériai fagyott emberi testből (Crubézy *et al.*, 2010; Bennet és Kaestle, 2010) és egy 4000 éves grönlandi emberi maradványból (Shapiro és Hofreiter, 2010) vontak ki töredezett, de használható DNS-t.

2. táblázat. Mumifikálódott emberi leletek (múmiák) kora és mtDNS típusai (Handt *et al.*, 1994b; Sykes, 2001, 2003, Fletcher *et al.*, 2003, Olivieri *et al.*, 2009; Olivieri *et al.*, 2009). *jégbe fagyott testek.

név	helyszín	kor (év)
Cheddar-i ember	Anglia	9,000
Chinchorro-múmiák	Chile	7,000
Ginger	Egyiptom	5,400
Ötzi a jégember*	Olaszo.	5,300
Ahmose I fáraó	Egyiptom	3,550
Seknet-re fáraó	Egyiptom	3,550
Thutmose I fáraó	Egyiptom	3,500
Amenhotep I fáraó	Egyiptom	3,500
Juanita a perui lány*	Peru	500
Váci múmiák	Magyarország	300
O.-Magyar katona*	Olaszország	1918-ból

2008-ban kutatók 3,400-3,500 éves Észak-Kanadában jégbe fagyott eszkimó hajmaradványokból (Thomas *et al.*, 2008; Debruyne *et al.*, 2008a; Rasmussen *et al.*, 2010) izoláltak DNS-t, és a minták a ma élő eszkimó csoportok DNS-ével történő összehasonlítása folyamatban van (Gilbert *et al.*, 2008b,c).

Az öröklődés folyamatában a DNS-ben mutációk keletkeznek, ezért a ma élő emberek jelentősen különböznek egymástól, ezeknek a különbözőségeknek vagy polimorfizmusoknak a mértéke genetikai történetünk, rokonsági fokunk nyilvántartásaként szolgál. A mutációk előfordulási gyakorisága és populációszintű rögzülése viszont az idő függvénye, ennek következtében ezer évnél fiatalabb csontleletek DNS-mintázata nem ad lényeges különbséget a mai mintákhoz képest, ezért evolúciós kérdések az ilyen esetben nem vizsgálhatók. Ilyenkor

csak a populáció egyedeinek genetikai összetételét hasonlíthatjuk össze, mint ahogy azt a magyar minták vizsgálatánál is tették.

Neandervölgyi ősember kutatások:

Az első nukleáris DNS szekvenciákat 1991-ben izoláltak egy 7,500 éves pleisztocén kori maradványokból az emberrel kapcsolatos archeológiai vizsgálatok során. A neandervölgyi emberi maradványok vizsgálata során kapott variabilitás a nukleáris gének lókuszaiban nem tér el a mai embernél tapasztalhatótól (Pääbo, 1999). Ezért a neandervölgyi és a mai ember inkább tekinthető a ma élő emberszabású majmokból kialakult alfajnak, mint külön fajnak (Krings *et al.*, 1999; Kaessmann *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2004; Ermini *et al.*, 2008). A közel 30,000 évvel ezelőttig Európában és Nyugat-Ázsiában élő neandervölgyi emberi maradványok (modern ember és a csimpánz közötti forma) vizsgálatok során sikerült mitokondriális DNS-t izolálni csontokból, és a szekvenciavizsgálatok szintén bizonyították (eltérő hipervariábilis mtDNS szakaszok), hogy a neandervölgyi és a ma élő ember nincs közvetlen kapcsolatban egymással (Krings *et al.*, 1997; Schmitz *et al.*, 2002).

A Kaukázusból (30,000 év), és Horvátországból (42,000 év) származó neandervölgyi maradványok mtDNS szekvenciáinak meghatározása lehetőséget ad a különböző emberformátumú populációk vizsgálatára (Krings *et al.*, 2000). A mai ember és az emberszabású majmok eltérését jól mutatja az ember kevesebb szekvencia variabilitása a mitokondriális és nukleáris DNS-ben (Kaessmann *et al.*, 2001). Mitokondriális DNS-vizsgálat volt az alapja annak az 1987-es szenzációs bejelentésnek is, amely szerint a földet benépesítő mai emberek feltehetően egyetlen, Kelet-Afrikában kétszázézer évvel ezelőtt élt nő leszármazottai ("Éva-hipotézis"). Noha az eredeti közlemény következtetéseinek helyességét sokan vitatták, azóta számos egyéb vizsgálat megerősíteni látszik az eredményeket. Ma a tudományos közvélemények nagy része elfogadja ennek a feltevésnek a lényegét, vagyis azt, hogy a mai emberiség ősei Afrikából kiindulva népesítették be a földet 1-200,000 évvel ezelőtt, kiszorítva, vagy kiirtva a korábban Európában és Ázsiában élt egyéb ősembereket, így a neandervölgyi embert is (Dickson *et al.*, 2000, 2003).

Az archeogenetika segítségével bepillantást nyerhetünk a világ más tájaira (Európa, Ázsia) 100,000 évvel ezelőtt Afrikából szétvándorló mai modern ember, és az Európában, Nyugat-Ázsiában 300,000 évvel ezelőtt már élő elődeik a neandervölgyiek közötti kapcsolatába. A

neandervölgyi ember kialakulása az mtDNS-ében lévő eltérések alapján 500,000 évre vezethetők vissza (Krings *et al.*, 1999), míg a ma élő összes ember mtDNS-e egy 170,000 évvel ezelőtt Afrikában élő közös őstől származik (Ingman *et al.*, 2000). Egyes paleontológusok régészeti maradványokból különböző teóriákat állítottak fel, melyek bizonyos genetikai és leszármazottsági kapcsolatot, és folytonosságot feltételeztek a neandervölgyi és a mai európai ember között (Duarte *et al.*, 1999; Wolpoff *et al.*, 2000; Hawks és Wolpoff, 2001; Wolpoff *et al.*, 2001). Ugyanezt az adatsort felhasználva a többség a neandervölgyi és a mai ember teljes, vagy majdnem teljes kicserélődését támasztotta alá (Stringer és Andrews, 1988; Stringer, 2002; Hebsgaard *et al.*, 2007)

A közelmúlt legszenzációsabb ilyen típusú eredménye a neandervölgyi ősember mitokondriális DNS-ének az elemzése. 2008-ban 38 ezer éves neandervölgyi csontokból vontak ki sikeresen mitokondriális DNS-t, megközelítőleg 0,3g csontból sikerült 4,8 Gb nagyságú DNS-t kivonni (Green *et al.*, 2008). Ebben az esetben sejtmagi DNS-t nem sikerült használható formában felszaporítani, a mitokondriális DNS vizsgálata azonban eredményes volt és fontos tanulsággal szolgált. A kutatók az ősi csontmaradványból a mitokondriális DNS variábilis régiójának mintegy 300 nukleotid hosszúságú szakaszának szekvenciáját határozták meg és hasonlították össze közel ezer, a legkülönbözőbb népcsoportokhoz tartozó mai ember mitokondriális DNS-ével. Míg a mai embereknél ezen a szakaszon átlagosan nyolc nukleotidnyi különbséget találtak két egyed között, a neander-völgyi ember szekvenciája 20 helyen különbözött a hozzá legközelebb álló mai emberétől, és az átlagos különbség 25 nukleotid volt. Ennek alapján ki lehetett mondani, hogy a neandervölgyi ősember minden bizonnyal nem tekinthető a mai ember elődjének, a két "faj" szétválása körülbelül 600,000 évvel ezelőtt következett be.

Német és amerikai kutatók csoportjának egy 38 ezer éves csontkövületből sikerült feltérképezniük az anyai ágon öröklődő mtDNS minden génjét. Most először sikerült lényegileg hibátlanul rekonstruálniuk egy ősi DNS genetikai szekvenciáját. A kutatók szerint a neandervölgyi ősember és a modern embertípusok utolsó közös őse mintegy 660 ezer éve (plusz-mínusz 140 ezer év) élt (Green *et al.*, 2008). Az eredmények ugyan nem zárják ki a 40,000 évvel ezelőtt Európába érkező emberek, és a neandervölgyiek keveredését, és ezáltal a genetikai háttérre vonatkozó hatást, de erre konkrét molekuláris bizonyítékot nem találtak (Enflo *et al.*, 2001; Serre *et al.*, 2004). A mai emberek között található alacsony mtDNS szekvenciavariabilitás az 50,000 évvel ezelőtti kis populációból történő elterjedést támasztja

alá (Rogers és Harpending, 1992). A mai ember származásának és az ősemberek keveredésének egyéb vizsgálati módjai közé tartoznak a nukleáris gének, és az *Y*-kromoszóma vizsgálata (Bouakaze *et al.*, 2007; Malmström *et al.*, 2012). A technikai problémákat kiküszöbölve a nukleáris gének vizsgálata rendkívül sok információt adhatnak a neandervölgyi és más ősember evolúciójáról és elkülönüléséről (500,000 év).

A jövőbeni kutatásokkal, és új módszerekkel lehetővé válik az ősi korból származó emberi maradványok sikeres molekuláris vizsgálata, és talán választ kapunk az ősemberek közt lezajlott keveredésre és a korai ősemberek mtDNS génkészletére (Simon *et al.*, 2011). A legújabb, Ausztráliából származó csontokon végzett mtDNS vizsgálatok során különböző (Adler *et al.*, 2010) a mai emberek variabilitásától eltérő szekvenciát izoláltak, amely az ősemberből modern emberré válás során drift hatására eltűnt.

Hasonló mitokondriális vizsgálatokat végeztek egy 28 ezer éves Cro-Magnoni előember maradványain, amely egy Olaszországban 2003-ban feltárt barlangból került elő (Caramelli *et al.*, 2008).

2.1.3 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).

Mivel a régészeti leletekben a különböző bomlási folyamatok eredményeként igen kevés DNS található, az ilyen kísérletek elvégzését nagyban segítette a polimeráz láncreakció alkalmazása (PCR), amely segítségével akár egyetlen DNS-szakaszból is több millió kópia állítható elő (Kistler, 2012). Ennek a módszernek azonban az a veszélye, hogy bármilyen, a régészeti lelet kezelésekor rá-, illetve belekerült DNS-szakasz felsokszorozódhat.

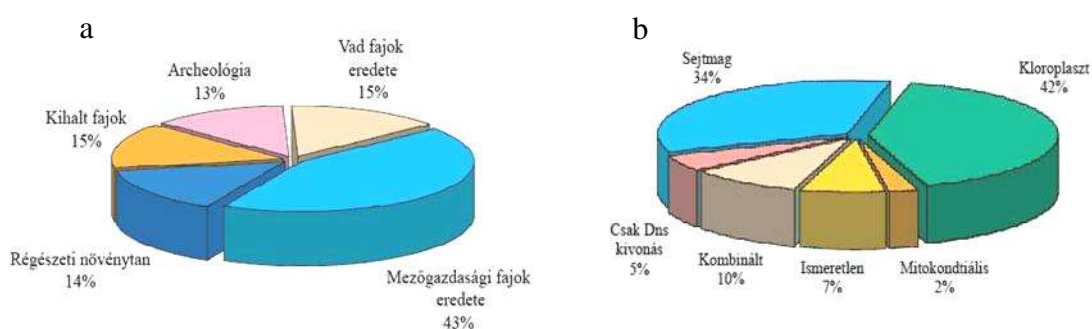
A szükséges oldatkontrollok mellett az ősdNS jelenlétére utal az a tény, hogy az ilyen DNS általában nem ad 150 bp-nál hosszabb PCR-terméket a bekövetkezett DNS-károsodások miatt

(den Tex *et al.*, 2010). Ezek az esetek nagy részében post-mortem bekövetkező oxidatív károsodások, DNS-szál keresztkötések, száltörések, amelyek mértéke nem elsősorban a biológiai minta korától, hanem a lelet megtalálási helyének talajviszonyaitól függenek.

A gyors kiszáradás, lefagyás, magas sókoncentráció késleltethetik a károsodások kialakulását, de ilyen körülmények között is megtörténik az oxidáció, vagy a hidrolízis során bekövetkező DNS sérülés. A károsodások gyakorlatilag kizárják, hogy egymillió évnél idősebb leletből sikerüljön a DNS-kinyerés. Próbálkoztak a károsodott DNS utólagos kijavításával, ez azonban csak a DNS két szála közötti keresztkötések megszüntetésében volt eredményes.

Az archeogenetikai kutatások csupán 7 százaléka foglalkozik növényi fajok kutatásával (Gugerli *et al.*, 2005) (9. ábra). Ennek legfőbb oka, hogy a növényi szövetek gazdagabbak elsődleges és másodlagos metabolitokban (szénhidrát és fenol vegyületek) melyek PCR reakcióban inhibitoroként viselkednek, mint az állati vagy emberi szövetek (Ziagenhagen *et al.*, 2003).

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.



9. ábra: A növényi archeogenetikai kutatások (a), és sejtorganellum kutatások (b) különböző területeinek százalékos megoszlása (Gugerli *et al.*, 2005).

Növényi maglelet vizsgálatok:

A növényi régészeti genetika legkutatótobb területe a termesztett növények domesztikációjának (Harlan, 1971; Ho, 1977; Brown, 1999; Zohary és Hopf, 2000; Blatter *et al.*, 2002), és evolúciójának (Jaenicke-Deprés *et al.*, 2003; Allaby *et al.*, 1999; Callaway, 2010; Palmer *et al.*, 2012; Schlumbaum *et al.*, 2011), valamint a mezőgazdaság kialakulásának és elterjedésének a nyomon követése (Harlan, 1971; Keng, 1974; Ho, 1977; Walters, 1989; Freitas *et al.*, 2003) elsősorban magmaradványok ősdNS mintáinak elemzésével (Gismondi *et al.*, 2012). Általánosságban elmondható, hogy ásatások során növényi magleletek kerülnek elő a legnagyobb számban. A növényi ősdNS azonosításában nagy jelentőségű, a konzervatív kloroplasztisz DNS fajspecifikus régióinak (Petit *et al.*, 2002, 2003), különösen az *rbcL* (Chase *et al.*, 1993) és *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991, 1996) szakaszainak technikailag megbízható kimutatása. Néhány magmaradvány esetében csírázási eredmény is közlésre került (pl. a 10,000 éves 'sarki csillagfürt' (*Lupinus arcticus*) esetében (Porsild *et al.*, 1967), amely eredmény kétséges, hasonlóan a 13,000 éves indiai lótusz (*Nelumbo nucifera*) (10. ábra) magok csírázási kísérleteihez (Shen-Miller, 2002).



10. ábra: A 13,000 éves kínai lótusz (*Nelumbo nucifera*) gyümölcs lelete (Shen-Miller, 2002).

A nagy eredményként közölt egyiptomi 1-2,000 éves ősi búzaleletek (kamut búza) csírázása (Quinn, 1999) sem igazolható, talán azzal magyarázható, hogy a *Triticum turgidum* nagy kalású tájfajtája keveredhetett a leletek közé.

Valószínű, hogy csak a sokkal fiatalabb csírázási eredmények a hitelesek, mint például a 127 éves hexaploid magyar búzaszemek (Székesfehérvári – Stuhlweissenburger) (*Triticum vulgare* var. *erythrospermum* Körn.) újra csírázása (Ruckenbauer, 1971), valamint a nürnbergi színház építésénél feltárt 172 éves árpa, (*Hordeum*) és zab (*Avena*) csírázási

kísérletek (Aufhammer és Fischbeck, 1964). Azt a tényt, hogy a DNS megőrzi szerkezetét a régi biológiai leletekben is, az a kísérlet bizonyította, amelyben az argentinai Santa Rosa de Tastil mellett végzett ásatási területen talált, mintegy 550 éves *Canna compacta* magot sikeresen csíráztatták (Lerman és Cigliano, 1971).

A régészeti meghatározás szerint, a mezőgazdálkodás eredete az utolsó jégkorszak végétől (i.e. 11,000 év) származtatható, amikor a halászó-vadászó népek megkezdhatték a növénytermesztést először talán a Termékeny Félhold (Mezopotámia, Asszíria, Fönícia és Egyiptom) területén. Ennek az időszámításnak ellentmondanak a legújabb növényi magleletek, mint a Jordán folyó északi völgyének (Ohalo II) 20,000 éves vadárpa (*Hordeum spontaneum*) és búza (*Triticum dicoccoides*) leletei (Nadel *et al.*, 1994, 2006; Piperno *et al.*, 2004), és a 15,000 éves dél-koreai és 5000 éves japán rizs (Tanaka *et al.*, 2010), 3500 éves indiai (Nasab *et al.*, 2010) és kínai búza (Li *et al.*, 2011), lelet, melyből sikeres DNS izolálást is jelentettek, valamint a vietnami Hoabinh-i vadászó-halászó kultúrának a mai Thaiföldre való kiterjedésének számtalan növénylelete, amelyek i.e. 9000 – 5500 évekig nyomon követhetőek (Flannery, 1973; Gorman, 1969, 1970, 1971; Matthews, 1964, 1966; Moser, 2001; Phukhachon, 1988; Shoocongdej, 2000; Solheim 1972; Van Tan, 1994, 1997; White és Gorman, 2004).

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 (11. ábra) 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).



11. ábra: A 2.000 éves ősi kukorica (*Zea mays ssp. parviglumis*) lelete (Goloubinoff *et al.*, 1993).

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, Capellini *et al.*, 2010).

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.

Növényi fosszília-lelet vizsgálatok:

Az értékes növényi maradványok speciális esetben megégett mintákhoz hasonlítanak (szenült minták), de nem tüztől, hanem a talaj egyedi körülményei miatt szenesednek el, ennek

ellenére a DNS, ugyan erősen degradált, de kivonható állapotban marad fenn bennük (Banerjee és Brown, 2002). A szenesedés (szenülés) kísérleti úton is jól modellezhető folyamat (Chalfoun és Tuross, 1999; Threadgold és Brown, 2003). Megmaradhatnak makrofosszíliák, azaz törzsek, levelek, termések, akár a maguk valójában, akár pedig lenyomat formájában. Ám az egykori növényzet meghatározásához létezik egy paleobotanikai eszköz a pollenanalízis. A pollen falát alkotó anyag, a sporopollenin rendkívül ellenálló. Megfelelő közegbe kerülve évmilliókig megőrzi formáját, és a pollenmorfológia segítségével növénycsoportokat (család, nemzetség, faj) lehet belőlük meghatározni.

A szekvenciák korának meghatározását nehézkessé teszi az egyes makromolekulák fázisok közti felfelé, ill. lefelé irányuló vándorlása (Hofreiter *et al.*, 2003b). Az üledékből és rétegekből kapott DNS szekvenciák taxonómiai meghatározásokban történő felhasználását tovább szűkíti, a kisebb fragmentumokat átfogó szekvenciaanalízis, köszönhetően a DNS degradációnak, ill. a szekvenciák eredetének, összetettségének (Hofreiter *et al.*, 2000, 2003b).

Kísérletesen nehéz terület a régi/ősi fás növényi maradványokból történő DNS kivonás, amely csak nagyobb mennyiségű minta esetén lehet sikeres (Ziegenhagen, 2003; Dumolin-Lapégue *et al.*, 1999; Deguilloux *et al.*, 2002, 2003, 2004; Burger *et al.*, 2000; Sperisen *et al.*, 2001; Lascoux *et al.*, 2004; Parducci és Petit, 2004; Fladung *et al.*, 2004).

A pollenből végzett kutatásokat (Van Leeuwen *et al.*, 2008) nagyban elősegítik a nagyon széles körű fosszília adatbankok (Brewer *et al.*, 2002; Taberlet és Cheddadi, 2002; Petit *et al.*, 2003). A növényi ősdns azonosításában nagy előrelépést jelentett a konzervatív kloroplasztisz DNS fajspecifikus régióinak (Petit *et al.*, 2002, 2005), különösen az *rbcL*, *rbcS* (Chase *et al.*, 1993) és *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991, 1996) szakaszainak megbízható kimutatása.

Kérdéses, illetve téves eredmény a növényi ősdns kutatásban is született. Az 1988-ban vizsgált miocén kori 18 millió éves liliomfa (Magnólia) levéllenyomataiból izolált DNS (Golenberg *et al.*, 1990) műterméknek bizonyult, hasonlóan a miocén korból származó tündérkürt (*Clarkia amoena*) (Sidow *et al.*, 1991), és a 17-20 millió éves mocsáriciprus (*Taxodium distichum*) (Soltis *et al.*, 1992) lenyomathoz, ezekben még a lignin fennmaradása sem volt igazolható (Eglinton és Logan, 1991; Logan *et al.*, 1995).

Időrendben a legrégebbi növényi ősdNS elemzés a japán fenyő pollen leletekből (pleisztocén kor, kb. 150,000 éves) izolált DNS tekinthető, *rrn5* és *trnR* cpDNS szekvenciák amplifikálásával (Suyama *et al.*, 1996). Sikeres ősdNS izolálást írtak le 18,000 éves posztglaciális (Liepelt *et al.*, 2002), 10,000 éves fenyő virágpor (Elenga *et al.*, 2000; Parducci *et al.*, 2004) és 46000 éves pollen (Jørgensen *et al.*, 2012) maradványokból is. Sikeres volt egy 4,000 éves tengeri moszat (*Posidonia oceanica*) (Raniello és Procaccini, 2002) és egy 3,600 éves japán cédrus (*Cryptomeria japonica*) (Tani *et al.*, 2003) illetve 11000 éves Norvég lucfenyő pollen (Magyari *et al.*, 2011) maradványaiból történő ősdNS izolálás és szekvencia elemzése is.

A Hollandiában 2008-ban feltárt pleisztocén korból származó 130,000 éves tölgyből (Ferris *et al.*, 1993) ősdNS kivonását és a faj filogenetikai besorolását végezték el kutatók, a ma élő tölgy (*Quercus*) fajokkal való összehasonlításban (Stone *et al.*, 2008). Olaszországban feltárt 45 ezer éves keleti bükk (*Fagus sylvatica ssp. Orientalis*) lelet esetében ősdNS-t izoláltak (Paffetti *et al.*, 2007) és végezték el a feltárt lelet rendszertani besorolását. Hasonló fajok és fajtán belüli rendszertani összehasonlítást végeztek amerikai kutatók több ezer éves *Chenopodium berlandieri* magleletből kivont DNS-ből (Kistler és Shapiro, 2011) és vörös tölgy (*Quercus rubra*), amerikai bükk (*Fagus grandifolia*), cukor juhar (*Acer saccharum*) és sárga nyír (*Betula allagheniensis*) makrofossziliákból (Anderson-Carpente *et al.*, 2011).

Hazánkban több mint félmillió éves szárnyasdió (*Pterocarya fraxinifolia*) és hemlokfenyő (*Tsuga mertensiana*) növénymaradványait találták meg Győr határában. Az Északi-Középhegység, és a Balaton hajdani öblei az utolsó eljegesedés végéről nagy mennyiségű virágporanyagot őriznek, amelyek feltárássra és DNS analízisre várnak.

Herbáriumi leletek:

A herbáriumi gyűjtemények is jelentős mértékben járultak hozzá számos faj mikroevolúciós elemzéséhez (Savolainen és Reeves, 2004; Hodkinson *et al.*, 2007; Andreasen *et al.*, 2009; Leiono *et al.*, 2009; Sohrabia *et al.*, 2010; Paplinska *et al.*, 2011). Egyes vélemények szerint a herbáriumi minták nem lehetnek öregebbek, mint 500 év, csak így biztosítható a megfelelő DNS kinyerhetősége (Savolainen *et al.*, 1995). Ennek bizonyítékeként 100 éves nádból (*Phragmites australis*) (Saltonstall, 2002, 2003), 4,000 éves tengeri fűből (Raniello és Procaccini, 2002), 3,600 éves japán cédrusból (Tani *et al.*, 2003), 200 éves borsóból (Leino *et*

al., 2009), 1500 éves búzaszemekből (Asplund *et al.*, 2010) (12. ábra), 120 éves árpából (Leino és Hagenblad, 2010) és 75 éves páfrány mintákból (Lehtonen *et al.*, 2010) izoláltak sikeresen DNS-t.

A hazai növényi archeogenetikai kutatások az 1,600 éves- (Gyulai *et al.*, 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.*, 2004a,b; Bodor *et al.* 2004)



12. ábra: A 1.500 éves búza herbáriumi leletek (Asplund *et al.*, 2010).

2.1.4 Poszt-mortem DNS degradáció

A szükséges oldatkontrollok mellett az ősdNS jelenlétére utal az a tény, hogy az ilyen DNS általában nem ad 150 bp-nál hosszabb PCR-terméket a bekövetkezett DNS-károsodások miatt (Ho *et al.*, 2007; Axelsson *et al.*, 2008; Molak és Ho, 2011). Ezek az esetek nagy részében post-mortem bekövetkező oxidatív károsodások, DNS-szál keresztkötések, száltörések, amelyek mértéke nem elsősorban a biológiai minta korától, hanem a lelet megtalálási helyének talajviszonyaitól függenek. A gyors kiszáradás, lefagyás, magas sókoncentráció késleltethetik a károsodások kialakulását, de ilyen körülmények között is megtörténik az oxidáció (Ottoni *et al.*, 2009), vagy a hidrolízis során bekövetkező DNS sérülés (Mateiu *et al.*, 2008; Rambaut *et al.*, 2009), hasonló módon degradálódik a mtDNS is (Gilbert *et al.*, 2007; Lamers *et al.*, 2009) (3.táblázat).

3. táblázat. A poszt-mortem DNS degradáció kémiai folyamatai (Ottoni *et al.*, 2009)

<i>a károsodás típusa</i>	<i>folyamat</i>	<i>A DNS-re kifejtett hatás</i>
DNS száltörések	mikrobák általi lebontás	DNS mennyiségének és méretének csökkenése
	elhalt sejtek nukleázai	
	egyéb kémiai folyamat	
Oxidatív károsodás	DNS-bázis, cukorkárosodás	Fragmentáció és nukleotid-módosulás
DNS keresztkötés	DNS-en belüli és makromolekulák közötti reakciók	Maillard-termék
Hidrolitikus	aminocsoport-vesztés	A genetikai kód megváltozása

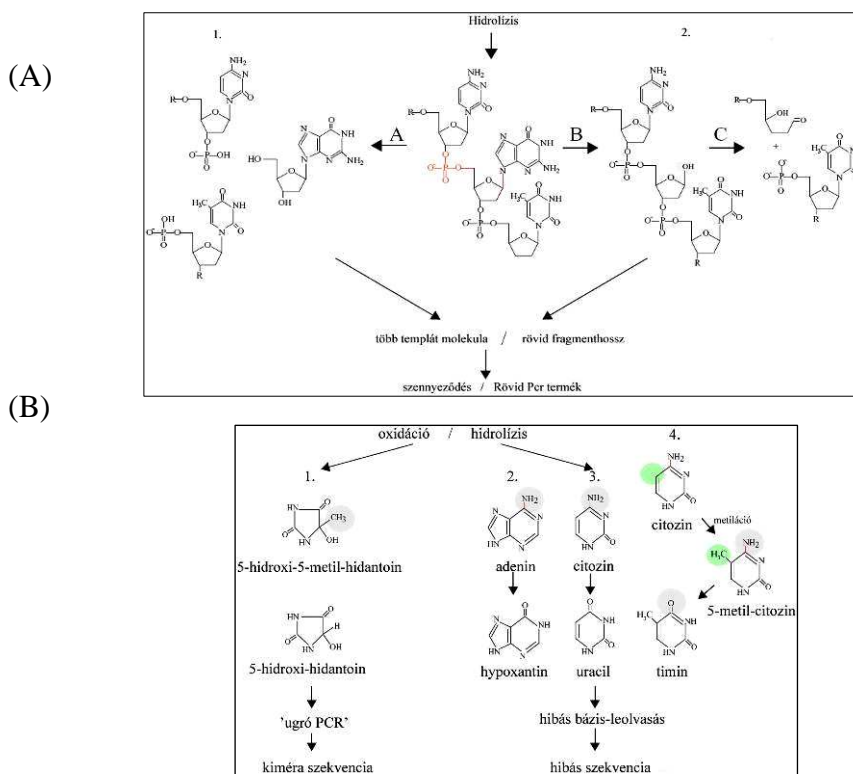
Az ősdns kutatások legfőbb problémája és hátráltatója a poszt-mortem DNS degradáció. Az aktív anyagcserével rendelkező szövetekben, sejtekben a DNS-ben bekövetkező esetleges sérülést (törés, báziscsere, stb.) a javító mechanizmusok gyorsan és nagy hatékonysággal kijavítják (Lindahl, 1993), az inaktív sejtekben (alvó, halott) azonban spontán hidrolitikus és oxidációs mechanizmusok indulhatnak el.

A sejt szerkezeti alkotói mellett maga a DNS is degradálódik a sejten belül (Eglinton és Logan, 1991), ezáltal a sejtből később nem amplifikálható DNS, illetve nagyfokú degradáltságának eredményeképp csak nagyon rövid, 100-1000 bp hosszú szakaszok szaporíthatók fel (Pääbo, 1989b; Handt *et al.*, 1994a; Hoss *et al.*, 1992, 1996b). A lizoszómákban lévő nukleáz enzimek is idővel kiszabadulnak és elbontják a DNS-t. A DNS megmaradásának szempontjából szerencsés körülmények, mint az alacsony hőmérséklet, anaerob környezet, gyors kiszáradás, magas sókoncentráció károsítják, illetve inaktíválják ezeket az enzimeket így elkerülve az enzimátikus, mikrobiális degradációt (Hoss *et al.*, 1996a; Willerslev *et al.*, 2003, 2004) Ismereteink különböző vizsgálatokból származnak: (1) DNS bomlás kontrollált laboratóriumi körülmények közötti vizsgálata (Lindahl, 1993) (Threadgold és Brown, 2003); (2) különböző fajok archeológiai mintáinak biokémiai vizsgálata (Pääbo, 1989b; Tuross, 1994); (3), a sejtalkotókban felhalmozott, és tárolt különböző katabolikus enzimek, mint a lizoszómális nukleázok az élő sejt halála után kiszabadulnak és a DNS-t az idő múlásával elbontják. A folyamat előrehaladtával a DNS elveszti sértetlenségét, felbomlik, és a nukleotid szekvencia információ elvesztése visszafordíthatatlanná válik. Azonban szerencsés körülmények között, mint pl. az élő sejtekben végbemenő változások, igaz a DNS-en lassabb, de megállíthatatlan folyamatok során megy végbe (4. táblázat).

4. táblázat. Az ősDNS degradációjának folyamatai: oxidáció, direkt- és indirekt háttérsugárzás okozta poszt-mortem kémiai változások és következményei (Hoss *et al.*, 1996b).

Sérülés típusa	Folyamat	Hatás a DNS-re	Megoldás
A cukor-foszforsav lánc törése (a foszfodiészter kötés degradációja)	Mikrobiális lebomlás Halott sejten belüli nukleáz emésztés Más kémiai változás	DNS mennyiség csökkenése Méretcsökkenés	PCR rövid szakaszokra tervezett átfedő primerekkel
Oxidatív léziók	Nukleotid bázis sérülések Dezoxi-ribóz maradványok sérülése	Nukleotid bázis fragmentáció Cukor fragmentáció Nukleotid bázis modifikáció	PCR rövid szakaszokra tervezett átfedő primerekkel Multi PCR, klónozás, és szekvenálás
DNS összekapcsolódás	A DNS összekapcsolódása más DNS, vagy egyéb biomolekulákkal Amino csoportok átalakulása:	Mailard termékek	PTB (N-fenil thiazólium-bromid)
Hidrolitikus léziók	adenin → hypoxantin citozin → uracil 5-metil-citozin → timin guanin → xantin	Kódozó képesség változása	Multi PCR, klónozás, és szekvenálás

Az oxidáció, a direkt és indirekt háttérsugárzás megváltoztatja a cukor-foszfát láncot, és elsősorban hidrolitikus folyamatokat, depurinációt, valamint deaminációt okozva károsítja, majd feldarabolja a DNS láncot (13. ábra).



13. ábra: A poszt-mortem DNS degradáció leggyakoribb kémiai folyamatai (A) hidrolízis, (B) nukleotid módosulások (Pääbo *et al.*, 1989a).

A maradványokból izolált DNS-en leggyabrabban bekövetkező változás a degradáció, amely során a DNS molekulák kisméretű, átlagosan 100-500bp nagyságú fragmentumokká töredeznek (Pääbo *et al.*, 1989a; Hofreiter *et al.*, 2001, Rizzi *et al.*, 2012)).

A méretcsökkenés közvetlen oka a halált követő enzimatikus folyamat, és a hidrolízis (Pääbo *et al.*, 1990; Lindahl, 1993). A hidrolitikus folyamatok során a nukleotidok, főleg purin (A, vagy G) és cukor bázisok között, a foszfát-cukor váz foszfo-diészter kötése felszakadnak, és a kapott egyszálú DNS-en a nyitott lánc pozíciónál sokkal könnyebben következik be törés (Lindhal, 1993). A glikozides kötések a nitrogén bázisok és a cukor váz között a hidrolízis során felbomlik, és nem-bázikus véget eredményeznek (Lindhal *et al.*, 1973, 1993; Schaaper *et al.*, 1983). A nukleotid leválásakor a nem-bázikus vég kémiai átrendeződésen mehet keresztül, ami hasonló, vagy kisebb arányban mint a báziskieséskor (Friedberg *et al.*, 1995; Shapiro, 1981) elősegíti a száltörés gyakoriságát. A folyamat során bekövetkező degradáció mértéke a megőrzés jellegétől, sajátosságától függ, és eltérő lehet még a hasonló korokból fennmaradt minták esetében. Az ilyen, és ehhez hasonló folyamat rendkívül megnehezítik az ősi DNS kivonását (Morin *et al.*, 2001), és komoly problémákat okoznak, mivel a PCR során gátolja a DNS-polimeráz működését, ezáltal az egész PCR reakciót (Hoss *et al.*, 1996b). A legfrissebb vizsgálatok azt is bizonyították, hogy a DNS-ben végbemenő sérülések nem véletlenszerűen történnek, hanem többnyire a genomban koncentráltan található 'forró pontok'-ban (hotspots) mennek végbe (Gilbert *et al.*, 2003a, 2005).

A PCR reakció során felszaporítható DNS szekvenciák méretét a száltörésen kívül különböző sérülések befolyásolják, amelyeket a háttérsugárzás és egyéb okok miatt keletkező szabadgyökök, a peroxid (O_2), a hidrogén peroxid (H_2O_2), és a hidroxil (OH) okoznak a PCR során történő szálnövekedést blokkolva. A DNS láncban az oxidatív sérülésekre hajlamosabb purinok és pirimidinek kettős kötése feldarabolódnak, és gyűrűszakadást (Lindahl *et al.*, 1993; Friedberger *et al.*, 1995), valamint magas C - T arányt eredményeznek (oxidálódva hydantoinokká alakulnak). A maradványokból izolált DNS-ből az oxidált pirimidinekre specifikus *Endonukleáz III* enzimmel (Pääbo *et al.*, 1989a) való emésztést követően sikerült szekvenciát izolálni. A paleontológiai minták nagyobb mennyiségű oxidált pirimidineket (5-hidroxi-5-metilhydantoin, és 5-hidroxihydantoin) tartalmaznak, amelyek blokkolják a Taq DNS polimerázt a PCR során, így teljesen lehetetlenné téve a DNS amplifikációt (Hoss *et al.*, 1996b). A Taq polimerázt blokkoló sérülések másik fajtája a DNS összekapcsolódása (Maillard-termékek), amely megfigyelhető az archeológiai DNS elektromikroszkópos

preparációja során (Pääbo *et al.*, 1989a). A fehérjékben és aminosavakban elsődleges aminocsoportok és cukrok közt végbemenő kondenzációs reakciók termékeit, a Maillard termékeket először az ősi fekáliákból (koprolitok) mutatták ki gázkromatográfiával, és tömegspektrometriával (Poinar *et al.*, 2001).

A Maillard termékeket N-phenacylthiazolium bromidos hasítását követően (Vasan *et al.*, 1996) sikerült az addig nem lehetséges >20,000 (Poinar *et al.*, 1996) és 40,000 (Krings *et al.*, 2000) éves mintákból DNS-t amplifikálni. Az ősi szövetekben bekövetkező fragmentáción és DNS modifikációkon kívül más ismert és ismeretlen sérülések akadályozhatják a DNS polimeráz működését. A leggyakoribb sérülések az adenin, citozin, 5-metil-citozin, és guanin aminocsoportjának hidrolitikus elvesztése, és ezáltal xantin, hypoxantin, uracil, thymin keletkezése. A deaminálódott termékek, mint az uracil (citozin), xantin (adenin), 5-metil-citozin (thymin) hibás bázispárosodást okoznak a PCR során (A helyett G, C helyett T) (Pääbo *et al.*, 1989a, Briggs *et al.*, 2009; Llamas *et al.*, 2012). Az archeológiai mintákon végzett szekvenciakutatások során, a mai mintákhoz viszonyítva nagyobb számban tapasztalhatók véletlenszerű báziscserék (Hansen *et al.*, 2001; Hofreiter *et al.*, 2001), köszönhetően a bázisok deaminálódásának. Ugyanezt támasztja alá a régi DNS minták érzékenysége a DNS-ből az uracilt eltávolító uracil-DNS-glikozidázra (Pääbo, 1989b), és a nagyszámú C→T, G→A nukleotid csere (Higuchi *et al.*, 1984). A Taq polimeráz működése során bekövetkező T→C, A→G báziscserék az adenin deaminálódásával keletkező hypoxantin által kiváltott citozin származékok beépítéséből következik (Gilbert *et al.*, 2003 a,b).

Hosszú időt követően a DNS degradáció olyan mértékben előrehaladottá válik, hogy nem marad egyetlen használható DNS fragmentum sem. Habár a fiziológiás koncentrációnak megfelelő sótartalomnál, semleges pH-n és 15 C°-on mért 4×10^{-9} /másodperces spontán depurinációs (purin bázisok elvesztése) ráta alapján a DNS csupán 100,000 év alatt degradálódna teljesen, és ez a degradáció sem lineáris (Pääbo és Wilson, 1991; Lindahl, 1993). Az extrém környezeti feltételek, köztük az alacsony hőmérséklet, kinyújthatják ezt az időkorlátot, más esetben épp az ellenkezőjét is okozhatják. Az archeológiai, és palaeontológiai fajtákból izolált DNS mennyisége rendkívül kevés, és minősége töredezettsége miatt jóval elmarad a mai fajokból izolált DNS-től. A vizsgálat rendkívül nagy körültekintést igényelnek, mint a mai és archeo minták elkülönített kezelése, az eszközök sterilizálása (UV, hipó), védőruha és maszk viselése, hogy megfelelően sterilizáljuk az egyes

munkafolyamatokat, munkaterületeket, és elkerüljük a DNS kontaminációt (Malmstrom *et al.*, 2007). A minták feltárásakor és tárolásakor könnyen előfordulhat a humán DNS kontaminációja, amely ismert és ismeretlen modifikációt eredményezhet. A mai humán mt DNS indukálta mutációt állapítottak meg a PCR során (Pusch és Bachmann, 2004), amely valószínűleg néhány a Taq polimerázt befolyásoló, és hibára hajlamossá tevő még nem ismert faktornak köszönhető.

A DNS izolálást megelőzően a legfontosabb a használható minták gyors kiválogatása és elkülönítése a DNS-t nem tartalmazó rossz megtartású frakciótól. A maradványok aminosav elemzésével, amely figyelembe veszi a mintákban fennmaradó teljes aminosav tartalmat, összetételt, és a térszerkezetében bekövetkezett változásokat, a DNS izolálás előtt megállapítható a nukleotid szekvenciák fennmaradása (Poinar *et al.*, 1996). A DNS fragmentumok amplifikálásával és szekvenálásával, vagy a pirolízissel kombinált gázkromatográfiával és tömegspektrometriával (GC/MS) alátámasztható az eredeti archeo makromolekulák megőrzése az ősi mintában. A PCR-technika felfedezésétől napjainkig, a múzeumokban kontrollált körülmények között őrzött 200 éves növények és állatok DNS szekvenciáinak vizsgálata szinte már rutinszerűnek mondható. A PCR amplifikációt megelőzően az ősi DNS molekulák mennyiségének, és a templátok számának meghatározása (Kvantifikálása; Kompetitív PCR, Real time kvantitatív PCR) elengedhetetlen a megmaradt szekvenciák minőségének meghatározásához.

Előfordulhat, hogy a reakció néhány kópiából indul ki, így az első pár ciklusban bekövetkezett hibák, melyek a DNS sérüléseiből származnak a teljes PCR termékben megtalálhatóak lesznek (Handt *et al.*, 1996; Morin *et al.*, 2001). A templát DNS alacsony száma különböző speciális kritériumokat (5. táblázat) fogalmaz meg (Pääbo, 1989b; Lindahl, 1993; Hofreiter *et al.*, 2001; Willerslev és Cooper, 2005) az archeo DNS mintákon végzett vizsgálatok során, mivel ha kevés molekulából (<1000) indul el a reakció, különböző kivonatokból több ismétléses PCR, valamint klónozás és szekvenálás szükséges (Handt *et al.*, 1996, Winters *et al.*, 2011). Az előfordulható kontamináció és az archeo DNS nukleotidsorrendjében található, vagy a PCR amplifikáció során bekövetkező bizonyos nukleotidok hibás beépítésének elkerüléséhez (Hofreiter *et al.*, 2001). Manapság rengeteg kutatás indul annak kiderítésére, hogy a rendelkezésre álló PCR technikák közül melyik a legmegfelelőbb a töredezett, degradálódott DNS mennyiség felszaporítására (Ávila-Arcos *et al.*, 2011).

5. táblázat. A régészeti DNS mintákon végzett vizsgálatok szükséges kritériumai (Hofreiter *et al.*, 2001).

1.	Igazolni kell biokémiai vizsgálatokkal (aminosav) a makromolekulák (DNS) megőrzésének, és fennmaradásának állapotát (Poinar <i>et al.</i> , 1996).
2.	Ellenőrizni kell a DNS extrakciót, és PCR amplifikációt vak kontrolokkal és legalább három ismétléssel (Pääbo <i>et al.</i> , 1990).
3.	A kiindulási templát DNS mennyiségi és minőségének meghatározása (Serre <i>et al.</i> , 2004).
4.	Amplifikáció ismétlése egy újabb izolálásból.
5.	Amplifikáció termékeinek klónozása, és különböző klónok szekvenálása, a DNS sérülésekből, vagy PCR amplifikációs hibából eredő heterogenitás kiszűrésére (Pääbo <i>et al.</i> , 1990).
6.	Negatív korreláció az amplifikáció hatékonysága és a DNS fragmentumok mérete között (Lambert <i>et al.</i> , 2002)
7.	A nucleáris mtDNS inszerciók kiszűrése (Timmis <i>et al.</i> , 2004)
8.	A laborspecifikus szennyeződések kiszűrésére más laboratóriumban meg kell ismétlni a kísérletet (Zischler <i>et al.</i> , 1995).

A PCR reakció során néhány száz (Cooper *et al.*, 1992, 2001a; Haddrath és Baker, 2001), vagy ritka esetekben akár több mint 1 kilobázis (Lambert *et al.*, 2002) amplifikálható. A DNS degradációja 1 millió év alatt (özönvíz előtti DNS; Lindahl *et al.*, 1993) meghaladja, a DNS szekvencia menthetőségének fokát. A fajok filogenetikai vizsgálatait a haploid genomban egyszer szereplő nukleáris DNS lókuszok helyett az ősi maradványokból a legnagyobb hatékonysággal a több száz kópiában jelen lévő kloroplaszt- (növényből) és mitokondrium- (növényekből, állatokból, és emberből) DNS nyerhető ki, ezért találkozhatunk legtöbbször – az organelláris DNS szekvenciákat célzó kísérletekkel. A cpDNS, mtDNS felhasználása a filogenetikai vizsgálatok során ma már teljesen elfogadott, a nem túl közeli fajok rokonsági összehasonlításakor, mert elég idő telt el az elkülönülés eseményeitől és a genom összes része hasonló törzsfajlódást mutat. Közeli fajok és populációk összehasonlításakor, főleg ha gyorsan különültek el, vagy az egyes genomrészeknek más a filogenetikája, problémát jelent, hogy az organelláris DNS mindössze egy lókusza nem tükrözi hűen a teljes genomot, így nem lehetséges a különálló lókuszok vizsgálatával filogenetikai következtetéseket levonni.

2.1.5 Maillard-reakció következményei

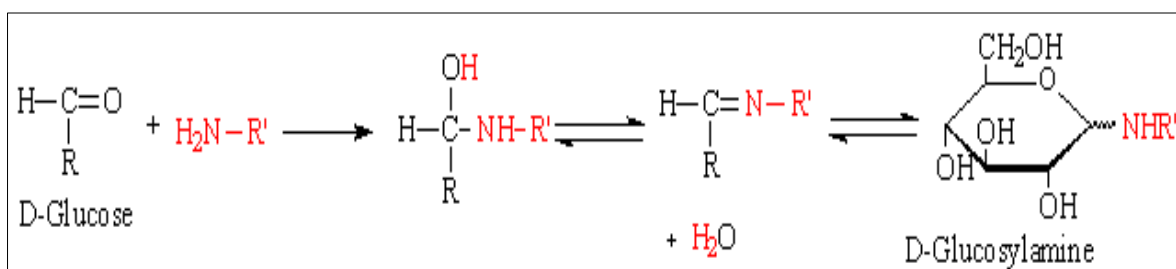
A kollagén rostok keresztkötései exponenciálisan szaporodnak a korrallal, ami még ma is igaz. A növekedés-fejlődés alatt létrejövő keresztkötések száma csak a fejlődés végéig szaporodik. Utána egy új mechanizmus jön létre, ami az élet végéig növeli a keresztkötések számát. Ezt, az akkor még nem ismert folyamatot a Maillard reakcióval lehet magyarázni. Ez a reakció magyarázza a keresztkötések növekedését.

Ez egy nem természetes, de kémiai magától értetődő reakció, egy redukáló cukor (aldehid) és egy amino csoport között, ami az Amadori átrendeződés után több, komplikált policiklikus molekulához vezet, melyeket gyűjtőnéven "Advanced glycation End Product"-nak (vagy rövidítve AGE-nek) neveznek. Több ilyen AGE felelős a kollagén és más fehérjék keresztkötésekkel való megváltoztathatóságáért.

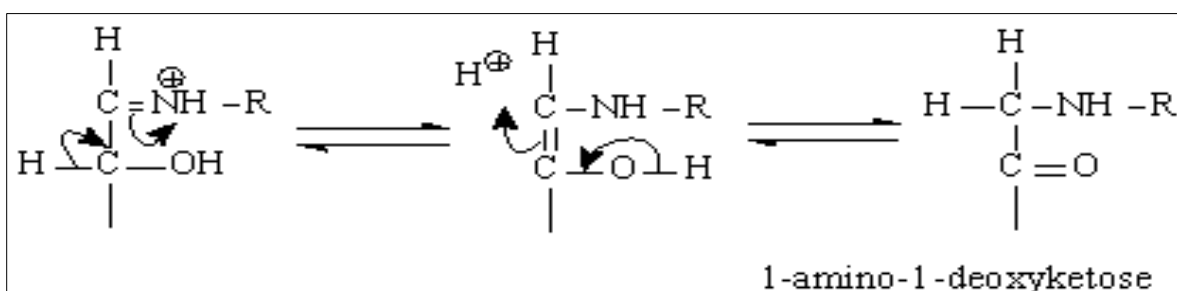
A Maillard-reakciót a francia L.C. Maillardról nevezték el, aki 1912-ben leírta a glükóz és glicin közötti reakciót. Ennek során a monoszacharidok, általánosságban pedig a redukáló szénhidrátok szabad aminocsoporttal reagálva, megfelelő körülmények között, bonyolult, többirányú reakciókból álló változáson mennek keresztül.

A folyamat során aroma komponensek és barna színű pigmentek, melanoidinek keletkeznek (Whitfield, 1992; Csapó, 2000) Az átalakulást nem enzimes barnulásnak is nevezik, a karamellizációhoz hasonló folyamat. A reakció során (14. ábra) első lépésként az aminos csoport a karbonilcsoportra addicionálódik.

(A)



(B)



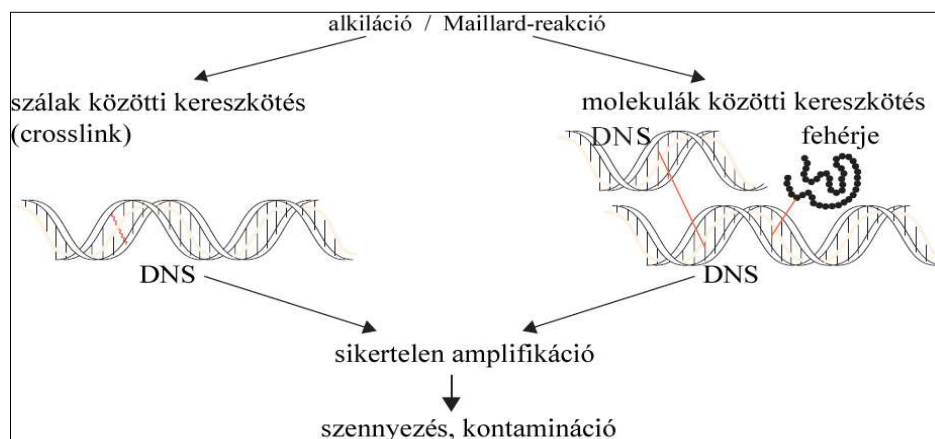
14. ábra: A Maillard reakció két (A, B) fő lépése (Whitfield, 1992; Csapó, 2000).

Következő lépésben vízkilépéssel imin, ezt követően ciklizálódással glikozil-amin képződik. Savas katalízis esetén végbemegy az „Amadori-átrendeződésként” ismert folyamat, melynek

során az aldóz típusú vegyületek 1-amino-1-dezoxi-ketózzá alakulnak, amelyet „Amadori-vegyületnek” is hívunk.

Ezek a vegyületek számos élelmiszerben, különösen a szárított gyümölcs- és zöldségfélékben, valamint a tejporban is kimutathatók. Az Amadori-vegyületek azonban csak kiindulási vegyületek a Maillard-reakcióban. A domináns reakció során aldózil-aminból 3-dezoxi-glukodiulozon keresztül hidroximetil-furfural keletkezik. A diulóz a rendszerben jelenlevő aminokkal reagál, és barna pigmentek képződnek. Egyéb átalakulások során maltol, izomaltol és különböző egyéb bomlástermékek is keletkezhetnek, továbbá az aminokkal is reakcióba léphetnek színyanyagok képződése közben. Az átalakulásnál keletkezett λ -dikarbonil-származékok további reakciósort indítanak el. Aminosavakkal reagálva lejátszódik a Strecker-féle lebontás, melynek során aldehidek és aminoketonok jelennek meg a rendszerben, melyek aromajellegű vegyületek.

A folyamat minden olyan közegben végbemegy, ahol redukáló szacharid és szabad aminocsoport jelen van. Az átalakulásokat a rendszer hőmérsékletének emelkedése rendkívül felgyorsítja. A Maillard-reakció sebessége a pH-tól is függ, a barnulási minimum pedig pH=3-5 között van (Willerslev és Cooper 2005) (15. ábra).

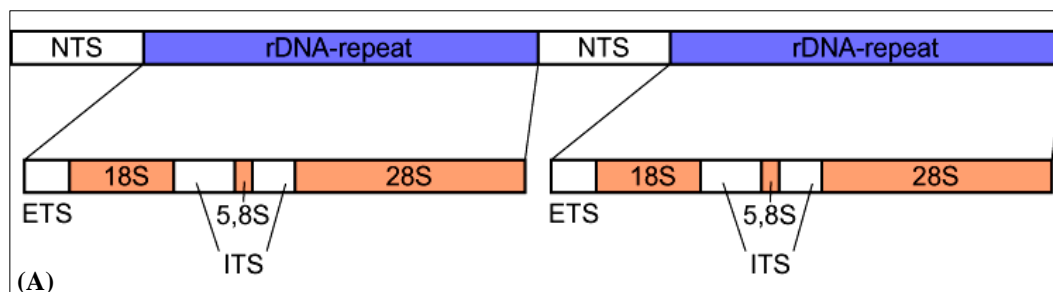


15. ábra: A DNS molekulák között kialakuló kereszkötések és amplifikációs következményei (Willerslev, Cooper 2005).

2.1.6 ITS

Az (Internal Transcribed Spacer) módszer (ITS1-5.8S-ITS2) a sejtmagban kódolt, riboszómális rRNS-t kódoló, evolúciósan rendkívül konzervatív rDNS szekvenciák elemzésére ad lehetőséget, amely a mtDNS elemzések mellett a legelfogadottabb markerrendszere az evolúció genetikának (Hsiao *et al.*, 1995; Garcia-Mas *et al.*, 2004). Az

rDNS ITS-szakaszainak citológiai elnevezése a NOR (nucleolus organizer regions), mert ezek alkotják a genom citológiai felbontásában a sejtmagvacskát (nucleolus). Nem minden kromoszómán van rDNS szakasz, pl. a humán genomban csak öt kromoszóma (a 13., 14., 15., 21. és a 22.) hordoz NOR rDNS szakaszokat (Hillis és Dixon, 1991) (16. ábra).



16. ábra: Az rDNS ITS1-5.8S-ITS2 szakaszának felépítése (Hsiao *et al.*, 1995).

Az ITS elemzés célja a sejtmagban kódolt rRNS gének riboszómális rDNS-e. Felépítése általános: a 18S, 5.8S és 28S (a növényekben 25S) egy géncsoportban íródik át a nem-kódoló szpészerekkel együtt (~ 10 kbp hosszú; 1,300 – 4,000 kópia/sejt); a növények sejtmagi 5S rDNA-e más lókuszon található. NTS (nem átíródó szpészer szekvencia - nontranscribed spacer) ETS (külső átíródó szpészer szekvencia - external transcribed spacer), ITS (belső átíródó szpészer szekvencia - internal transcribed spacer).

2.1.7 SSR

A szatellita DNS szakaszok belső szekvencia ismétlődése alapján kapta az 'egyszerű' simple sequence DNS (Walker, 1971), illetve, a mára elterjedt SSR - simple sequence repeat (Jeffreys *et al.*, 1985) elnevezést. Belső, ismétlődő szekvencia hosszúságuk alapján az egyik csoportjuk a SSR-miniszatellitek, illetve midiszatellitek, melyekben az alapszekvencia 10-15 bp hosszú, 3-4 szerez (miniszatellitek), vagy 10-100-szoros (midiszatellite) egymás után következő (tandem) ismétlődéssel (Jeffreys *et al.*, 1985). Szinoním elnevezésük: HVR - hiper variable region (Jeffreys, 1987), ahol a hipervariabilitás az egyes SSR szakaszok hosszára utal, függetlenül a belső ismétlődő szakasz (di-, tri- oligonukleotidok) szekvenciájától. A szatellitek másik csoportja a SSR-mikroszatellitek, melyekben az alapszekvencia csak 1-5 bp (mono – pentanukleotid) hosszúságú, 10-80 kópiaszámmal (tandemszám), 100 bp végső hosszúsággal (szinonim elnevezésük: SSR - simple sequence repeats, STR - hort tandem repeats, VNTR - variable number of tandem repeats, WNDR-variable number of dinucleotide repeats) (Nakamura *et al.*, 1987)

Az SSR-mikroszatellitek belső szekvenciájuk alapján tovább tagolhatók a tökéletes (perfect) SSR, pl. [ATG]₁₀; a megszakított (imperfect) SSR, pl. [AT]₁₀CACA[AT]₁₀ (ennek az elemnek kialakult egy másik szinoním elnevezése: IRS - interspersed repetitive sequence); valamint az összetett (compound) SSR, pl. [AT]₁₀[CA]₆ (Walker, 1971; Jeffreys *et al.*, 1985; Jeffreys, 1987; Nakamura *et al.*, 1987; Tóth *et al.*, 2000).

A mikroszatellitek gyakorisága eltér a növényekben és az állatokban. Korábbi adatok átlagosan 1 SSR / 10 kb DNS gyakorisággal számoltak (Tautz, 1989). A növényi genomban ötször kevesebb SSR található, 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 fordulnak elő az AT/TA és CT/GA motívumok. Ez a három dinukleotid SSR (átlag 1-6-szoros ismétlődéssel) teszi ki az össz növényi SSR-szakaszok közel 75 %-át (Lagercrantz *et al.*, 1993). Az állati genom legelterjedtebb SSR szekvenciája a GT/CA motívum, 10 - 60 tandem számmal, 50,000-100,000 kópia számban (Hamada *et al.*, 1982; Weber, 1990). A trinukleotidok közül a rizsre a [GGC]_n SSR előfordulása a jellemző n=13 tandem számmal (Zhao és Kochert, 1993).

A trinukleotid mikrosatelliták genetikai jelentősége kiemelkedik a humán orvoslásban, mert bebizonyosodott, hogy számos, igen súlyos és örökletes betegségben a defektív gének regulátor régióinak mikrosatellita ismétlődési száma összefüggésben áll a betegség tüneteinek súlyosságával, mint pl. a törékeny kromoszómájúság (Fragile-X syndrome) CCG-ripítje, a nyirokmirigy-daganat (Huntington's disease) CAG-ripítje, a skizofrénia (Schizophrenia) CAG-ripítje, az izomsorvadás (Myotonic Dystrophy) CTG-ripítje. A genom SSR szakaszainak eredete, és eltérő hossza, amely a PCR polimorfizmust eredményezi, feltehetően a DNS replikáció, illetve javítása (repair) során fellépő csúszási mutáció (slippage mutation) eredménye (Schlotterer és Tautz, 1992). Ez a mechanizmus eltér a miniszatellitek variabilitásának feltételezhető okától, amelynek eredményeként a váltakozó purin/pirimidin bázisok, mint pl. a [GT]_n és a [GC]_n, a DNS Z-alakú térszerkezetének kialakítását eredményezi (Z-DNS), továbbá a génregulációban és a kromoszóma kondenzációjában játszhat szerepet (Lagercrantz *et al.*, 1993).

Az SSR-fingerprinten a DNS-sávok elhelyezkedése arányos az SSR szakasz hosszával (hányszor ismétlődik benne az alapszekvencia). Természetesen egy hosszabb SSR-ról hosszabb PCR másolat készül, ez pedig az elválasztó gélen egy nagyobb molekulatömegű sávot eredményez. A kapott sávok száma egyértelműen a genomban levő, az alkalmazott primerrel komplementer SSR szakaszok számának függvénye (Zhao és Kochert, 1993). Az egyes sávok intenzitása (az egyes sávokban futó DNS mennyisége) pedig az azonos hosszúságú és azonos alapszekvenciájú SSR szakaszok számának, illetve az ezekről PCR-ezett DNS mennyiségének az eredménye. (Elméletileg a komigráció, a különböző bázis összetételű, de az agaróz gélben együtt haladó DNS szakaszok együtthaladásának lehetősége nem kizárt, amit szekvenálással szükséges igazolni). Mindezek mellett alapvető feltétel, amely a PCR-módszer adottsága, hogy a primer kötő helyekről (a genom SSR szakaszai) csak akkor készíthető PCR reakció ha ezek min/max 50-2,000 bp távolságban vannak egymástól (Queller *et al.*, 1993; Goldstein *et al.*, 1995; Blouin *et al.*, 1996; Jarne és Lagoda, 1996; Griffiths *et al.*, 1996; Dakin és Avise, 2004; Turnpenny és Ellard, 2005).

2.1.8 cpDNS













A görögdinnyében szigorúan anyai öröklődésű citoplazmás kloroplasztisz gének legbiztosabb genetikai markerei a mikro/evolúciós kutatásoknak, melyek segítségével több millió évre visszavezethető ősi anyai vonalak adhatók meg (Dane *et al.*, 2004). A mikro/evolúció szubsztitúciós órájára (rátájára) nincs egységes adat. A számított szubsztitúció/év adatok eltérnek a különböző vizsgálatokban: az $1,3 \times 10^{-8}$ nt / év (Ma és Bennetzen, 2004), az $1,5 \times 10^{-8}$ nt / év (Koch *et al.*, 2000), és a $6,5 \times 10^{-9}$ nt / év (Gaut *et al.*, 1996) értékekkel, sejtmagi DNS evolúciós mutációs rátára vonatkozóan. A cpDNS mutációs órája, azonban lassabban jár mint a sejtmagi szekvenciáké (Dane *et al.*, 2004), mégis a sejtmagi adatok támpontot, viszonyítási alapot nyújtanak (Wicker és Keller, 2007), figyelembe véve a zárwatermő növények átlagos kloroplasztisz méretét ($120-217 \times 10^3$ bp) (Palmer, 1985).

Mindezek alapján átlagban 1 Mrd (10^9) év alatt mehet végben egy szubsztitúció a cp illetve sejtmagi genomban. Ez az érték, azonban nagyságrendekkel felgyorsul a nemesítés, illetve szelekció során (mikroevolúció). Amennyiben az esetünkben vizsgált *clp-12* lókuszon kimutatott szubsztitúciók nem csak egy polimorf SNP a kloroplasztisz genomban (ld. az uborka és a dohány cpDNS szekvencia különbségeket; amelyek természetesen szintén alkalmasak evolúciós távolság elemzésekre), a mai *Citrullus* fajták, illetve a régészeti leletek

eltérő citotípus vonalakat mutatnak (a mintaszám növelésével lehetőség nyílik a teljes hazai citotípus vonalak meghatározására is) (Tóth, Gyulai *et al.*, 2007a).

2.1.9 *Lcyb* színgén

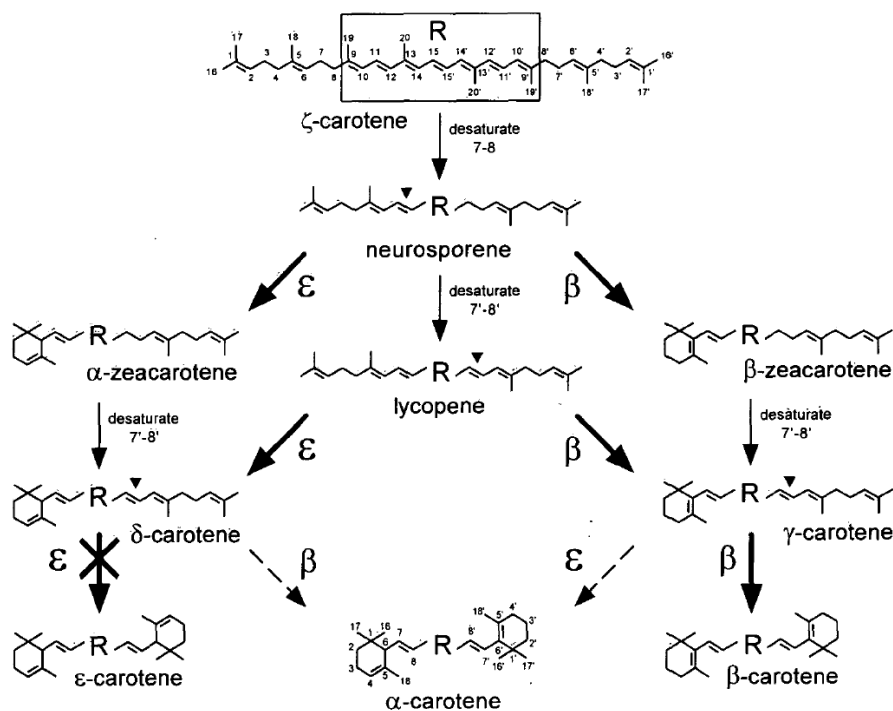
A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) számos különböző karotinoidot tartalmaz melyek a különböző hússzín (lazac sárga, narancs, kanári sárga és vörös) kialakításában vesznek részt. Napjainkra már ismert, hogy a színöröklés egy komplex folyamat, melyben számos gén befolyásolja a gyümölcshús színének kialakulását. A dinnye esetében is számos gén vesz részt a gyümölcsszín kialakításában (Poole, 1944). Tanulmányok rávilágítottak arra, hogy számos gén áll kapcsolatban a szín kialakulással, melyek közül némelyik az episztázison alapszik (17. ábra). A vörös (*Y*) dominál a narancs (*y^o*) és lazac sárga színek felett (Henderson, 1998), míg a narancs (*y^o*) dominál a lazac sárga (*y*) szín felett, továbbá a kanári sárga (*C*) dominál a vörös szín felett (Poole, 1944). Továbbá kiderült, hogy a *C* és *Y* lokuszok kölcsönhatásban vannak egymással mégpedig úgy, hogy a *C* gátlódik, abban az esetben ha *Y* homozigóta recesszív formában van jelen, ez vörös színt eredményez függetlenül attól, hogy a *C* allél milyen formában van (Kanda, 1951; Henderson, 1998).

DOM.	rec.		P ₁	x	P ₂	F ₁	F ₂
Narancs	sárga		narancs	x	sárga	narancs	3 narancs : 1 sárga
<i>y^oy^o</i>	<i>yy</i>						
Sárga	vörös		sárga	x	vörös	sárga	3 sárga : 1 vörös
<i>yy</i>	<i>rr</i>						
Narancs	vörös		narancs	x	vörös	narancs	9 narancs : 3 sárga : 4 vörös
<i>y^oy^o</i>	<i>rr</i>						

17. ábra: Görögdinnye (*Citrullus lanatus*) hússzínének öröklődése (Henderson, 1998).

Paradicsom (*Lycopersicon lycopersicon*) színmutációja és karotin bioszintézise esetén figyelték meg a szintetikus folyamatokat, azonban görögdinnye esetén még nem alkalmazták ezen géneket a gyümölcsszín vizsgálatában. Két likopin cikláz a *lycopin* β -cikláz (*LCYB*) és a *lycopin* ε -cikláz (*LYCE*) ismert, amelyek a lycopin-t β illetve α -karotinná alakítják át (18. ábra). A *Lycopin* β -cikláznak két formáját találták már meg paradicsomban, az egyik az *LCYB* a másik pedig a kromoplaszt-specifikus *lycopin* β -cikláz (*CYCB*)

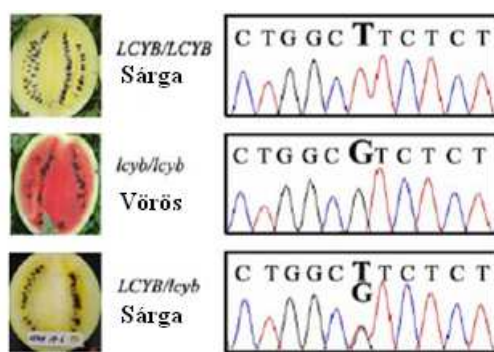
(Armstrong *et al.*, 1996). Narancsszínű paradicsom mutánsok a *Delta* és *Béta lycopin cikláz* géneknek köszönhetően alakultak ki (Ronen *et al.*, 1999, 2000). *Béta* mutációt a *CYCB* upregulációja okozza, amely esetében a mutánsban felhalmozódik a β -karotin, míg a *Delta* mutánsban az *LYCE* upregulációja figyelhető meg melynek a következménye a δ -karotin felhalmozódás. *Old-gold* (*og*) egy recesszív mutáció, mely során likopin halmozódik fel egy kereteltolódásos mutáció (frameshift) következtében a *CYCB* génben, amely egy végtermék visszaható gátlás hatást idéz elő a karotinoid szintézisben az *og* mutánsokban. (Bramley, 2002). Ennek a végterméknek a hiánya, mint például a β -karotin hiánya *og*-ben, növelheti az enzim aktivitást a korai szintetikus folyamatokban, ezáltal likopin akkumulációt eredményezve. A mai napig nem bizonyított, hogy vajon a paradicsom karotinoid keletkezés regulációjában részt vesz-e az *LCYB* gén. Az ortológ gének, mint az *r*, *t*, *B* és *og* paradicsom mutánsok jelen vannak, amelyek a görögdinnye gyümölcszín kialakulásban valószínűsíthetőleg szintén részt vesznek (Tadmor *et al.*, 2004). Mindegyik paradicsom mutáns egy specifikus gén mutációjára vezethető vissza: *phytoene synthase1* (*PSY1*) az *r* esetében, *karotinoid izomeráz* (*CRTISO*) a *t* esetében, és *CYCB* a *B* és az *og* esetében.



18. ábra: A karotenoidok bioszintézisének enzimatisms folyamatai (Cunningham *et al.*, 1996).

A görögdinnye karotinoid bioszintézise más növényfajoknál már megfigyelt karotinoid bioszintézis útvonalakon alapszik (Giuliano *et al.*, 2000; Hirschberg, 2001; Isaacson *et al.*, 2002, 2004). Mivel a kanári sárga szín dominál a vörös felett (Poole, 1944), valószínűleg a

korai enzimatikus folyamatoknál a *fitoén szintáz (PSY)*, a *ζ-karotin deszaturázon (ZDS)* és a *karotin izomeráz (CRTISO)*, mind a kanári sárga mind a vörös színek esetén normálisan aktív állapotban van a likopin felhalmozódás folyamataiban. Egyébként ez a fő karotinoid forma a vörös típusokban. Ebből következik, hogy egy vörös és kanári sárga szín meghatározására alkalmazandó jelölt gén esetében a gén közvetlen downstream irányban lenne megtalálható a likopin szintézis útvonalon. Az *LCYB* vagy *CYCB* felelős lehet a szín kialakulásért a kanári sárga és vörös gyümölcshús színek között. A molekuláris markerek kifejezetten alkalmasak az allélszelekciókhoz. A CAPS markerek kodominánsak, ezek alapján heterozigóta egyedek között is alkalmasak a különbözőségek felderítésére, ezáltal hasznosak a nemesítési programokban. Az esetünkben a kanári sárga és vörös görögdinnye gyümölcshús színek elkülönítés kiváló eszközei (19. ábra) (Bang *et al.*, 2007).

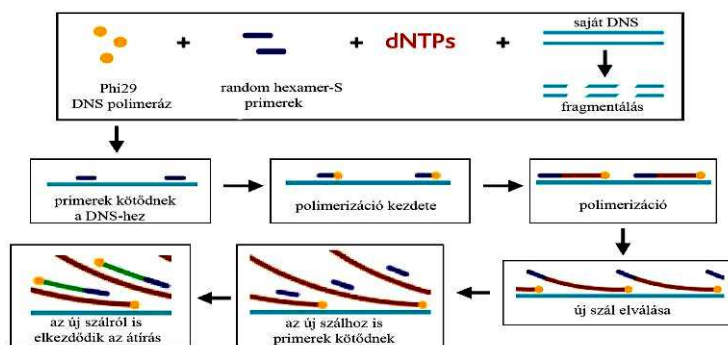


19. ábra: A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) sárga/vörös hússzínért felelős *LCYB/lyc* (likopin-szintáz) gén allélspecifikus nukleotid szubsztitúciói (Bang *et al.*, 2007).

2.1.10 WGA

WGA (Whole Genome Amplification) (GenomePlex WGA2, Sigma), teljes genom felszaporítás: Az archeológiai mintákból történő izolálás során korlátozott mennyiségű és töredezett DNS nyerhető ki, ezért a régészeti magvakból izolált DNS törzsekből WGA- teljes genom felszaporítást végeztünk. Amely módszerrel adott ng kiindulási DNS-ből kb. tízszeres ng mennyiségű terméket szaporíthatunk fel. (Kittler *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2004). A WGA módszer alkalmas csekély mennyiségű DNS-forrásból való felszaporításra, anélkül, hogy a felszaporított mintában bármilyen szekvenciaváltozás történne. (Sun *et al.*, 2005). Az eljárásnak jelenleg két változata van alkalmazásban: egymás után több PCR-reakciót magában foglaló eljárás, valamint egy izotermikus felszaporítás. Az amplifikáció random hexamer primerekkel történik, ezekhez adaptor szekvenciák ligálódnak és így kapcsolódnak a genomi DNS-hez. Az izotermikus felszaporítás alapja az azonos hőmérsékleten végbemenő többszörös szál-denaturálás (MSD, multiple strand displacement vagy MDA, multiple

displacement amplification) a nagy hatékonyságú és pontosságú DNS polimeráz enzim segítségével (Dean *et al.*, 2002) (20. ábra).



20. ábra: A *Phi29* fág DNS-polimeráz segítségével végezhető izotermikus DNS felszaporítás lépései (*Sigma*).

2.2 A görögdinnye genetikai jellemzése

2.2.1 A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) rendszertani besorolása, fajtátípusai

A görögdinnye (*Citrullus lanatus*; $2n = 2x = 22$; 4.25 - 4.54 x 10⁸ bp; 0.42 pg DNS) (Kihara, 1951; Arumuganathan és Erle, 1991) a rendkívül monotipikus *Citrullus* nemzetség tagja, melybe mindössze négy faj tartozik: a görögdinnye (*Citrullus lanatus*), és két alfaja a valódi görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*) és a takarmánydinnye (*Citrullus lanatus citroides*); valamint három vadfaj: a sártök (*Citrullus colocynthis*), a *Citrullus ecirrhosus*, és az alig 30 éve leírt új faj a *Citrullus rehmi* (De Winter, 1990) (21. ábra).

Plantae (Növények országa)

Tracheobionta (Edényes növények)

Spermatophyta (Magvas növények)

Magnoliophyta (Virágos növények)

Magnoliopsida (Kétszikűek osztálya)

Dilleniidae (alosztály)

Violales (rend)

Cucurbitaceae (Uborkafélék családja)

Citrullus (dinnyefélék nemzetsége)

Lanatus (alnemzetség, szekció, sorozat)

Citrullus lanatus L. (faj)

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 (Maggs-Kölling *et al.*, 2000; Levi *et al.*, 2001; Sain *et al.*, 2002; Bisognin, 2002).

A *Citrullus* nemzetség jelenleg négy fajjal számol, amelyeket a botanikai irodalom ismer: *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis*, *Citrullus ecirrhosus*, *Citrullus* *Citrullus naudinianus*. Közülük sokalakúnak mutatkozik a *Citrullus lanatus*, amely nem csak vadon növény, hanem termesztett forma is. Ezt a fajt 3 alfajra osztották:

- *subs. lanatus*
- *subs. vulgaris* (Schrad.) Fursa
- *subs. mucosospermus* Fursa

A három alfaj közül a *mucosospermus* (nyálkásmagvú dinnye) a botanikai irodalomban is újnak számított. Ez az alfaj Nyugat-Afrikában őshonos. Termése kemény, fehér, íztelen vagy keserű, ehetetlen. Ez az „egusi melon”. Magja apró vagy nagy (0,5-2,0 cm), sok fehérjét (30%), és olajat (60%) tartalmaz. Nemesítésben nagy lehetőséget jelent ennek az alfajnak a használata, elsősorban apaként. A dinnyék két csoportra oszthatók, mégpedig étkezési (*var. lanatus*, *var. capensis*) és takarmánydinnyékre (*var. citroides*), szőrözöttekre és nem szőrözött felületűekre.

2.2.2 A görögdinnye jellemzése

Formája gömbölyű vagy hosszúkás, héjának színe sötétzöld vagy világos zöld csíkos, húsának színe piros vagy sárga. Erős, fejlett főgyökere, a sárgadinnyéénél erőteljesebb és mélyebbre hatoló gyökérzetének nagy része a talaj felső 20–25 cm-es rétegében helyezkedik el.

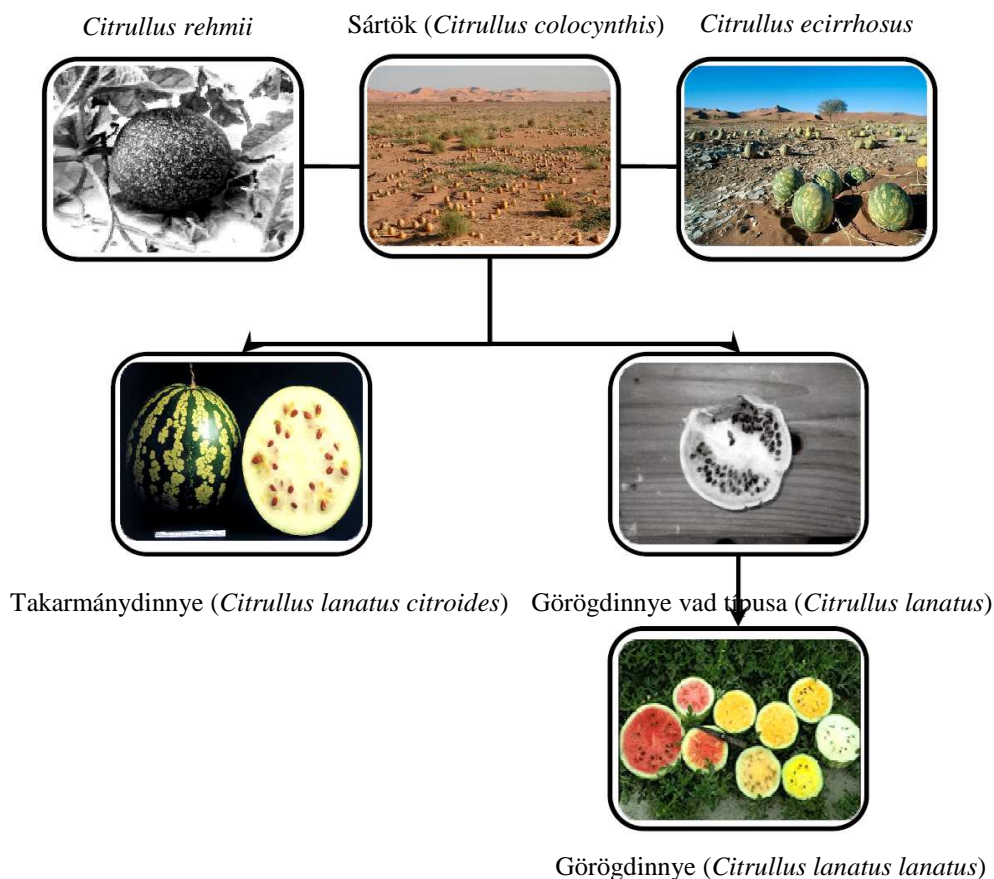
Hajtásrendszere a növekedési típustól függően változó. Megkülönböztetünk hosszú, közepes és rövid hajtásokat fejlesztő csoportokat. A hajtást 1 m-ig rövidnek, 1,1–1,5 m között közepesnek, 1,6–2,0 m-ig nagynak, 2,1 m felett igen nagynak mondjuk. Egy-egy növényen 3–7 db hajtás is kifejlődhet. A szár lehet ritkán és sűrűn szőrözött. Az étkezési fajták hajtáscsúcsa kevésbé, a takarmánydinnyéké erősen szőrözött. Erről is megkülönböztethetőek. A kacsok lehetnek elágazás nélküliek, 2–3 irányban elágazódóak.

A levelek 5–10 cm-es levélnyélen ülnek. A levéllemez gyengén vagy erősebben szeldelt, többszörösen tagolt. A levél (a legnagyobb átmérőnél mérve) 12 cm-ig kicsi, 13–18 cm-ig közepes, 19 cm-től nagy. Színe zöld, sötétzöld, ezüstös zöld. A lemez felületét viaszréteg borítja. A virágok kicsik, zöldessárgák. A három virágtípus: hím, hímnős, nő itt is megtalálható. A termesztett fajták zöme monoikus, andromonoikus virágzáshabitusú. A termős virágok zöme idegenmegtermékenyülő. A termékenyítést méhek és rovarok végzik.

A termés alakja igen változatos, a gömbtől, a megnyúlt gömbtől a megnyúlt hengeres formáig változik. Egy-egy termés tömege 2–15 kg. A héj színe fehéres, világoszöld, közép zöld, kékeszöld, feketés zöld lehet. Felülete sima vagy enyhén barázdált, rajzolata lehet csíkozott, márványozott. A héja 1–2 cm vastag. A hús színe fehér, sárga, citromsárga, sötétebb sárga, világos rózsaszínű, rózsaszínű, piros, vérvörös (a fehér és a sárga színűek elsősorban takarmánydinnyék).

A belső húsos ehető rész a placentából fejlődik, eltérően a sárgadinnyétől, melynek a perikarpium alkotja a terméshúsát. A magok a perikarpiumban elszórtan helyezkednek el. A mag mérete 0,5–2,0 cm között változik. Színe fehér, krémszínű, barnás, szürke, fekete stb. lehet. Egy-egy növényben 300–600 db mag található. Csírázókéességét 6–8 évig megtartja. Ezermagtömege: 20–150 g.

A nagyfokú morfológiai variabilitását a héj-, a hús-, és a mag színe és formája adja. Termesztésbe vonása i.e. 2000 évvel ezelőtt kezdődhetett, ahogy ezt a magleletek igazolják (Zhang és Jiang, 1990). Európában csak a középkor hajnalán vált ismertté török közvetítéssel.



21. ábra: A monotipikus *Citrullus* nemzetség fajai és alfajai.

2.2.3 A görögdinnye (*Citrullus lanatus*) domesztikációja és mikroevolúciója

A *Citrullus* nemzetség géncentruma egyértelműen a trópusi Afrika, az Abesszín övezetben, mivel itt összpontosul a legnagyobb fajtaváltozatosság, egy feltételezett másodlagos géncentrummal Belső-Ázsiában és Indiában található (ld. közeli *Praecitrullus* nemzetséget) (Vavilov, 1951). A kevés *Citrullus* fajszám ellenére, a görögdinnye rendkívüli morfológiai variabilitást mutat a termés héj-, hús-, magszín (Meszter, 2006) és forma tekintetében.

Termesztésbe vonása 4,000 évvel ezelőtt kezdődhetett (i.e. 2000 körül) (Zhang és Jiang, 1990). Európában csak a középkorban terjedt el Mór közvetítéssel az Ibériai félsziget felől (Al Awwam, 1158), illetve egy feltételezett keleti közvetítéssel a hazatérő Keresztes hadak nyomán (Fischer, 1929). Ld. a Keresztes hadjáratokat: 1. (1095-1099) Godefroy de Bouillon, Francia lovag vezetésével, aki megalapítja a Jeruzsálemi királyságot; 2. (1147-1149) VII. Lajos francia király, és III. Conrad német fejedelem vezetésével; 3. (1187-1192) II. Filip francia-, I. Richard (az Oroszlánszívű) angol-, és I. Frederik német-római uralkodó vezetésével. 4. (1199-1204) I. Imre (1174-1204) Árpád házi király részvételével; 5. (1217–

1221) II. Endre (1177-1235) Árpád házi király és VI. Leopold Ausztria királya vezetésével; 6. (1228–1229); 7. (1248–1254) és 8. (1270) IX. Lajos francia király vezetésével; és 9. (1271–1272) utolsó nagy Keresztes hadjárat, Edward angol herceg vezetésével.

2.2.4 Régészeti és kultúrleletek

A legősibb (6,000 éves) görögdinnye maglelet az afrikai sivatagi ásatásokból került elő (Libia) egy i.e. 4000-ből származó település feltárásánál (Barakat, 1990). Ezer évvel fiatalabb (5,000 éves) lelet került elő Egyiptomból egy Neolit-kori (i.e. 3000) település (Helwan) ásatásai során (Wasylikowa *et al.*, 1995; Wasylikowa és Veen, 2004) (22. ábra).

Az egyiptomi (fáraó kori) civilizáció leletei képezik a következő állomást a görögdinnye régészeti leleteiben, amelynek legjelentősebb eleme egy ugyancsak közel 5,000 éves sírkamra festmény (i.e. 3100 – 2100) az első görögdinnye ábrázolással. Ezen a falfestményen egy csíkos mintázatú, hosszúkás (és nem gömbölyű!) görögdinnye látható (Manniche, 1989; Janick *et al.*, 2007). Az első nagy mennyiségű, piramisokból feltárt maglelet 3,500 éves (i.e. 1550) (Warid, 1995), mivel azokban az időkben a temetkezés során nagy mennyiségű görögdinnyével látták el a halott fáraót a túlvilági életére. A híres Tutanhamon (i.e. 1341 – 1323) piramis (i.e. 1323) feltárása (Carter és Mace, 1977), és a további sírleletek számos görögdinnye magleletet hoztak felszínre (Vartavan, 1990, 1993; Vartavan és Amorós, 1997). Közel 3,000 éve festették a bibliai Salamon király első templomát (i.e. 960 – i.e. 586) díszítő sártököket (*Citrullus colocynthis*) (Biblia, I. Királyok 6:18).

A római kor legjelentősebb természettudományi műve a 37 kötetes (mai értelemben füzet) műve a *Naturalis Historiae* (*Historia Naturae*) (Plinius 23-79), melynek XX. kötete tárgyalja a görögdinnyét *Colocynthis* néven. Plinius említ már egy termesztett *Colocynthis*-t (a mai görögdinnyét) és vad *Colocynthis*-t (a mai sártököt, *Citrullus colocynthis*), sőt megemlíti, hogy a világos színű 'dinnye' jobb, mint a sötétzöld színű! („*Colocynthis vocatur alia, ipsa plena semine, sed minor quam sativa. Utilior pallida quam herbacea. Arefacta per se inanit alvum. infusa quoque clysteribus intestinorum omnibus vitiis medetur et renium et lumborum et paralyisi. eiecto semine aqua mulsa in ea decoquitur ad dimidias; sic tutissimo infunduntur oboli quattuor*” Gaius Plinius Secundus: *Natural History, Book XX.*) (Gilmore, 1919; Blake, 1981). Ugyancsak az első századból származik Dioscorides Kodexe, és ennek közel 400

növény színes festményét ábrázoló második kiadása (512), amelyben a sártök (*Citrullus colocynthis*) szerepel (valószínű, hogy a gyógyhatása miatt).



22. ábra: Ősi *Citrullus* magleletek: (1) 6,000 éves sártök magja, Egyiptom (Barakat, 1990); (2) 5,000 éves, görögdinnye mag, Libia, és (3) sártök (*colocynthis*) maglelete (Wasylikowa és Veen, 2004); (Tóth *et al.*, 2007b).

Az első herbáriumi préselt görögdinnye növény Bauhin gyűjteményéből maradt meg (Bauhin, 1623) (ld. Mark Spencer, The Natural History Museum, London szíves pdf. képét). Bauhin (1560 -1624) híres botanikai könyvében (*Pinax Theatri Botanici*), melyben már alkalmazza a kétnevű (binomiális) elnevezést (130 évvel megelőzve Linnét). A görögdinnyét *Anguira citrullus*-nak írja le. Linné (Linnaeus, 1753) a görögdinnyét a tök nemzetségbe (*Cucurbita citrullus*), a sártököt az uborkához (*Cucumis colocynthis*) sorolta. (Linné herbáriumában sajnos nem maradt fenn a görögdinnye). Linné tanítványa Thunberg (1794) a *Momordica* nemzetségbe sorolta a görögdinnyét (*Momordica lanata*) (Hanelt, 2001). A ma is használt teljes rendszertani besorolás: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai var. *Lanatus* (1916) Ninzo Matsumura (1856) és Takenoshin Nakai (1882-1952) rendszerét követi (Hanelt, 2001).

A nagyszámú magyarországi középkori magleletek szerint (Hartyányi és Nováki, 1975) a görögdinnye (*Citrullus lanatus*) és a sárgadinnye (*Cucumis melo*) különösen kedvelt konyhakerti növények voltak (Gyulai *et al.*, 2006; Tóth, Gyulai *et al.*, 2007a). A dinnye név legkorábbi magyarországi előfordulása egy 11. századi oklevélben található: „predium quad vocatur dinna” (Szamota és Zolnai, 1902-1906), habár ekkor még nem különböztették meg az uborkát a sárgadinnyétől. A 15. század elején íródott Besztercei-szószedet említi először név szerint a görögdinnyét: „gereg dyne”. Szikszai Fabriczius Balázs *Nomenclaturájában* (1590) is így szerepel. Igen jelentős volt a dinnyetermesztés a középkori magyar királyság területén,

Lippai János (1664) talán erre utal, amikor megemlíti, hogy I. Albert királyunk 1439-ben a mértéktelen dinnyefogyasztásban lelte halálát. A középkori Magyarországon termesztett görögdinnyék többnyire sárgabelűek lehettek egészen a 18. századig (Gyulai F. vizsgálati eredménye), a pirosbelű fajták csak a törökkel való találkozás után kezdtek terjedni. Itáliában viszont, a piros belű fajták már a 16. században közkedveltek lehettek, ahogy ezt Caravaggio (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 (Janick, 2006; Maynard *et al.*, 2007). A legkorábbi európai görögdinnye ábrázolás (1515-1518) Rómában található (a Villa Farnesina palota freskói), melyet Giovanni da Udina festetett (Paris *et al.*, 2006).

2.2.5 A görögdinnye hazai nemesítése

Magyarországon kiváló dinnyetermő helyek találhatók Heves megyében ami történelmileg a legrégebbi termesztő körzet. Az elmúlt évszázadban a hevesi termőtáj gyakorolta a hazai dinnyetermesztésre a legnagyobb hatást. Ezen terület görögdinnye termesztése a meghatározó, ezen belül is híresen finom a vékony héjú, csányi dinnye. Az innen származó gyümölcsök a Mátra vulkanikus hordaléktalajának köszönhetik egyéni zamatukat. A hevesi dinnyefajták a fekete héjú Szigetcsépi és a csíkos héjú Crimson. Évszázadokkal ezelőtt kialakult a sajátos magyar igény a kiváló minőségű, vékony héjú, vérvörös hússzínű, apró magvú fajták iránt (6.táblázat). Korábban a nagy termésű fajták (Hevesi, Csányi, Marsowszky stb.) voltak divatosak. Az 1960-as évektől a kisebb terméseket fejlesztő fajtatípusok kerültek előtérbe (Szigetcsépi 51 F1, Hevesi FUTÓ F1 stb.) A jelenleg termesztésben lévő fajták választéka általában megfelel a különböző termesztéstechnológiai változatok diktálta igényeknek. Hiányoznak az egészen kis testű (1–2 kg/db), hajtatható fajták. Magyarországon több jelentős termőtájat tartanak számon, ilyenek például Hevesi- jázsági a legfontosabb, a Kecskemét-nagykőrösi; az Észak- pesti, a Miskolci, a Békés- csanádi, a Szentesi, a Makói és a Mezőföldi körzet csak a helyi piacok ellátását szolgálja. A hazai nemesítő munka az 1800-as évek közepén kezdődött Szontágh életteni és utódvizsgálatokon alapuló nemesítési módszereivel. 1808-tól több kiváló mű jelent meg a görögdinnyéről. Foglalkozott vele Bél Mátyás (1724), Pethe (1808), Szontágh (1853), aki megírta a Dinnyetermesztést. Katona (1860) a Dinnyészet című, Girokuti (1975). A dinnye termelése melegágyában s a szabadban című könyve sokat segített a magyar termesztőknek. Jelentős a Magyar dinnyenemesítők névsora: Barna Béla (1931-1979) (ld. Szigetcsépi 51 F1 görögdinnye hibrid, amely világviszonylatban is

kiemelkedő sikereket ért el), Mozsár Kálmán, Bársony Cs, Bisztray György, Nagy József (Ajtay *et al.*, 1981; Barna és Koleda 1971; Bársony *et al.*, 1995; Bársony és Bisztray 1996; Bisztray *et al.*, 1976; Bisztray 2000a,b; Nagy 2003 a,b).

6. táblázat: Magyarországon termesztett jelentős görögdinnye fajták és jellemző tulajdonságai (ABI, Tápiószele)

<i>Fajtanév</i>	<i>Növekedési típusa</i>	<i>Virágzás habitusa</i>	<i>Tenyészedő</i>	<i>Termés alakja</i>	<i>Hússzíne</i>	<i>Tömege (kg)</i>	<i>Termelési mód</i>
Korai kincs	középerős	monoikus + andromonoikus	rövid	gömb	piros	3–4	szabadföldi
Sugár Baby	gyenge	monoikus	rövid	gömb	sötét rózsaszín	3–4	korai szabadföldi
Szigetcsépi 51 F1	középerős	monoikus + andromonoikus	középkorai	nyújtott gömb	vérvörös	4–6	szabadföldi
Hevesi FUTO F1	középerős	monoikus	középkorai	tojásdad	sötétpiros	4–6	szabadföldi
Gömb FUTO F1	középerős	andromonoikus	középkorai	gömbölyű	élénkpiros	3–5	szabadföldi
Kecskeméti vöröshúsú	középerős	monoikus	középkorai	gömb	vérvörös	3–5	szabadföldi
Sárgahúsú (Szentesi)	középerős	monoikus	középhosszú	kissé megnyúlt gömb	világossárga	3–5	szabadföldi
Marsowszky	erős	monoikus	hosszú	megnyúlt gömb	piros	8–12	szabadföldi
Hevesi (Csányi)	erős	monoikus	hosszú	megnyúlt gömb	vérvörös	8–10	szabadföldi
Crimson S.	középerős, erős	monoikus + andromonoikus	hosszú	megnyúlt gömb	pirosas rózsaszín	6–8	szabadföldi
Charleston–H	erős	andromonoikus	hosszú	ovális	rózsaszín	6–8	szabadföldi
Hungaria–8	középerős	monoikus	rövid	gömb	élénkpiros	3–4	szabadföldi
Napsugár	középerős	monoikus	középérésű	gömb	sárga	4–5	szabadföldi
Orosházi F1	erős	monoikus + andromonoikus	rövid	tojásdad	sötétrózsaszín	6–7	szabadföldi
Ideál	középerős	andromonoikus	középérésű	megnyúlt	középrózsaszín	5–6	szabadföldi
Favorit F1	középerős	monoikus	középkorai	gömb	élénkpiros	5–6	szabadföldi
Kobalt F1	erős	monoikus	középkorai	ovális gömb	élénkpiros	5–6	szabadföldi

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A régészeti növényanyag

A 13. századi debreceni *Citrullus* lelet, a volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak növényanyaga (Gyulai F. anyaga). 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 un. 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, Tápíószele) DNS-izolálást végeztünk.

3.1.1 Magbiológiai meghatározás

A magbiológiai meghatározást számítógépes képanalizáló szoftver segítségével (a tápíószelei 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, hajszálak, 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 szakcikk alapján azonban nem minden darab volt azonosítható biztonsággal. Ezért azokat minden esetben recens mag- és termésgyűjteményben található összehasonlítható anyaggal vetettük egybe.

3.1.2 In vitro inkubáció

Az ép régészeti magvak felületi fertőtlenítését követően (HgCl₂, 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, 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 Lízis 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).

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 (7. táblázat).

3.2.1 Morfológiai vizsgálatok

A mai fajták morfológiai felvételezését 24 fenotípusos bélyeg (Agrobotanikai Központ, Tápiószele) alapján végeztük el (8, 9. táblázat), 3 kisparcellás kísérletben ismétléssel.

7. táblázat. 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).

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

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 40 cm széles művelő úttal, melyről a növényvédelmi munkákat végezték.

8. táblázat. A mai *Citrullus* minták morfológiai jellemzéséhez alkalmazott 24 fenotípusos bélyeg (OMMI és ABI Tápiószele).

<p>1. Növény - fejlődési erély 3 gyenge 5 közepes 7 erős</p> <p>2. Szár - főinda hossza 1 nagyon rövid 3 rövid 5 közepes 7 hosszú 9 nagyon hosszú</p> <p>3. Szár - szőrözöttség 3 gyenge 5 közepes 7 erős</p> <p>4. Levéllemez - alak 3 keskeny 5 közepes 7 széles</p> <p>5. Levél - szín 1 sárga 3 zöld 5 sötétzöld 7 szürkészöld 9 galambszürke</p> <p>6. Levél - hossz 1 nagyon apró 3 apró 5 közepes 7 nagy 9 nagyon nagy</p> <p>7. Levél - szeldeltség 1 nincs 2 nagyon gyenge 3 gyenge 5 közepes 7 erős 9 nagyon erős</p> <p>8. Levél - lebeny 3 keskeny 5 közepes 7 széles</p> <p>9. Virág szírom - méret 3 apró 5 közepes 7 nagy</p> <p>10. Virág szíromlevél - alak 3 kerek széles 5 kerek keskeny 7 kihegyesedő</p>	<p>11. Terméskezdemény - alak 3 gömbölyű 5 ovális 7 hengeres</p> <p>12. Terméskezdemény szőrözöttség 1 nagyon ritka 3 ritka 5 sűrű 7 nemezes 9 tövises</p> <p>13. Termés - alak 1 lapított 2 gömbölyű 3 tompa elliptikus 5 ovális 6 körte-alakú 7 hengeres</p> <p>14. Termés - felszín 3 sima 5 barázdált 7 érszerű kidudorodások 9 egyenetlen</p> <p>15. Termés - héj színe 1 fehéres 2 sárgás 3 krém 4 szalmasárga 5 narancs 6 világoszöld 7 zöld 8 sötétzöld 9 feketészöld</p> <p>16. Termés - héj rajzolat 1 nincs 2 van</p> <p>17. Termés - héj rajzolat típus 1 hálózatos 2 hálós csíkok 3 fonalas csíkok 4 márványozott 5 keskeny tövis-alakú csíkok 6 széles tövis-alakú csíkok 7 füzérszerű csíkok 8 széles elmosódó csíkok 9 mozaikos</p> <p>18. Termés - héj szilárdság 3 nem szilárd 5 közép szilárd 7 szilárd</p>	<p>19. Termés - hús szín 1 fehér 2 citromsárga 3 aranyárga 4 halvány rózsaszín 5 rózsaszín 6 narancssárga 7 skarlátvörös 8 kárminpiros 9 málnaszínű</p> <p>20. Hús - konzisztencia 1 szemcsés 2 zsenge, lágy 3 nyálkás 4 durva 5 telt, kemény 6 kemény 7 vattaszerű</p> <p>21. Hús -levedesség 3 száraz 5 kevésnedvű 7 nedvdús 9 nagyon leves</p> <p>22. Hús - íz 1 keserű 3 íztelen 5 gyengén édes 7 édes 9 nagyon édes</p> <p>23. Mag - szín 1 fehér 2 krém 3 szürke 4 dohányszínű 5 világosbarna 6 olajzöld 7 barna 8 piros 9 fekete</p> <p>24. Érés csoport 1 korai nap 3 középkorai 5 középerésű 7 középkései 9 kései</p>
---	--	--

Sorszám	Név	Növény fejlődési erély	Szár főnöda hossza/m	Szár szőrözöttség	Levéllemez alak	Levél szín	Levél hossz /cm	Levél szélesség	Levél lebeny	Virág szíromméret /cm	Virág szíromlevél alak	Terméskezdemény alak	Termés kezdemény szőrözöttség	Termés alak	Termés felszín	Terméshej színe	Terméshej rajzolat	Termés hej rajzolat típus	Termés kéreg Vastagság /cm	Terméshej vastagság	Terméshús szín	Hús konzisztencia	Hús levettség	Hús íz
Citrullus lanatus var. Lanatus																								
Magyar fajták																								
1	Hevesi	5	3	7	5	7	19	5	7	1,7	3	5	5	5	3	9	1		1,5	7	7	1	9	5
2	Kecskeméti vöröslúsa	5	4	5	5	7	19	7	5	1,6	3	5	5	2	3	7	2	3	1	7	7	7	5	7
3	Korai kínai	3	4	5	5	7	19	5	7	1,7	3	5	3	2	5	8	2	2	1,5	7	5	7	7	7
4	Marsowszky	7	3,5	7	5	7	17	7	5	1,8	3	5	5	5	3	8	2	7	1,4	7	4	5	5	3
5	Napsugar	5	3,5	5	5	7	20	9	3	1,8	3	5	5	2	3	6	2	3	1	7	2	1	7	9
6	Szentesi sárgahúsi	3	3	5	5	7	16	9	3	1,6	5	3	5	2	3	7	2	6	1,5	7	2	7	7	5
8	Charleston gray	5	3,5	7	5	7	18	5	7	1,7	5	7	5	7	3	6	2	9	1,5	7	5	1	7	5
9	Crimson sweet	3	3,5	7	7	7	17	5	5	1,4	3	5	5	5	5	7	2	6	1,5	7	5	7	9	7
10	Klondike R7	3	3,5	7	5	9	16	5	5	1,7	3	5	5	5	3	8	2	2	1	5	7	2	5	5
11	Sibiriak	3	3	5	5	5	17	9	7	1,8	3	3	3	2	3	8	1		1	5	7	1	5	7
12	Sugar baby	3	3	7	5	9	16	5	5	1,6	3	3	5	2	3	8	2	5	1,2	5	7	1	5	7
13	Ukrainskij	5	4,5	7	5	7	20	7	3	1,5	3	3	5	2	9	7	2	8	1,2	5	5	7	7	7
Tájfajták																								
14	Bácsbokod	7	4,5	7	7	9	17	7	5	1,9	3	3	7	2	5	6	2	4	1,2	7	2	6	3	3
15	Biri	7	4	7	5	7	20	7	5	2	3	3	3	5	9	8	2	8	1	5	7	7	7	7
16	Csárdaszállás	3	3	7	3	5	19	7	5	1,8	3	5	5	2	9	9	2	8	1,6	7	2	7	5	7
17	Debrecen	5	4,5	7	5	7	19	7	7	2	5	5	5	2	3	7	2	2	0,5	5	4	1	5	3
18	Dévaványa	3	3	7	7	7	20	7	3	1,8	3	3	5	2	3	6	2	3	1,2	7	2	4	7	3
19	Gyöngyös	5	4	7	5	7	18	7	5	1,5	5	5	5	2	3	6	2	2	1	5	5	1	7	7
20	Háromfa	5	3,5	7	5	9	20	9	3	1,6	3	5	5	2	3	7	2	7	1,3	7	8	7	5	7
21	Ilk	3	4,5	7	5	7	20	9	5	1,9	3	5	5	2	3	6	2	2	1,4	7	5	1	7	7
22	Kibéd	3	3	7	7	5	19	5	5	1,8	3	5	3	2	9	7	2	6	1,5	7	5	1	7	9
23	Kömörö	7	3	7	3	7	22	9	3	2,1	3	5	5	2	3	8	2	1	1,5	7	7	1	7	7
24	Lipót	7	3	7	5	5	19	5	5	1,9	5	7	5	7	3	6	2	9	1,2	7	7	2	7	7
25	Nagyecsed	3	3	7	5	7	18	5	7	1,7	3	5	5	2	3	7	2	8	0,9	5	5	1	7	5
26	Nagykallo	5	3,5	5	7	7	20	7	5	1,7	3	7	5	5	3	8	2	7	1,2	5	5	7	5	5
27	Nagyvárad	7	4,5	5	5	7	21	9	3	1,9	3	5	5	5	3	8	1		1,6	7	7	1	7	5
28	Nyírbátor	7	3	7	5	7	22	7	5	2,2	3	3	5	2	3	7	2	7	1,3	5	7	2	9	7
29	Nyíregyháza	7	4	7	5	7	20	7	5	2	3	3	5	2	5	6	2	6	2,5	5	5	7	7	3
30	Oros	5	3	5	5	9	20	5	5	1,9	3	5	5	2	9	8	1		1,7	5	7	1	7	5
31	Pusztadobos	7	4,5	5	5	7	18	9	3	1,9	5	5	3	5	3	8	1		1,2	7	7	1	7	7
32	Ráckeve	7	3,5	5	5	7	19	7	3	1,7	3	3	3	2	3	6	2	6	1,5	7	2	7	5	7
33	Rákozfalva	5	5	5	7	7	19	5	5	1,7	5	7	7	5	3	6	2	2	0,5	3	7	3	5	5
34	Sándorfalva	7	4,5	7	5	7	22	9	3	2	3	7	5	2	5	6	2	3	1	7	3	1	7	7
35	Sárma	7	5	5	5	7	23	5	5	2	3	5	5	2	9	7	2	8	1,2	7	5	1	7	7
36	Taktaharkány	5	3,5	3	5	7	19	5	5	2	3	5	5	3	3	7	2	6	1,5	7	5	5	7	3
37	Tura	7	3,5	7	5	9	23	7	5	2	3	5	5	2	3	6	2	2	1,2	7	7	1	7	7
38	Túrkeve	7	3,5	5	5	7	19	7	5	1,5	3	7	5	5	3	8	2	2	1	5	7	7	3	3
Citrullus lanatus var. Citroides																								
39	Román	7	7,5	5	7	7	20	5	7	2,6	3	7	7	7	3	7	2	4	2,5	7	1	6	5	3
40	Szeged	7	6	5	7	7	21	5	7	2,6	5	7	7	7	3	6	2	9	3	7	1	6	5	3
41	Újszilvás	7	9	5	7	7	22	5	7	2,5	3	3	7	2	3	7	2	8	4	7	2	6	5	3
Citrullus colocynthis																								
42	Belga	7	8	3	7	9	16	7	5	2	5	5	7	2	3	7	2	5	1,7	7	1	6	3	1
43	Finn	7	7	3	7	9	17	7	5	1,5	5	5	7	2	3	7	2	5	1,5	7	1	6	5	1
44	Portugál	7	9	3	7	9	17	7	5	1,5	3	3	7	2	3	7	2	5	1,5	7	1	6	3	1

9. táblázat. A mai *Citrullus* minták morfológiai jellemzéséhez alkalmazott 24 fenotípusos bélyeg (OMMI és ABI Tápiószele) és a faj/fajtára jellemző mutatók.

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 (ITSL/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'-cgcgtttacaacaattgtcc-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 (10. táblázat).

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

#	lókusz	primer-pár szekvenciák	Hivatkozás
1.	CmTC 51	attggggttctttgaggtga ccatgtctaaaaactcatgtgg	Katzir <i>et al.</i> , 1996
2.	CmTC 168	*atcattggatgtggattctc acagatggatgaaaccttagg	Katzir <i>et al.</i> , 1996
3.	CMAcc 146	caaccaccgactactaagtc cgaccaaacccatccgataa	Katzir <i>et al.</i> , 1996
4.	Bngl 339	ccaaccgtatcagcatcagc gcagagctctcatcgtcttctt	Smith <i>et al.</i> , 1997
5.	Bngl 118-2	gcctccagccgcaacct cactgcatgcaaaggcaaccaac	Smith <i>et al.</i> , 1997
6.	Bngl 161	gcttctgcatacacacattca atggagcatgagcttgcattt	Smith <i>et al.</i> , 1997
7.	Phi 121	aggaaaatggagccggtgaacca ttggtctggaccaagcacatacac	Smith <i>et al.</i> , 1997
8.	Phi 118-2	atcggatcggctgccgtcaaa agacacgacggtgtgccatc	Smith <i>et al.</i> , 1997
9.	Cl 1-06	cacctcctccagttgcattcg aagtcagcaaagcggcatagg	Jarret <i>et al.</i> , 1997
10.	Cl 1-20	cgcgctgaggaccctata aacgcctcaatcaattgc	Jarret <i>et al.</i> , 1997
11.	Cl 2-23	gaggcggaggagttgagag acaaaacaacgaaacctatgc	Jarret <i>et al.</i> , 1997
12.	Cl 2-140	cttttctctgattgactgg actgtttatcccgacttacta	Jarret <i>et al.</i> , 1997

A PCR reakciót 25 µl végtérfogatban 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 MgCl₂, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl₂, 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).

3.3.3 cpDNS

A kloroplaszt molekuláris elemzést két cpDNS (ycf9; trnVAL) (11.táblázat) primer felhasználásával végeztük. A PCR reakciót 25 µl végtérfogatban 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 MgCl₂, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl₂, 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).

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

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

3.3.4 Lcyb színgén

Az *lcyb* színgén molekuláris elemzését egy színgén (*lcyb*) (12. táblázat) primer felhasználásával végeztük, A PCR reakciót 25 µl végtérfogatban 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 MgCl₂, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl₂, 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).

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

#	lókusz	primerpár szekvenciák	hivatkozás
1.	LCYB 314	cctgttcttctggagttctt gaaaaagtgagtgggtgagga	Bang <i>et al.</i> , 2007
2.	LCYB 1134	aatgatggtgaccattcaag cttacaatccaggctaccagg	

3.3.5 WGA

A WGA felszaporítás lépéseit a következőképpen hajtottuk végre:

(a) Fragmentálás: A felszaporítani kívánt minták DNS-éből ddH₂O-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 pontosan 4 percig 95°C-on denaturáltuk (PCR-készülékben, amit rövid jégen tartás, és rövid centrifugálást követett).

(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.

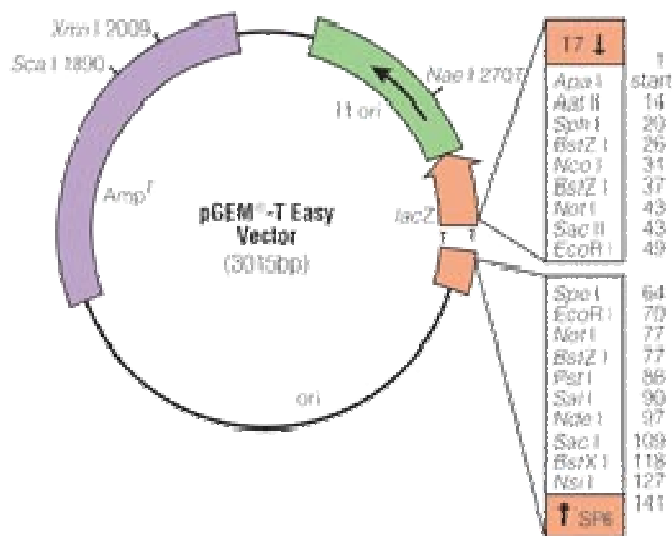
(c) PCR amplifikálás / 2: Az előző lépésekben elkészített genomi könyvtárhoz mintánként 60 μl PCR mastermix-et adtunk, ami a következőket tartalmazta: 7.5 μl 10X Amplification Master Mix, 47.5 μl nukleáz mentes víz, 5.0 μl WGA phi29 DNS polimeráz. Az így kapott 75 μl végtérfogatú oldatból újabb PCR reakciót indítottuk: 95°C/3 perc (denaturálás), 14 ciklusban: 94°C/15 mp, denaturálás, 65°C/5 perc, majd 4°C tartás, 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) készüléssel ReproGel High Resolution PAGE gél (24%) (Amersham Bioscience) alkalmazásával, rövid thermoplate-en végeztük. A futtatást 850 V-on, 50 mA-el, 50 W teljesítménnyel, 50°C-on 120 percen keresztül alkalmaztuk. 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.*, 2005).

3.4 Szekvenciaanalízis

Az ITS, SSR és cpDNS PCR termékek szekvenálását a fragmentumok gélből történő visszaizolálását és tisztítását követően BigDye Terminátor szekvenáló kit felhasználásával végeztük el (Applied Biosystems BigDye v3.1) egy ABI Prism 377 DNS szekvenátorban (Applied Biosystems). A fragmentumokat a szekvenálás előtt klónozó vektorba építettük (pGEM- TEasy vektor kit). A gélből történő visszaizolálás után, 10 percig 14,000 fordulatszám, 4°C-on centrifugáltuk. Steril körülmények között 5 µl templáthoz az alábbi klónozó mixet adtuk (2 µl desztillált víz, 1 µl pGEM- TEasy vektor (23. ábra), 1 µl T4 DNS ligáz és 1 µl 2x Rapid Ligation Buffer).



23. ábra: A PCR fragmentumok klónozásához felhasznált PGem T-Easy klónozó vektor felépítése (Promega)

Ezt követően 3 órán át inkubáltuk a mintákat 22°C-on, majd a mintákhoz 50 µl *Escherichia coli* JM109 sejtet valamint 10 µl plazmid DNS-t mértünk. 20-25 perc jégen tartás után 60 másodperc 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 (Applied Biosystems, Hungary) eljárást alkalmaztuk. 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).

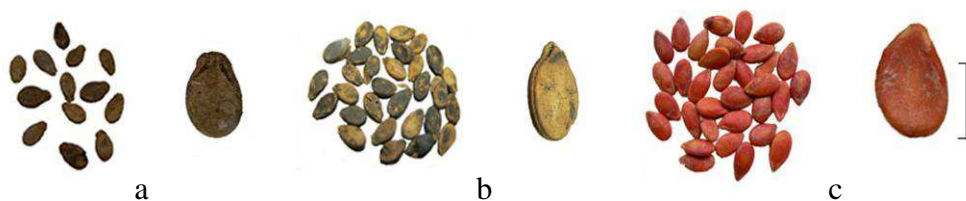
3.5 Statisztikai feldolgozás

A statisztikai elemzéseket a Microsoft Excel, valamint az SPSS 16 programcsomaggal végeztük. Az egyes lokuszok 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 kladogram elemzéshez az SPSS-16 (Jaccard Similarity Index; Jaccard, 1908; Average Linkage, within group), MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura *et al.*, 2007) és CLUSTAL W (Thomson *et al.*, 1994) programokat alkalmaztuk.

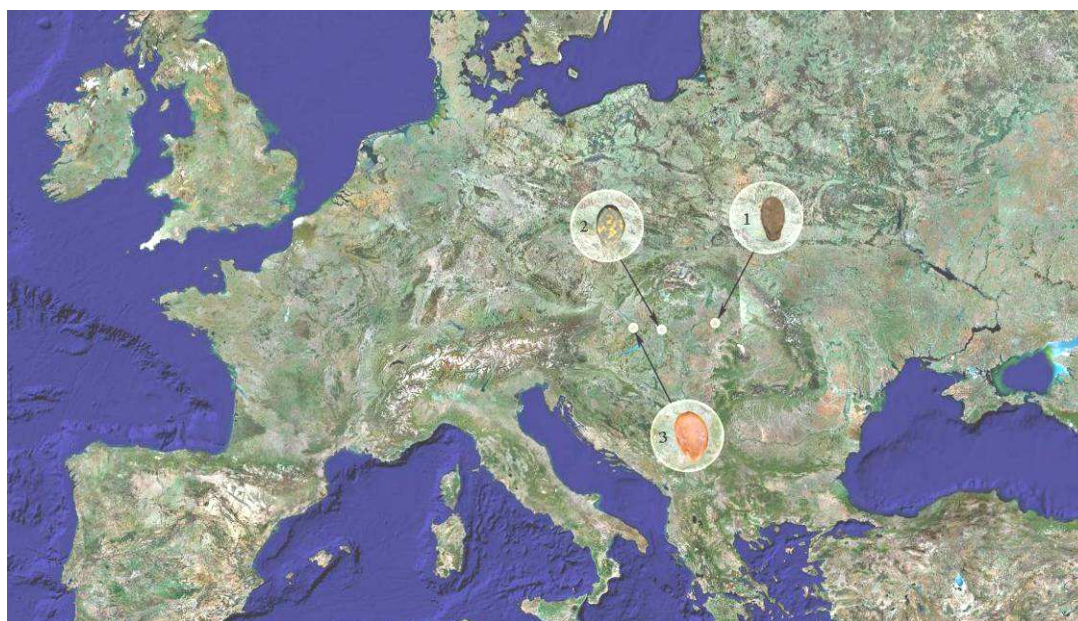
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

4.1 Görögdinnyemagok feltárása

A 13. századi *Citrullus* magok a debreceni volt Kölcsey Művelődési Központ területén feltárt kutak ásatai 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 feltárásra. Az ásatai 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 ún. Pannonhalmi Apátság botanikai gyűjteményéből bocsátották rendelkezésünkre (Mezőgazdasági Múzeum, Budapest) (Vörös, 1971) (24, 25. ábra)



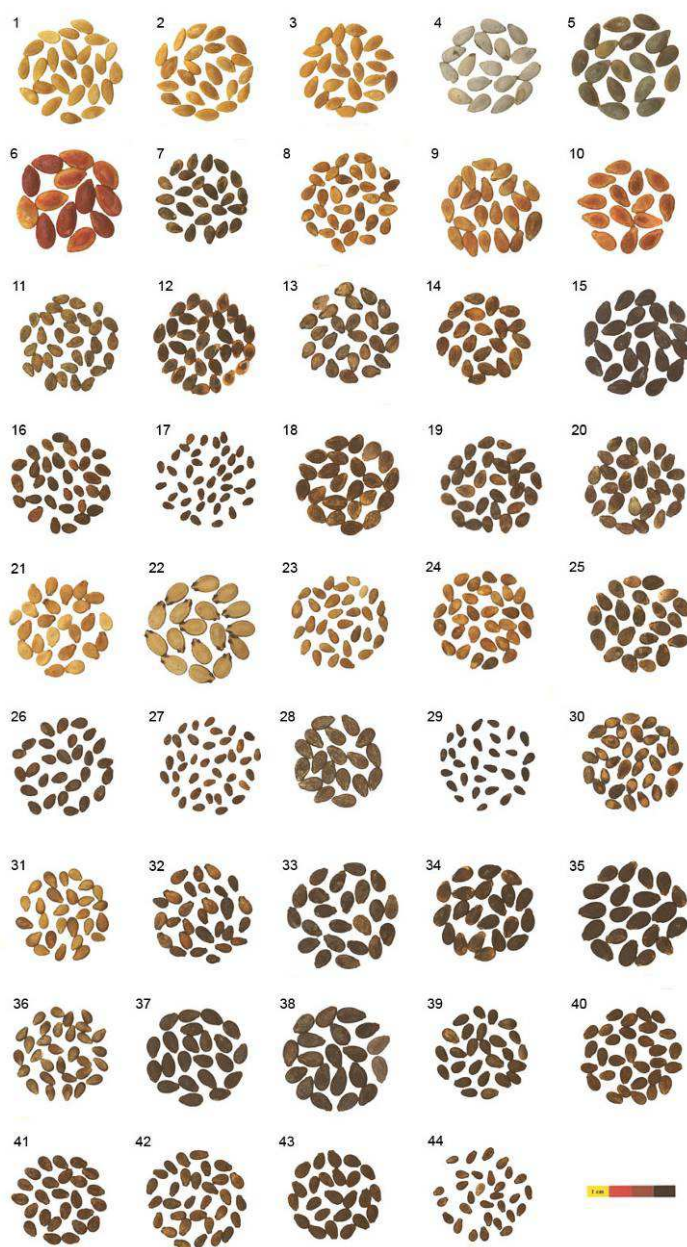
24. ábra: A vizsgált régészeti magleletek mintái: a 13. századi, Debrecen (a), 15. századi Budai Vár (b) és a 19. századi, Pannonhalma (c). Méret: 1mm. (Tóth *et al.*, 2007a).



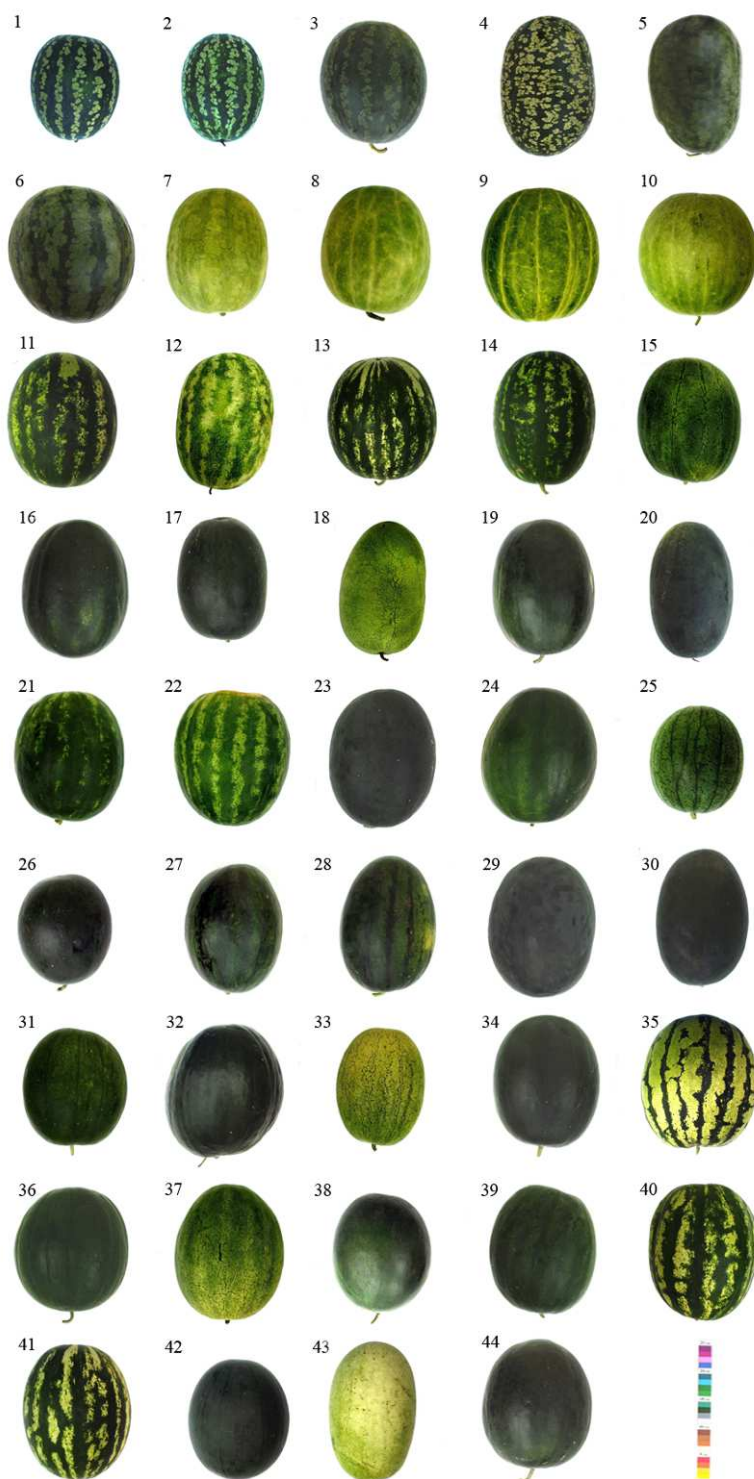
25. ábra: Európa térképe az ásatai helyének megjelölésével: 13. század, Debrecen (1), 15. század, Budai Vár (2) és 19. század, Pannonhalma (3) (Tóth *et al.*, 2007b).

4.2 A mai fajták morfológiai összehasonlítása görögdinnye-típusok szerint

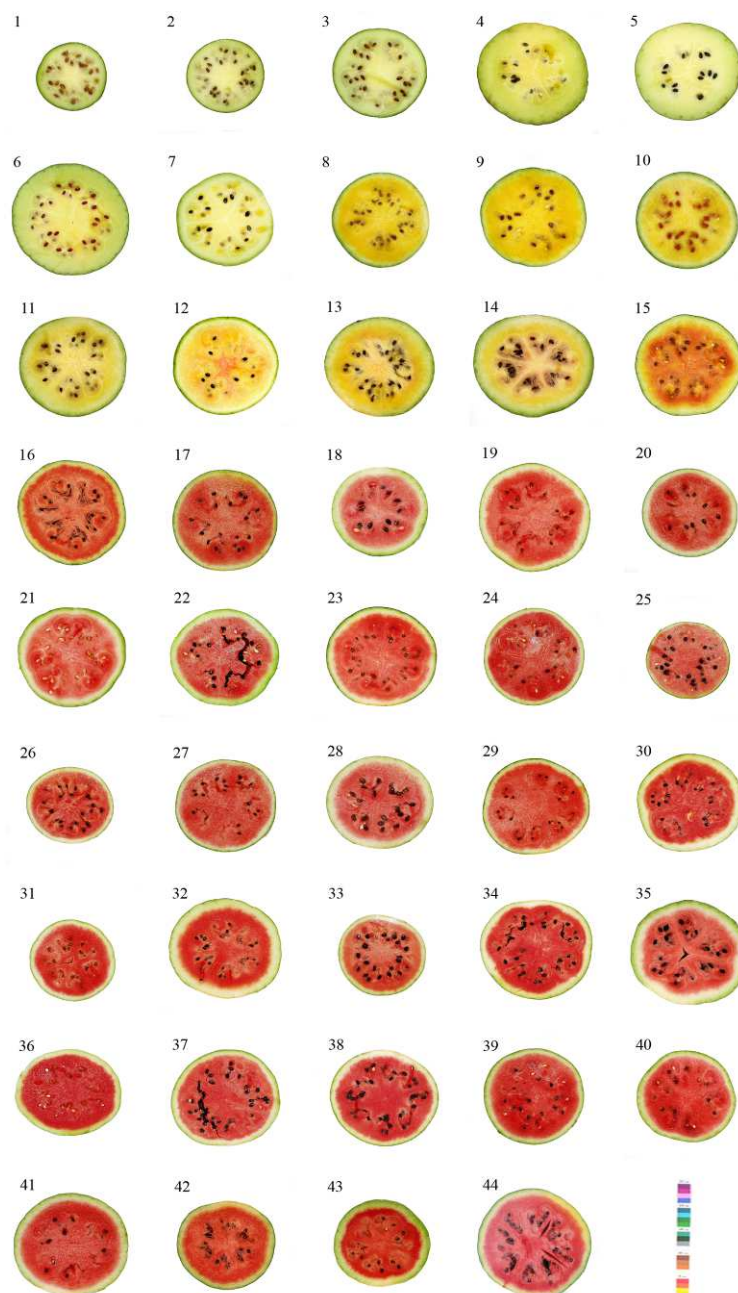
A régészeti minták fenotípus rekonstrukciójához 44 mai fajtát vizsgáltunk meg kisparcellás kísérletben. A parcellák 2X5 méter méretűek voltak. Faj illetve fajtákat parcellánként 3 ismétlésben ültettük el. Körülbelül 1,5 x 1,5 méter terület jutott egyedenként. A mai fajtákat mag (26. ábra), héj (27. ábra) és hússzín (28. ábra) szerint csoportosítottuk. A morfológiai felvételezést 25 bélyeg (Agrobotanikai Központ, Tápíószele) alapján végeztük el.



26. 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 magtípusai (színes méret 1cm) (Tóth *et al.*, 2007b).



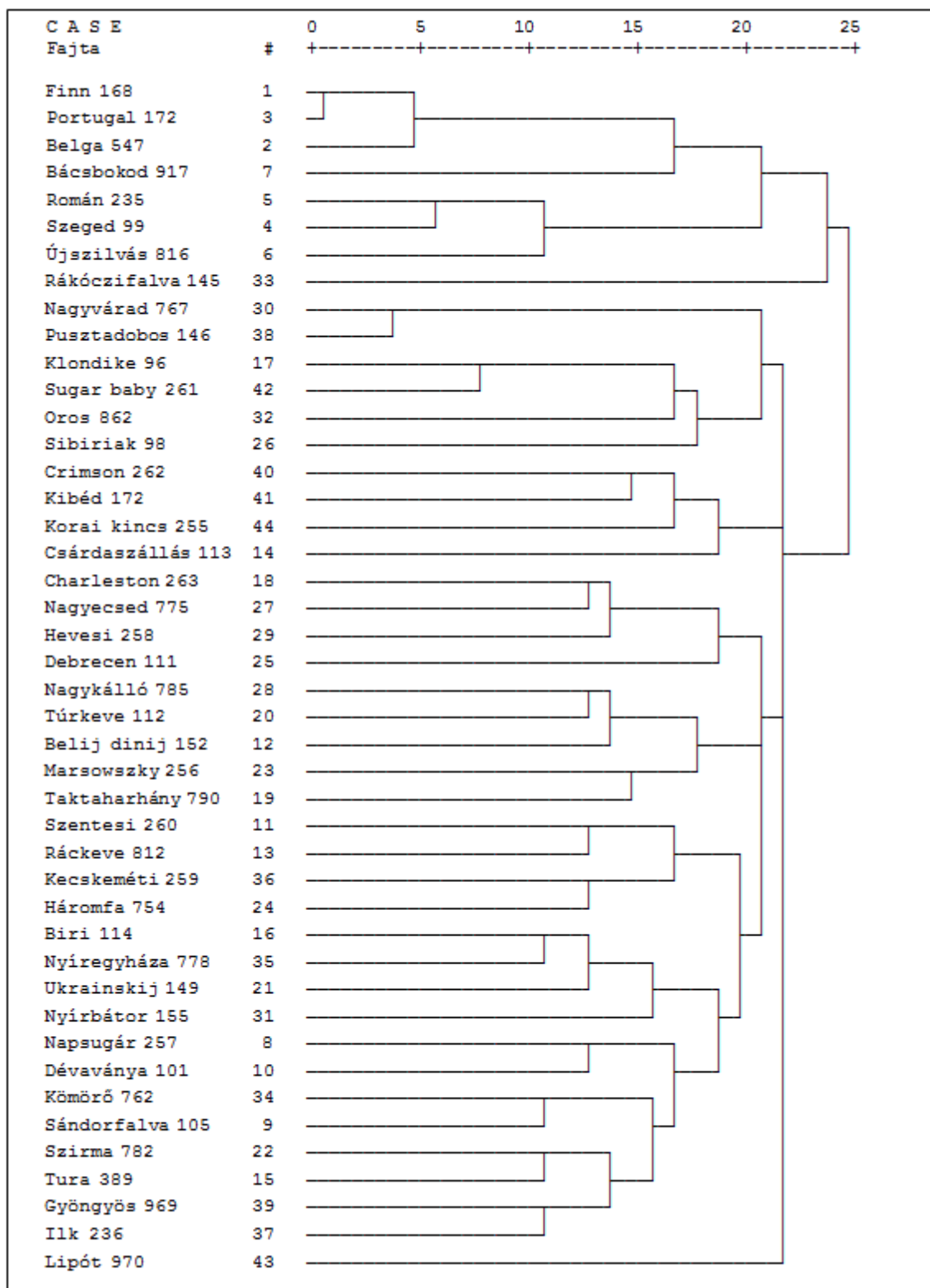
27. ábra: Az összehasonlító elemzésekhez alkalmazott mai sártök (1-3, *Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6, *Citrullus lanatus citroides*) és görögdinnye (7-44, *Citrullus lanatus*) fajták és tájfajták terméstípusai (színes méret 25cm) (Tóth *et al.*, 2007b).



28. 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 hússzín típusai (színes méret 25cm) (Tóth *et al.*, 2007b).

Az elemzés során a Jaccard (1908) indexek segítségével elkészítettük az összehasonlító dendrogrammot (Szabó *et al.*, 2005a,b). A görögdinnye fajtatípusokba történő besorolását megnehezíti a rendkívüli szín és forma gazdagság a termés héj, terméshús és a mag tekintetében. A felvételezett adatok alapján a 44 vizsgált görögdinnyefajta és tájfajta

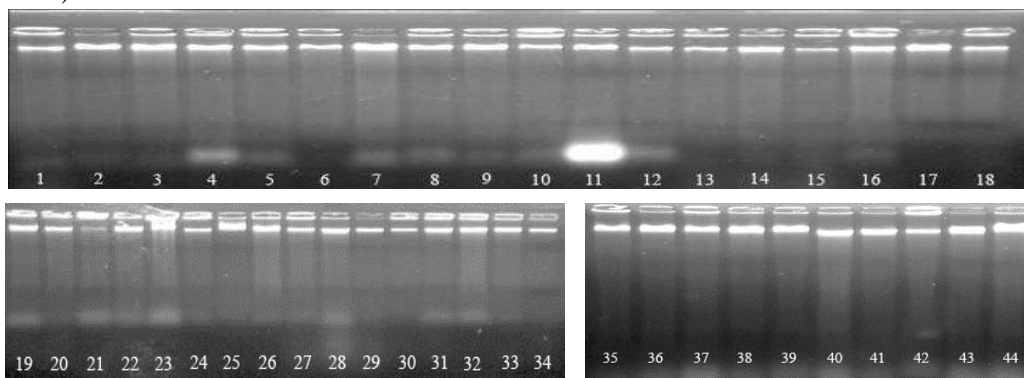
elkülöníthető volt a *Citrullus lanatus lanatus* a *Citrullus lanatus citroides* és a *Citrullus colocynthis* elterjedt fő típusok szerint (29. ábra).



29. ábra: Morfológiai dendrogram (SPSS16) a mai sártök (1-3, *Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6, *Citrullus lanatus citroides*) és görögdinnye (7-44, *Citrullus lanatus*) fajták és tájfajták rokonsági kapcsolatainak meghatározására (Tóth *et al.*, 2007a).

4.3 DNS izolálás az archeológiai, és a mai fajtákból

A régészeti mintákból származó, valamint a mai *Citrullus* magokból izolált DNS (30. ábra) mennyiségi és minőségi jellemzőit NanoDrop UV spektrofotométerrel mértük meg (13. táblázat), amely alkalmas volt a legpontosabb abszorpciós elemzésekre is ($A_{260/280}$ és $A_{260/230}$).



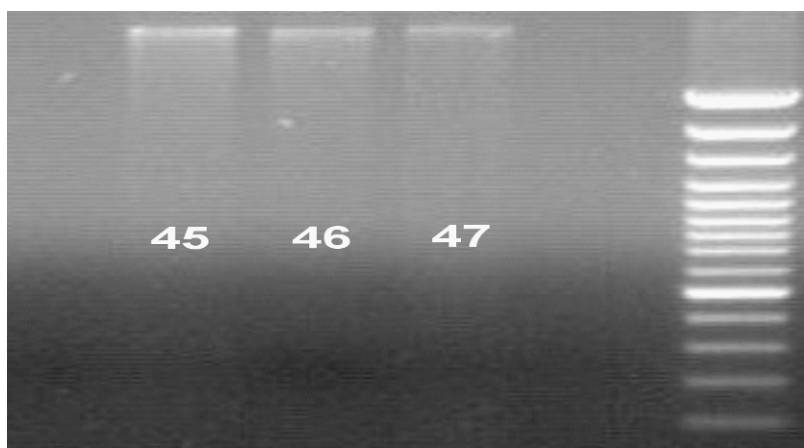
30. ábra: A mai sártök (1-3, *Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6, *Citrullus lanatus citroides*) és görögdinnye (7-44, *Citrullus lanatus*) fajták és tájfajták levélmintáiból izolált DNS minőségének ellenőrzése EtBr-agaróz (0,8 %) gélen.

13. táblázat. A mai sártök (1-3, *Citrullus colocynthis*), takarmánydinnye (4-6, *Citrullus lanatus citroides*) és görögdinnye (7-44, *Citrullus lanatus*) fajták és tájfajták izolált DNS mintáinak mennyiségi (ng/ul) és minőségi ($A_{260/280}$, $A_{260/230}$) értékei.

minta #	ng/μl	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Minta #	ng/μl	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Gd 1	396,51	2,16	2,02	Gd 23	688,91	1,98	1,54
Gd 2	442,53	1,9	1,33	Gd 24	173,01	2,12	2,12
Gd 3	533,41	1,87	1,29	Gd 25	428,89	2	1,37
Gd 4	399,11	2,13	2,09	Gd 26	568,27	1,96	1,5
Gd 5	509	1,82	1,11	Gd 27	565,78	2,15	1,99
Gd 6	553,85	1,88	1,44	Gd 28	795,93	1,66	1,12
Gd 7	130,12	1,93	2,75	Gd 29	199,22	2,17	1,3
Gd 8	338,72	2,15	2,05	Gd 30	568,68	2,16	1,87
Gd 9	350,39	2,17	1,5	Gd 31	255,35	1,62	0,58
Gd 10	403,03	2,16	1,88	Gd 32	275,24	2,09	1,56
Gd 11	675,84	1,95	1,42	Gd 33	551,94	2,17	2,03
Gd 12	281,69	2,11	1,53	Gd 34	246,1	2,04	1,69
Gd 13	835,43	2,19	1,88	Gd 35	138,38	2,03	1,29
Gd 14	669,44	2,08	1,72	Gd 36	224,86	2,09	1,26
Gd 15	806,84	2,2	2,07	Gd 37	481,1	2,17	1,77
Gd 16	761,39	2,06	1,77	Gd 38	489,75	2,18	1,69
Gd 17	418,73	2,11	1,68	Gd 39	124,16	2,05	0,73
Gd 18	383,59	2,15	2,13	Gd 40	255,09	2,01	0,82
Gd 19	131,42	2,12	1,91	Gd 41	176,45	1,6	0,81
Gd 20	631,95	2,18	2,1	Gd 42	168,39	1,84	0,85
Gd 21	294,1	2,21	2,23	Gd 43	336,08	1,49	0,38
Gd 22	836,09	1,97	1,42	Gd 44	268,99	1,66	0,5

A mai DNS minták minden esetben jó abszorpciós értékeket és arányokat mutattak, melyek alapján a molekuláris elemzés több ismétlésben volt elvégezhető.

A régészeti mintákból kis mennyiségű, töredezett DNS-t kaptunk (31. ábra), 100-3000 bp nagyságban, míg ezzel szemben a mai fajtákból nagy mennyiségű, kompakt DNS-t izoláltunk (14. táblázat).



31. ábra: A 13. sz. (45), 15. sz. (46) és a 19. sz. (47) *Citrullus* magvakból izolált DNS elválasztása EtBr-agaróz (0,8 %) gélen (100bp MW).

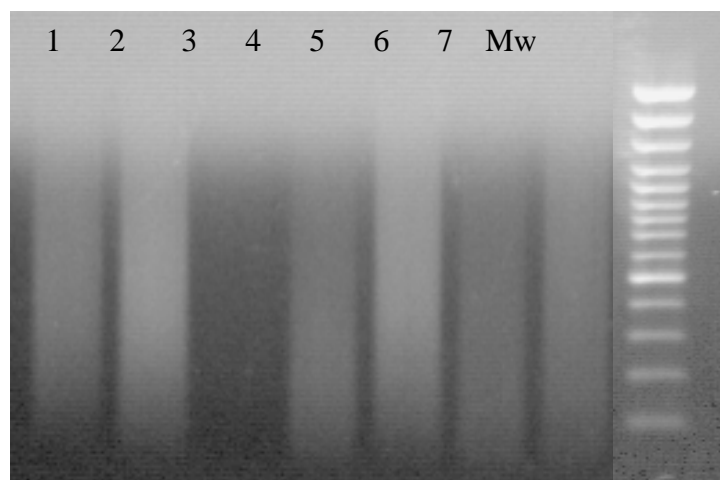
14. táblázat: A régészeti *Citrullus* magokból izolált DNS minták minőségi és mennyiségi értékei.

Sample ID	ng/μl	A _{260/280}	A _{260/230}
13. sz. Debrecen	15,09	1,65	0,18
13. sz. Debrecen	11,23	1,57	0,16
13. sz. Debrecen	88,3	1,51	0,79
13. sz. Debrecen	68,44	1,73	1,65
13. sz. Debrecen	21,15	1,59	0,42
13. sz. Debrecen	36,6	1,63	0,42
15. sz. Buda	49,76	1,65	0,65
15. sz. Buda	23,65	1,76	0,75
15. sz. Buda	52,32	1,92	0,61
19. sz. Pannonhalma	91,85	1,87	0,84
19. sz. Pannonhalma	30,22	1,64	0,71
19. sz. Pannonhalma	65,32	1,71	0,89

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 (32. ábra) 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



32. ábra: Teljes Genom Amplifikáció (WGA) a 13., 15., és 19. századi *Citrullus* DNS mintákban (5-7) egy mai fajta (2, 4) és 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 (15. táblázat).

15. táblázat. A Teljes Genom Amplifikációban (WGA) felszaporított *Citrullus* DNS minták mennyiségi és minőségi értékei.

(a)				(b)				(c)
DNS	ng/μl	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	DNS	ng/μl	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	
humán	81,14	2,11	1,97	humán	910,72	1,77	1,64	X 11,2
gd 1	396,51	1,88	2,02	gd 1	954,82	1,76	2,12	X 2,5
gd 6	533,41	2,46	1,44	gd 6	971,77	1,86	2,09	X 1,8
13.sz./1	15,09	1,65	0,18	13.sz./1	803,2	1,77	1,59	X 53,2
13.sz./2	88,3	1,51	0,79	13.sz./2	988,14	1,79	1,61	X 11,2
15.sz./1	49,76	1,65	0,65	15.sz./1	953,15	1,87	2,13	X 19,2
15.sz./2	23,65	1,76	0,75	15.sz./2	1071,05	1,88	2,1	X 45,3
19.sz./1	91,85	1,87	0,84	19.sz./1	1104,26	1,96	2,13	X 12
19.sz./2	30,22	1,64	0,71	19.sz./1	1074,3	1,86	2,12	X 35,5

4.5 Összehasonlító molekuláris vizsgálatok

4.5.1 ITS elemzés

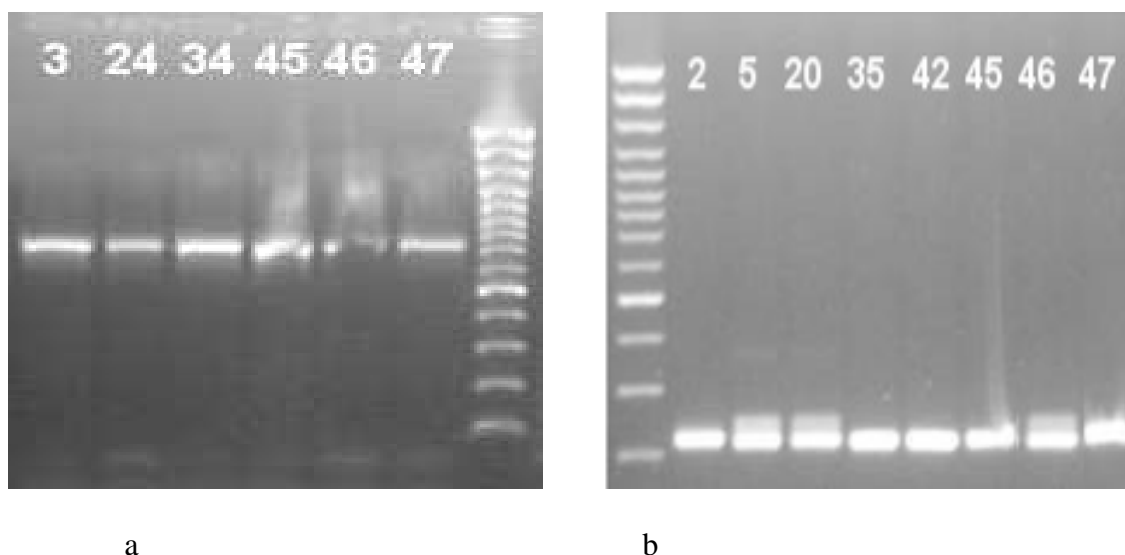
A molekuláris vizsgálatokban először ITS elemzést végeztünk a régészeti és mai *Citrullus* mintákban. Az alkalmazott primerek (Hsiao *et al.*, 1995) alapján az alábbiak szerint módosítottuk:

ITS L: 5'-cgcgtttacaacaattgtcc-3'

ITS 4/1: 5'-acactacggtggtgatccg -3'

ITS 4/2: 5'-gtcccccaaggatgacgc-3'

Amely primerek használatával egy közel 610 bp és egy kisebb 130 bp nagyságú fragmentumot (33. ábra/a,b) szaporítottunk fel a régészeti és a mai *Citrullus* mintákból.



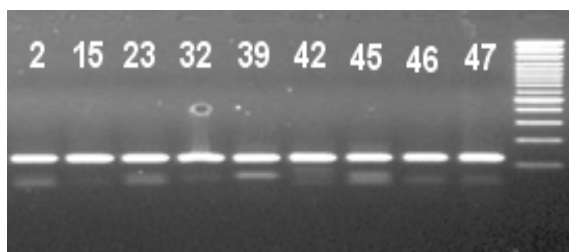
33. ábra: A régészeti *Citrullus* leletek (13. sz.- 45; 15.sz. - 46; 19.sz. - 47) és a mai fajtákból izolált DNS minták több ismétlésben elemzett ITS-PCR vizsgálata ITS primerpárral. (a) 610 bp hosszú ITS fragmentum, primerek (Hsiao *et al.*, 1995), (b) 130bp hosszú ITS fragmentum primerek (Tóth *et al.*, 2007a).

4.5.2 SSR elemzések

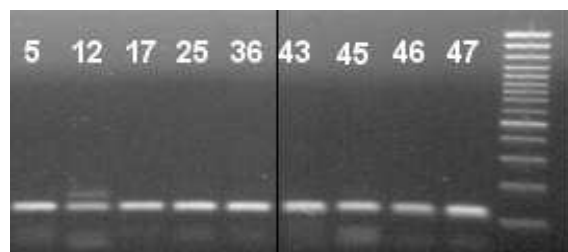
Az SSR analízis során 47 mikroszatellita oligonukleotid-párt teszteltünk, amelyből 16 bizonyult hatékonynak (Katzir *et al.*, 1996; Danin-Poleg *et al.*, 2001), a primerek 80%-ával, azaz 12 primerrel kaptunk megismételhető amplifikációt a mai, és a régészeti mintákban (34. ábra). A mikroszatellita lókuszokat 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 (16. táblázat). Végül a 12 SSR primer adatainak

felhasználásával molekuláris dendrogram (35. ábra) elemzést végeztünk a mai (1-44), valamint a régészeti *Citrullus* leletekben (45-47), az uborka (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával.

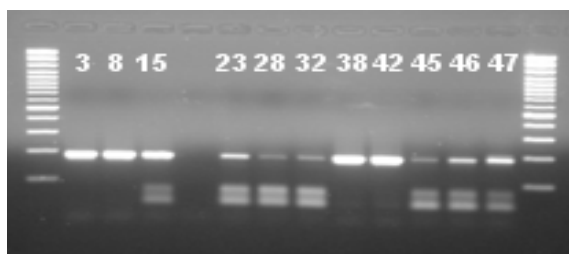
bngl339



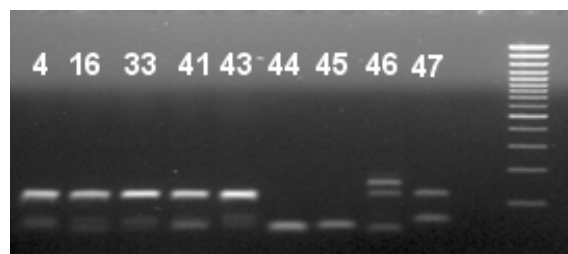
cmtc168



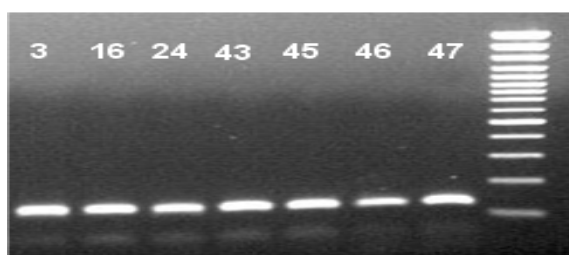
cl2-140



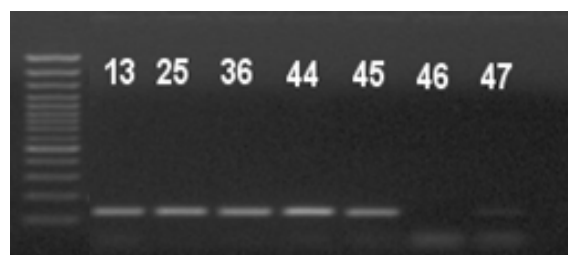
cl 1-20



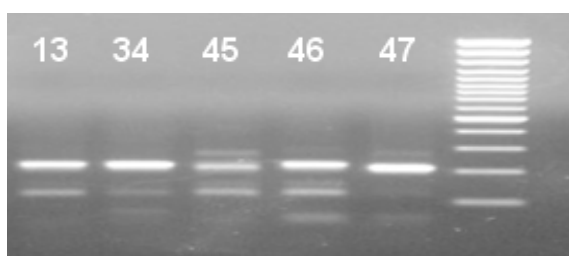
phi121



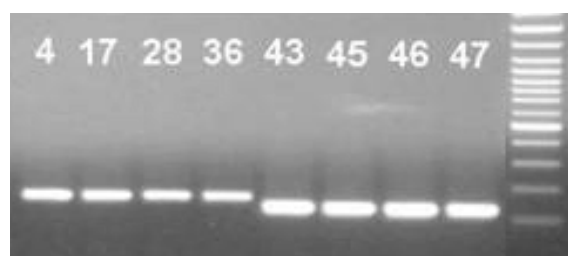
phi118-2



cl2-23



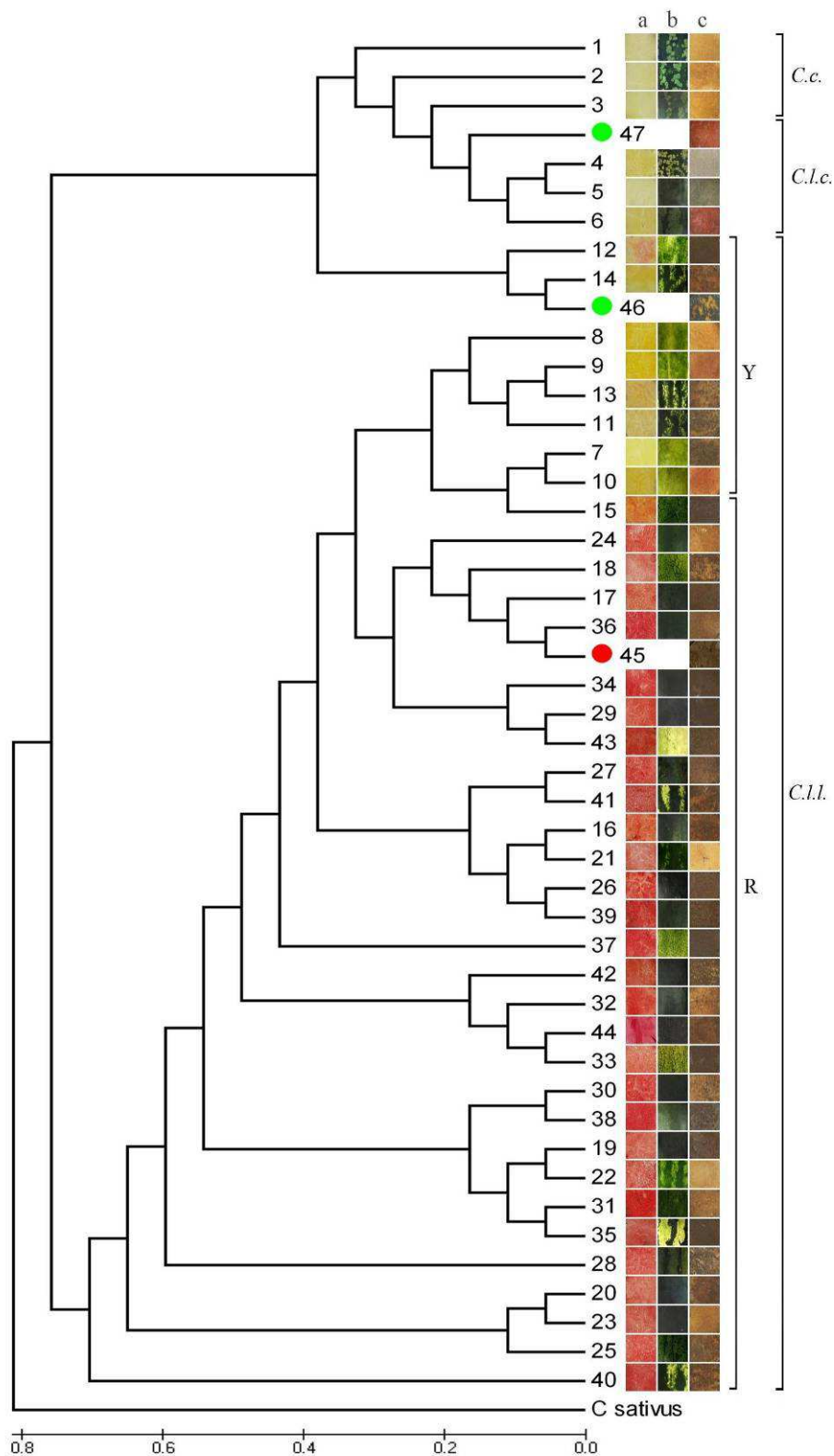
bngl118-2



34. ábra: A régészeti és mai *Citrullus* minták vizsgálata SSR primerekkel (#1-44 mai minták, és #45, 46, 47 régészeti minták).

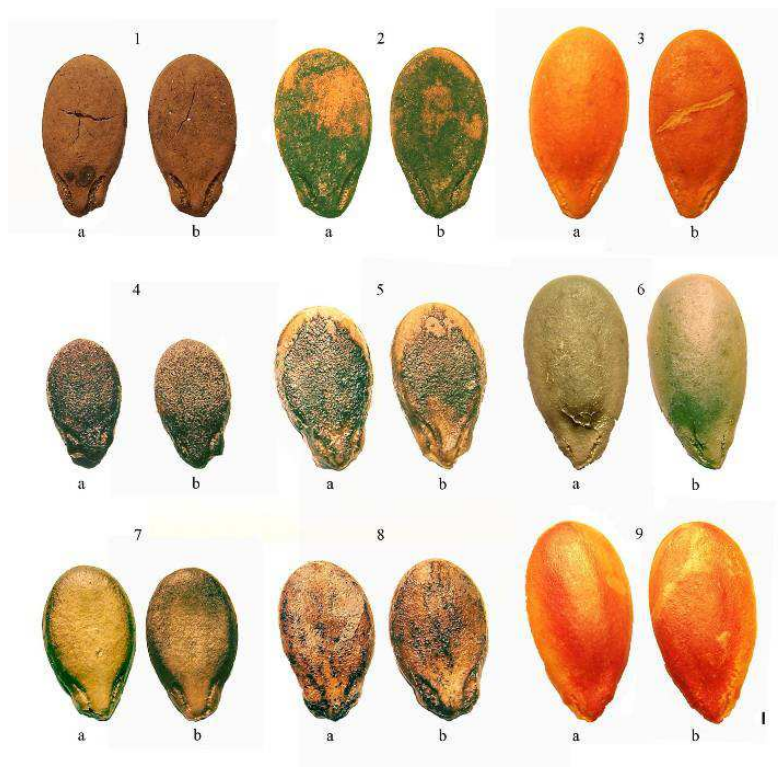
16. táblázat. Az ALF-SSR (automata laser fluorometer) elemzés mintázata 12 mikroszatellita (SSR) lókus, 23 allél, 701 fragmentum alapján a 44 mai és a régészeti (#45, 45, 47) mintákban.

SSR	cmct168	bngl161		bngl118-2		phi118-2		bngl339		phi121		cmacc146		cmct51			c11-06			c11-20		c12-23		c12-140	Total N ^o
		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	c	a	b	a	b	a	b			
nt	126	139	146	124	132	132	136	113	131	124	130	124	136	306	309	130	145	150	181	187	178	183	190		
PIC érték	0	0,49		0,37		0,49		0,48		0,49		0,30		0,44			0,64			0,38		0,48		0	
#	cv.																								
1.	C.c.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●			●	●		●	18
2.	C.c.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●			●	●		●	16
3.	C.c.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●			●	●		●	18
4.	C.l.c.	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	20
5.	C.l.c.	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●			●	●		●	18
6.	C.l.c.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	18
7.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	18
8.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	17
9.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●			●	15
10.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●		●	●		●		●		●	●			●			●	14
11.	C.l.l.	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●		●		●	●			●	●		●	14
12.	C.l.l.	●		●	●	●		●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	16
13.	C.l.l.	●	●	●	●		●		●	●	●	●		●		●		●			●			●	13
14.	C.l.l.	●	●	●		●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	18
15.	C.l.l.	●	●	●	●	●		●		●	●		●		●	●	●			●		●		●	12
16.	C.l.l.	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●		●	●	11
17.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	20
18.	C.l.l.	●		●	●		●		●	●		●		●	●		●			●		●		●	13
19.	C.l.l.	●		●	●	●		●		●		●		●		●	●			●		●	●	●	13
20.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●			●			●	●	●	15
21.	C.l.l.	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●		●	●	13
22.	C.l.l.	●		●	●	●		●		●	●	●	●		●		●	●			●		●	●	14
23.	C.l.l.	●	●		●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●			●		●		●	15
24.	C.l.l.	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	14
25.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	12
26.	C.l.l.	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	18
27.	C.l.l.	●		●	●		●	●	●	●	●	●	●	●			●	●			●		●	●	11
28.	C.l.l.	●	●			●		●		●	●	●	●		●		●	●			●		●	●	13
29.	C.l.l.	●		●	●		●	●	●		●		●		●		●	●	●	●	●	●		●	13
30.	C.l.l.	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●		●	●	14
31.	C.l.l.	●	●	●	●	●		●		●	●	●	●		●		●			●			●	●	13
32.	C.l.l.	●	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●			●	●	13
33.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●			●		●	●	13
34.	C.l.l.	●		●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	13
35.	C.l.l.	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	13
36.	C.l.l.	●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	18
37.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●		●	●	●		●		●	●			●		●	●	14
38.	C.l.l.	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	15
39.	C.l.l.	●	●	●				●	●	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	12
40.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●			●		●	●	17
41.	C.l.l.	●		●	●		●	●	●	●	●	●	●		●		●	●			●		●	●	13
42.	C.l.l.	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	12
43.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	15
44.	C.l.l.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	14
45.	C.l.l.	●	●		●		●	●	●	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	17
46.	C.l.l.	●	●	●	●		●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	19
47.	C.l.c.	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●	●	16
N ^o	47	34	42	40	13	36	31	39	28	36	38	38	9	35	18	27	35	19	40	13	21	15	47	701	
Σ	47	76		53		67		67		74		47		53			81			53		36			47



35. ábra: Molekuláris dendrogram elemzés a mai (1-44), valamint a régészeti (45-47) *Citrullus* mintákban a 12 SSR mikroszatellita lókus, 23 allél, 701 fragmentuma alapján, az uborka (*Cucumis sativus*) génbanki adat összehasonlításával (SPSS16).

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* maglelet a #4 (Szeged), #5 (Román 235), #6 (Újszilvás) mai fajtákkal mutatja a legközelebbi rokonságot (36. ábra).

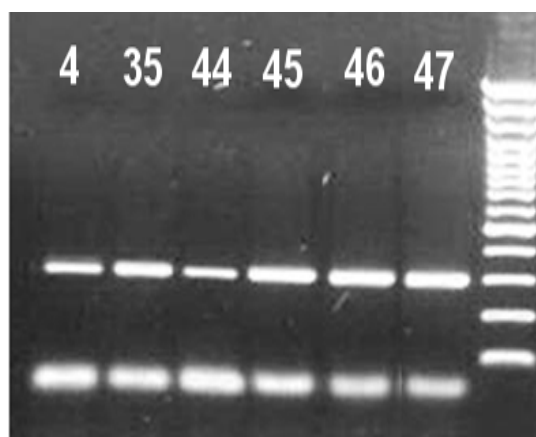


36. ábra: A régészeti *Citrullus* és a legközelebbi rokonságot mutató (SSR dendrogramm, 35. ábra) mai *Citrullus* fajták magjainak összehasonlítása (a – hasi és b – háti oldal). (1) 13. századi debreceni maglelet és a - (4) kecskeméti vöröshúsú (#36) - (7) Klondike(#17); (2) 15. századi budai maglelet és a (5), Belyj dlinnij (#12) - (8), Csárdaszállás (#14); (3) 19. századi pannonhalmi maglelet és a (6) Román-235 (#5) – (9) Újszilvás (#6) mai minták összehasonlításában. (méret: 1mm) (Tóth *et al.*, 2007b).

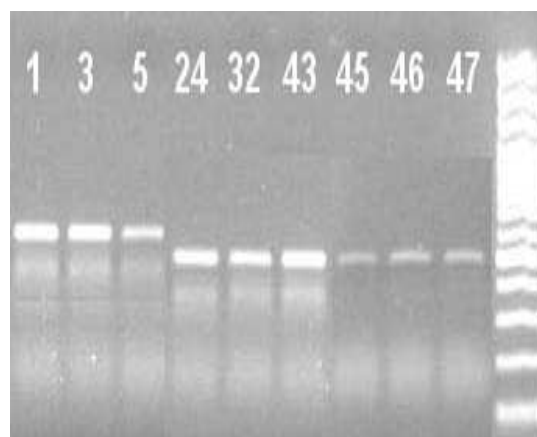
4.5.3 cpDNS elemzés

A kloroplaszt DNS-t 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 (37. ábra).

trnVAL-rps12



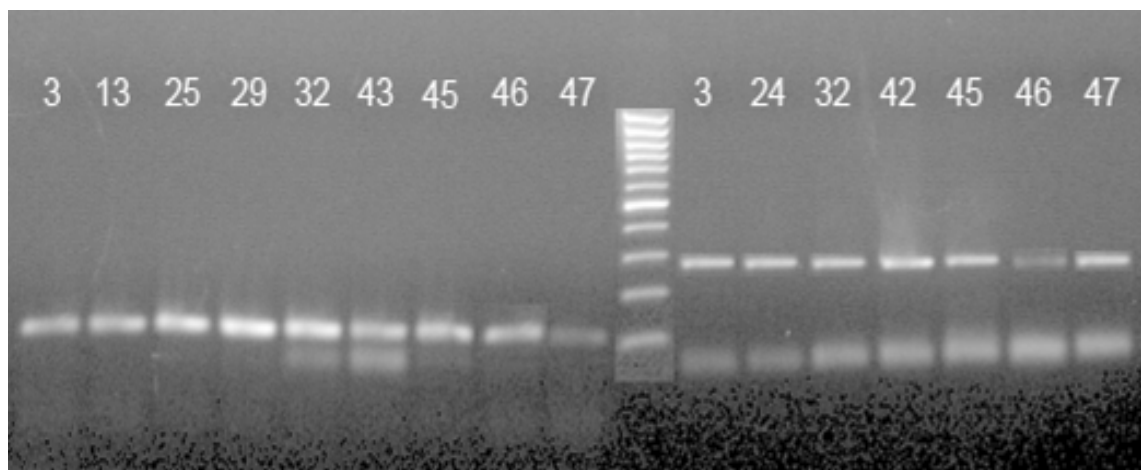
ycf9-orf62



37. ábra: A régészeti és mai *Citrullus* minták kloroplasztisz-DNS vizsgálata két cpDNS lókuszon, #3, 35,44 és 1-32 mai mintákban, valamint a #45, 46, 47 régészeti mintákban.

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 (38. ábra).



38. ábra: A régészeti és mai *Citrullus* minták vizsgálata a *lcyb* gén két lókuszn az *lcyb*-specifikus primerekkel (Bang *et al.*, 2007), #3-43 mai minták, #45, 46, 47 régészeti minták.

4.6 Szekvencaanalízis és fajtarekonstrukció klaszter analízis alapján

4.6.1 Sejtmagi DNS analízis

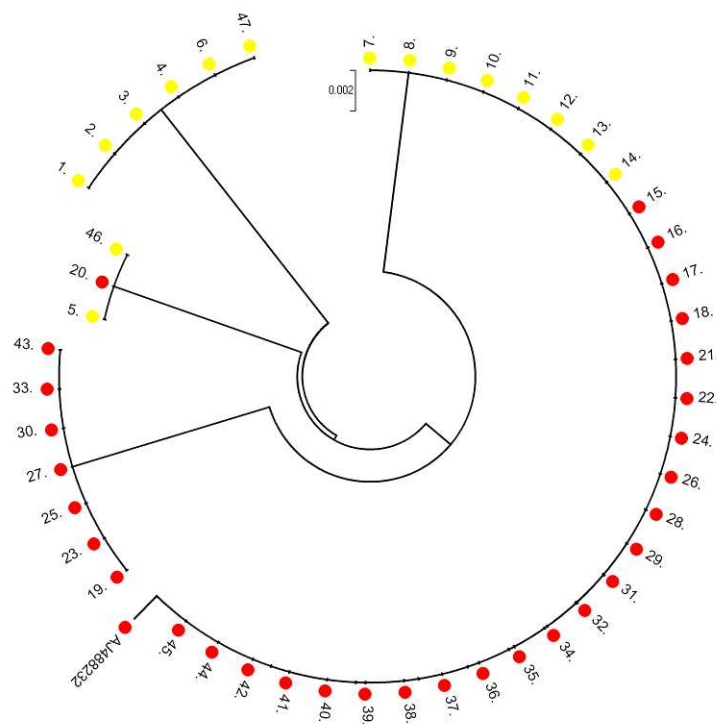
4.6.1.1 ITS szekvenciák

ITS elemzés az ITS1-5.8S-ITS2 rDNS lókuszon (39. ábra). Az evolúciósan konzervatív ITS szekvenciák elemzése alapján kirajzolódott a legősibb *Citrullus* 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)₈ deléciós-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 görögdinnyékben (C)₃ deléció van a (C)₈ deléciós lókuszon. A sártökökre és takarmánydinnyékre 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, takarmánydinnye és a 19. századi (#47) mintában, amellyel molekulárisan igazoltuk a 19. századi magminta fajtabesorolását (takarmánydinnye: *Citrullus lanatus citroides*).

Ezt az eredményt a mag morfológiai vizsgálatok is előre jelezték. Ezen az ITS lókuszon az #5 sártök, a #20 görögdinnye (cv. Túrkeve), valamint a 15. századi archeo minta (#46) heterozigóta allél megoszlást mutatott, amely eredmény jelzi, hogy a 15. századi (#46) régészeti dinnye a domesztikációban ősbibb fajta lehetett, mint a kétszáz évvel korábbi 13. századi (#45) dinnye. 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 görögdinnyéken belül. További négy SNP változást mutattunk ki: egy T-inszercióval (393. bp) és három szubsztitúcióval (C→T a 407. nt-on; és két T→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) (40. ábra)

	10	20	30	40	50	380	390	400	410	520	530	550	560	570	580	590	600	610	
AJ488232	<u>CGCGTTTACAACAATAATTGTC</u> CGCGTGCCTGGGCGGGGGGAAGCATTATGCTCGT					GCCCCCCCCCCC---ACACAACACCCCATGCGGG					<u>ACACTACGGTGGTTGATCCG</u>		TCCTGACGTCGCCTCCTTGTGGACTCCTACACCGACCCCTTGAACGCTGTC <u>CCCCCAAAGGATGACGC</u>						
#																			
1.T.....C.....																		
2.T.....C.....																		
3.T.....C.....																		
4.T.....C.....																		
6.T.....C.....																		
47.T.....C.....																		
5bT.....C.....																		
5aT.....C.....																		
20aT.....C.....																		
20bT.....C.....																		
46aT.....C.....																		
46bT.....C.....																		
7.C.....																		
8.C.....																		
9.C.....																		
11.C.....																		
10.C.....																		
12.C.....																		
13.C.....																		
14.C.....																		
15.C.....																		
16.C.....																		
17.C.....																		
18.C.....																		
21.C.....																		
22.C.....																		
24.C.....																		
26.C.....																		
28.C.....																		
29.C.....																		
31.C.....																		
32.C.....																		
34.C.....																		
35.C.....																		
36.C.....																		
37.C.....																		
38.C.....																		
39.C.....																		
40.C.....																		
41.C.....																		
42.C.....																		
44.C.....																		
45.C.....																		
19.cc.....																		
23.cc.....																		
25.cc.....																		
27.cc.....																		
30.cc.....																		
33.cc.....																		
43.cc.....																		

39ábra: A régészeti és a 44 mai *Citrullus* minta (7. táblázat, 55.old.) elemzése az rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lokuszon (SNP pontok kiemelésével)



40. ábra: Molekuláris dendrogram elemzés a mai (1-44)-, valamint a régészeti *Citrullus* mintákban az ITS1-5.8S-ITS2 lókuszon (MEGA4) az AJ488232 görögdinnye (*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 (41. ábra), illesztés és BLAST analízis során egy $(CT)_4$ inverziót (133-140 bp) azonosítottunk, a régészeti és a mai fajtákban amely $(CT)_{27}$ egyszerű mikroszatellita lókuszból kialakuló $(CT)_{17}$ -C-(TC)₄-T-(CT)₅ összetett mikroszatellita születését igazolja, amely várhatóan tovább fragmentálódik majd az elkövetkező évszázadokban. Ez az eredmény különlegesen fontos a mikroszatellita kutatásokban („ld. mikroszatelliták születése és halála”: Weber, Wong, 1993; Messier et al.1996; Kutil, Williams, 2001; Orti et al. 1997; Taylor et al. 1999; Tóth et al. 2000). Továbbá, egy $(CT)_3$ - deléció (126-131 nt) mutattunk ki csak a *Citrullus lanatus lanatus* görögdinnye mintákban, számos heterozigóta fajtával. 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 görögdinnyékhez sorolta. Ennek az eredménynek a megerősítésére, a hússzín fajtarekonstrukció igazolásához az *lcyb* gént elemeztük, ugyanis az *lcyb* gén két allélje szelektív markere a sárga és vörös dinnyehús megjelenésének (Bang et al., 2007).

4.6.1.3 A kloroplasztisz DNS (cpDNS) elemzése

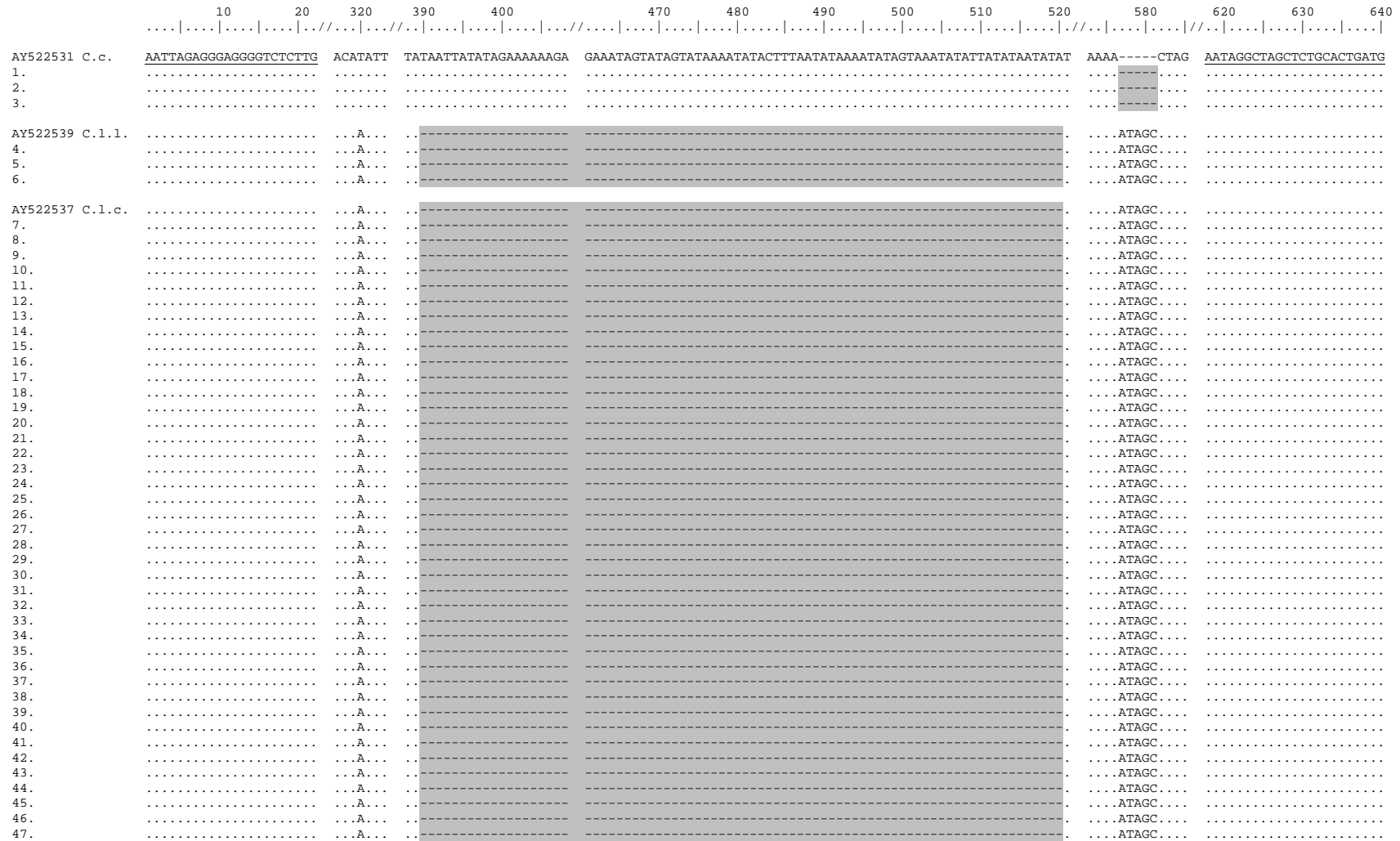
A kloroplasztisz (cpDNS) két lókuszon elemeztük: a *ycf9-orf62* (a PSII PsbZ protein központi alegységét kódoló génje) és *trnVAL-rps12* (a valin tRNS-t és a 12S riboszómális proteint kódoló gének) szakaszain.

A kloroplasztisz DNS (cpDNA) vizsgálatával további citotípus azonosítást végeztünk (42. ábra). Az *ycf9-orf62* (640 bp) lókuszból 320. nt-ján azonosított transzverzió (T=A → A=T) megerősített (Dane *et al.*, 2007) egy fajspecifikus, citoplazma-marker alkalmazhatóságát a genotípus azonosításában.

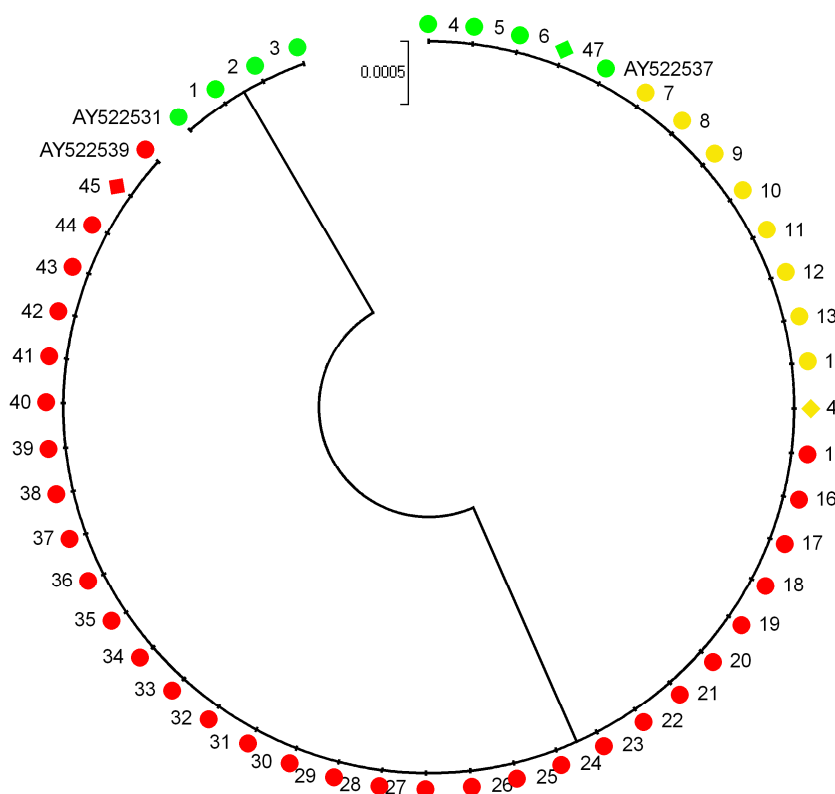
A vizsgált takarmánydinnyékben (*Citrullus lanatus citroides*) és a görögdinnyékben (*Citrullus lanatus lanatus*). kimutatott 132 bp hosszú szakasz deléciója (389-520 bp) (Dane *et al.*, 2007) elkülönítette a sártököt (*Citrullus colocynthis*) a takarmánydinnyéktől (*Citrullus lanatus citroides*) és a görögdinnyéktől (*Citrullus lanatus lanatus*). Ezen felül egy inszerciós 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*) fajoktól, a minták hússzínétől függetlenül.

Az *ycf9-orf62* lókuszból szekvenciáinak felhasználásával elkészítettük a 44 mai és három régészeti *Citrullus* minta klaszter analízisét (43. ábra), amellyel jól elkülöníthetők az egyes *Citrullus* fajcsoportok egymástól.



42. ábra: A régészeti és a 44 mai *Citrullus* minta (7. táblázat, 55.old. elemzése a cpDNS ycf9-orf62 lokuszon. A deléziós és inszerciós szakasz (ATAGC: 576-581 nt; és a 132 bp: 389-520 nt) kiemelésével.

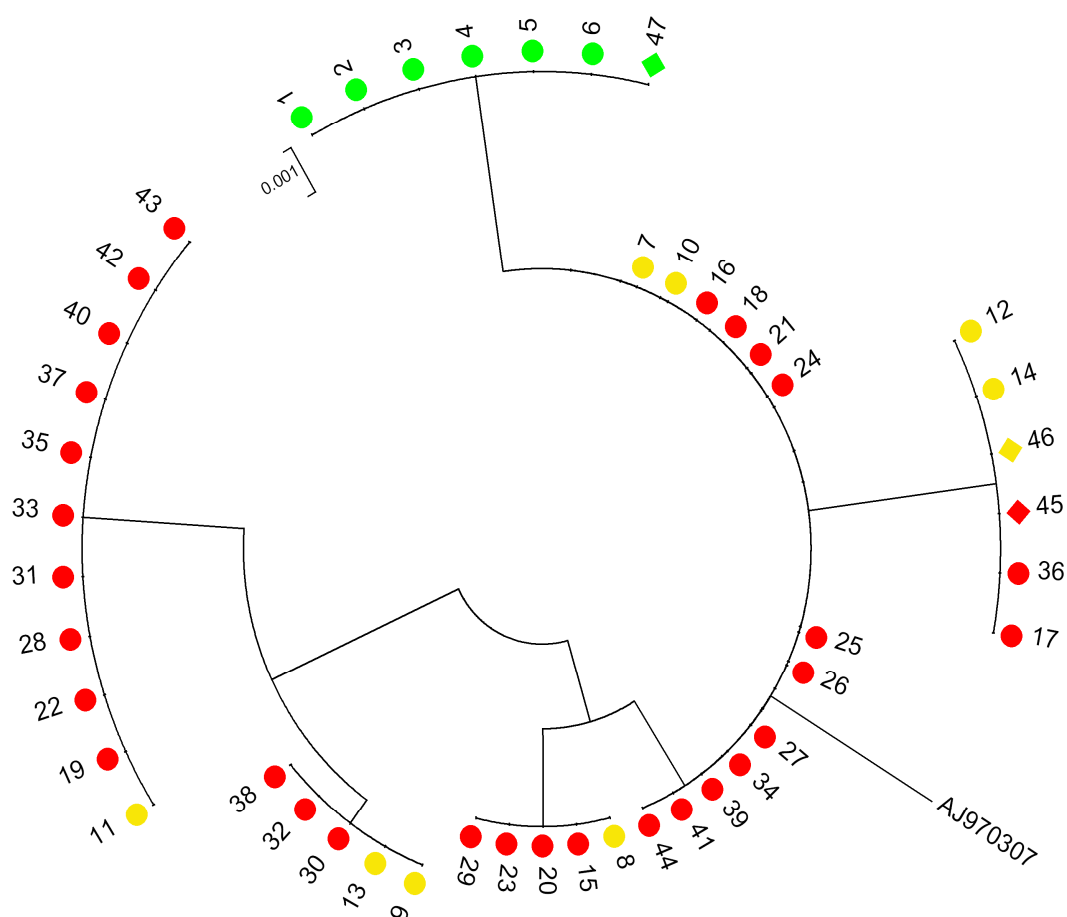


43. ábra: Molekuláris dendrogram elemzése a mai (1-44), valamint a régészeti *Citrullus* mintákban (45-47) az *ycf9-orf62* cpDNA lókuszon végzett szekvencia elemzése alapján (MEGA4). A *Citrullus lanatus citroides* AY522537, *Citrullus lanatus lanatus* AY522539 és *Citrullus colocynthis* AY522531 génbanki adat összehasonlításával.

A cpDNS elemzés a *tRNA-Val - rps12* lókuszban (45. ábra): A cpDNS *tRNA-Val - rps12* lókuszán (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 termesztett görögdinnye fajta (#20, cv. Túrkeve) nem került ebbe a csoportba, feltételezi,

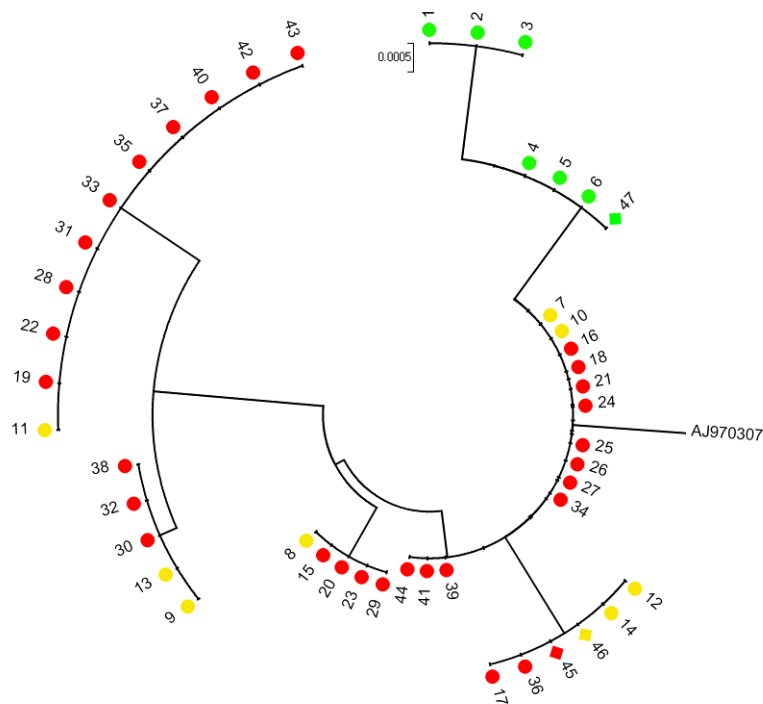
hogy a görögdinnye nem obligát anyai öröklődést mutat (a megporzó pollennel is átjuthat a kloroplasztisz), amely hibrid citoplazma (cibrid) folyamatos kialakulását eredményezi.

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. (44. ábra)



44. 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.

A két cpDNS lókuszt szekvenciáinak felhasználásával megrajzoltuk az egyesített kloroplaszt molekuláris dendrogramot (46. ábra), ami további finomelemzést tesz lehetővé az eddig elkészített két cpDNS molekuláris dendrogramon túl. Ugyanis jól látható, hogy a két kloroplaszt primer együttes használatával a sártök (*Citrullus colocynthis*) fajták már elkülöníthetők nemcsak a görögdinnyéktől (*Citrullus lanatus lanatus*), hanem a takarmánydinnyéktől (*Citrullus lanatus citroides*) is.

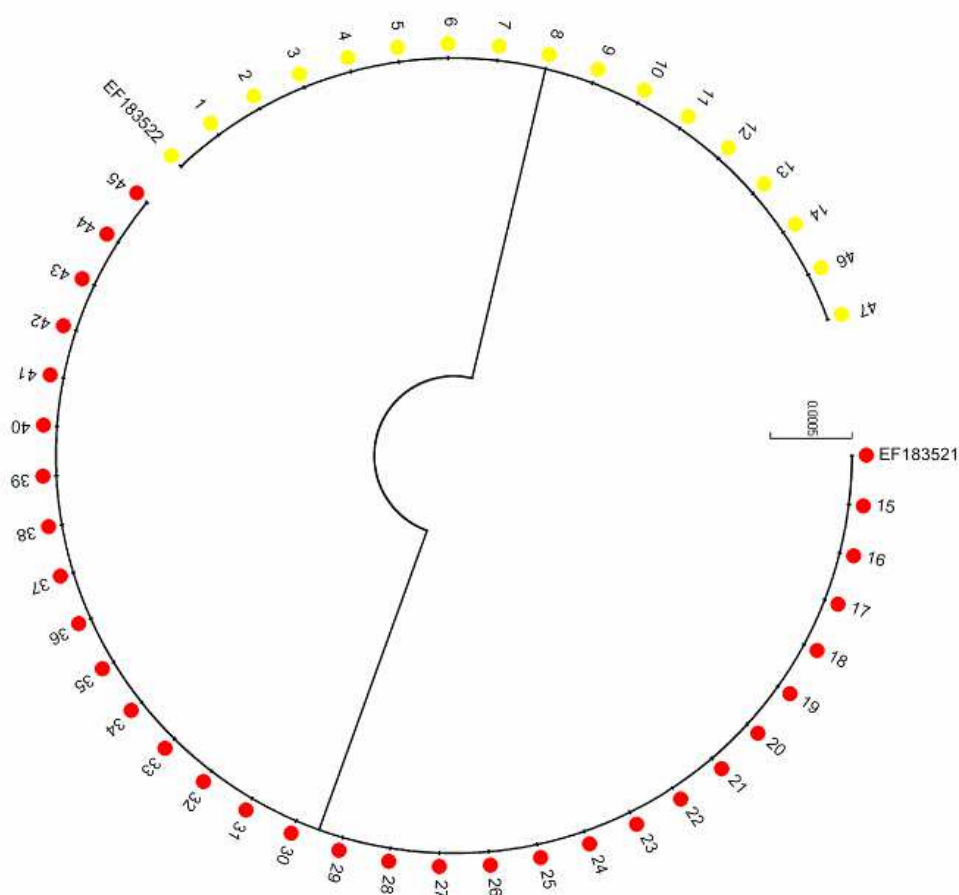


46. ábra: Molekuláris dendrogram elemzése a mai (1-44), valamint a régészeti *Citrullus* mintákban (45-47) az *ycf9-orf62*, *trnVAL-rps12* cpDNS lókuszon végzett szekvencia elemzése alapján (MEGA4) az uborka AJ970307 (*Cucumis sativus*) géntanki adat összehasonlításával.

4.6.1.4 *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 (47. ábra). 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 kapcsoltak. Viszont a 13. (# 45) századi minta együtt a mai vöröshúsú *Citrullus* fajtákkal (#15 - 44) a vörös színhez kapcsolt 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 génjeinek 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 görögdiinnyék között előfordulhatott keserű fajta is, pl. *Citrullus lanatus citroides*). Az *lcyb* szekvencia felhasználásával elkészítettük a 44 mai és 3 régészeti *Citrullus* molekuláris dendrogramját (48. ábra) (Mega4)



48. 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, cpDNA, lcyb színgén allélgyakoriság adatai alapján elvégzett cluster analízisben megállapítható a régészeti *Citrullus* magvak legközelebbi genetikai rokonsága a mai fajtákkal. Összefoglalva, megállapítható, hogy 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.

4.7 Új tudományos eredmények

1. Kivontam a 800-, 600- és 170 éves *Citrullus* magvak ősdNS állományát (6 - 10 ng DNS/ 1 g mag), és meghatároztam 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 azonosítottam a legősibb mai görögdinnye fajtát (cv. Túrkeve, #20). A ITS szekvenciák elemzésével elkülönítettem és a további vizsgálatokból kizártam az exogén/endogén fertőzött régészeti magokat.
3. Igazoltam a teljes genom amplifikáció (WGA) alkalmazhatóságát az ősdNS minták nagy mennyiségű és szekvenciahű felszaporíthatóságára. A WGA amplifikáció során a fragmentumokban egyetlen hibás amplifikációt sem azonosítottam.
4. A sejtmagi nSSR lókuszok elemzésével a mai *Citrullus* fajtákban (1-44) és a régészeti leletekben fajtarekonstrukciót végeztem molekuláris dendrogram elemzésével. A molekuláris dendrogram elemzését morfológiai dendrogram (24 fenotípusos bélyeg) elemzésével vettem össze. A sejtmagi DNS 12 SSR-lókuszán, 23 allélt és 701 SSR fragmentumát határoztam meg, mely alapján előzetes fajtarekonstrukciót végeztem a régészeti leletek fonotípusának meghatározásában.
5. A hússzín-rekonstrukció meghatározására a sejtmagi *lcyb* (*likopin* β -cikláz) szekvencia elemzését végeztem el, amely alapján DNS szekvencia szerint mutattam ki a régészeti leletek (és mai dinnye fajták) hús szín típusait.
6. Mindhárom régészeti leletben kloroplasztisz DNS (cpDNS) szekvenciákat mutattam ki régészeti leletekben és a mai fajtákban hat (*trnaVAL-rps12*), illetve további kettő (*Ycf9*) haplotípus azonosításával.
7. A DNS minták szekvencia elemzése során 12 SSR lókusz (összesen 9212 nt), egy színgén (100862 nt), egy ITS lókusz (összesen 28670 bp hosszú) és két cpDNS (összesen 43992 nt) lókusz szekvenciáját határoztam meg.
8. A vizsgálatok alapján fajtarekonstrukciót végeztem, amely szerint a 13. századi lelet piros húsú görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*), a 15. századi görögdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*) és a 19. századi takarmány dinnye sárgahúsú (*Citrullus lanatus citroides*) fajta típusba tartozott.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Több mint 800 éves *Citrullus* növénymaradványok regenerálási, és összehasonlító molekuláris vizsgálatával archeogenetikai kutatásokat végeztem.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a régészeti magvak hamar elvesztik csírázókéességüket. *In vitro* körülmények között sterilizált magvak jól szelektálhatók az exogén fertőzöttségű magvaktól.

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.

Bizonyítottam, hogy a teljes genom amplifikálás (WGA) archeológiai minták esetében is jól alkalmazható. Az alkalmazott DNS izolálási módszerrel az összehasonlító molekuláris vizsgálatokhoz megfelelő minőségű és mennyiségű DNS izolálható az ősi magokból

Az archeo DNS-sel végzett összehasonlító molekuláris vizsgálatok nélkülözhetetlen adatokat nyújthatnak az emberi élelmezésben 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.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A régészeti *Citrullus* magvak maradványaiból izolált archeo örökítőanyag vizsgálataihoz elkészítettem 44 mai *Citrullus* mikroszatellita kontroll ujjlenyomat mintázatát. A régészeti növénymagvak jó állapotban maradtak fenn, köszönhetően a feltárt kutakban lévő nedves, iszapos, anaerob körülményeknek. Az archeogenetikai vizsgálatoknál a legfontosabb, hogy elkerüljük, ill. kiszűrjük az exogén és endogén bakteriális, patogén fertőzésű, vagy egyéb kontaminálódott magvakat. Az exogén fertőzöt magvak kizárása és az egyéb DNS kontaminációk elkerülésére ideálisnak bizonyult a felületi fertőtlenítését követő 3 hónapos aszeptikus szövettenyésztési inkubáció. A régészeti leletből előkerült *Citrullus* maradványból a semmiféle fizikai sérülést nem mutató magok szelektálását követően az aszeptikus inkubáció során az exogén fertőzéseket nem hordozó magot azonosítottam. A fertőzésmentes magból egy-mag módszerrel izolált ősdNS-t 0,8%-os agaróz gélen kimutattam és meghatároztam a DNS degradáció mértékét a mai fajták összehasonlításában. A vizsgálatok alapján a hideg, nedves anaerob fennmaradási körülményeknek köszönhetően az ősdNS minták közepes degradációt mutattak, nagymolekula tömegű fragmentumok jelenlétével.

Az aszeptikus inkubációt követő DNS izolálás után ITS vizsgálatot végeztem 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 azonosítottam: négy SNP változást mutattam 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)₃ deléciót határoztam meg a (C)₈ 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)₈ deléciót (385 bp-392 bp) mutattam ki a #1-6 fajtákban (sártök és takarmánydinnyék), valamint a 19. századi (#47) mintában, amellyel molekulárisan igazoltam 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)₈, hanem csak (C)₁ deléciót azonosítottam. 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)₈ deléciós-allél hordozásával (385 bp - 392 bp).

Az összehasonlító mikroszatellita ujjlenyomat analízishez a Cy5 fluoreszcens festékkell jelzett primereket alkalmaztam, amely 632,8 nm-en gerjeszhető, és 660-670 nm-en fluoreszkáló (Helium-Neon lézerrel gerjesztett) (2,5 mW output) ALFexpress II műszert használtam. A fluoreszcens jelölésből eredően a módszer érzékenysége nagyon magas, és képes volt kimutatni az 50 amol (5×10^{-14} M) és 45 fmol ($4,5 \times 10^{-11}$ M) közötti DNS mennyiségeket. Az összehasonlító vizsgálathoz használt 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 azonosítottam. A lókuszon azonosított allélszám 2-3 között változott, átlagosan 2,1 allélszámot azonosítottam, a következő megoszlásban: bng1161 (2 allél), bng1118-2 (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 egyes lókuszon az allélek között 6-20 nukleotid közötti különbséget állapítottam meg.

Az SSR allélek visszaizolálása után meghatároztam a fragmentumok pontos bázissorrendjét. A kapott alléleket bináris kódolása után SPSS 16 statisztikai programmal értékeltem 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 (cpDNA) vizsgálatával további citotípus azonosítást végeztem. A *ycf9-orf62* lókuszt megerősített (Dane *et al.*, 2007) egy fajspecifikus, citoplazma-marker alkalmazhatóságát a genotípus azonosításában, továbbá a *tRNA-Val - rps12* lókuszon végzett vizsgálatokkal egy cpDNS-alapú markert azonosítottam, amely elkülönítette a sártök (*Citrullus colocynthis*) és a takarmánydinnyét (*Citrullus lanatus citroides*) a görögdinnyétől (*Citrullus lanatus lanatus*).

A sejtmagi *lcyb* színgén szekvencia elemzése során két hússzín-kapcsolt nukleotid szubsztitúciót (SNP) azonosítottam. 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 egy-egy nukleotidban. A 13. századi (# 45) minta együtt a mai vöröshúsú *Citrullus* fajtákkal (#15 - 44) a vörös színhez kapcsolt 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. 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 kisselektálódott tulajdonságok rekonstrukciójához.

SUMMARY

Morphological and molecular evidences

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.

Flesh and rind types

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. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott, R.J., Brochmann, C. (2003) History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hultén. *Mol Ecol.* 2003 Feb;12 (2):299-313.
- Adcock, G.J., Dennis, E.S., Easteal, S., Huttley, G.A., Jermiin, L.S., Peacock, W.J., Thorne, A. (2001) Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins. *P Natl Acad Sci USA* 98, 537-542.
- Adler, C.J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A. (2011) Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science* Volume 38, Issue 5, May 2011, Pages 956-964
- Ajtay, Zs., Barna, B., Farkas, K., Gracza, P., Molnár, B. (1981) *Dinnyetermesztés*. Mg Kiadó, Budapest, 963-231-066-70. pp.367.
- Al-Awwam, I.B.N. (1158) *Le Livre de l'agriculture*, translated by Clement-Mullet; 2 tomes in 3 vols., Paris (1864-1867). Reprints (1802, 1988). *Libro de agricultura / su autor el doctor excelente Abu Zacaria Iahia ; [traducido al castellano y anotado por Josef Antonio Banqueri ; estudio preliminar y notas, J. E. Hernández Bermejo y E. García Sánchez]*. Madrid.
- 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
- Allaby, R.G., Banerjee, M., Brown, T.A. (1999) Evolution of the high-molecular-weight glutenin loci of the A, B, D and G genomes of wheat. *Genome* 42: 296-307.
- Allentoft, M. E., Rawlence, N. J. (2011) Moa's Ark or volant ghosts of Gondwana? Insights from nineteen years of ancient DNA research on the extinct moa (Aves: Dinornithiformes) of New Zealand. *Ann Anat.* 2012 Jan 20; 194 (1):36-51.
- Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., Primorac, D., García, O., Fernández De Simón, L., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., Fernández-Piqueras, J. (2003) Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croatian Medical Journal* 44: 273-280.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autriques, J.A., Tanksley, S.D., Sorrells M.E. (1993) Optimizing parental selection for genetic-linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Anderson-Carpenter, LL., McLachlan, JS., Jackson, ST., Kuch, M., Lumibao, CY., Poinar, HN. (2011) Ancient DNA from lake sediments: Bridging the gap between paleoecology and genetic. *BMC Evolutionary Biology* 2011, 11:30
- Andreasen, K., Manktelow, M., Razafimandimbison, S. G. (2009) Successful DNA amplification of a more than 200-year-old herbarium specimen: recovering genetic material from the Linnaean era. *TAXON* 58 (3) • August 2009: 959-962
- Armstrong, G.A., Hearst, J.E. (1996) Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 1996 Feb;10(2):228-37
- Arumuganathan, K., Earle, E. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 211-215.
- Asplund, L., Hagenblad, J., Lein, M. W. (2010) Re-evaluating the history of the wheat domestication gene NAM-B1 using historical plant material. *Journal of Archaeological Science* 37 (2010) 2303-2307
- Aufhammer, G., Fischbeck, G. (1964) Ergebnisse von Gefass- und Feldversuchen mit dem Nachbau keimfähiger Gersten- und Hafer korner aus dem Grundstein des 1832 errichteten. Nurnberger Stadttheates. *Z Pflanzenzuchtung* 51: 345-378.
- Austin, J.J., Ross, A.J., Smith, A.B., Fortey, R.A., Thomas, R.H. (1997b) Problems of reproducibility - Does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *P Roy Soc Lond B Bio* 264, 467-474.
- Austin, J.J., Smith, A.B., Thomas, R.H. (1997a) Palaeontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA. *Trends in Ecology & Evolution* 12, 303-306.
- Ávila-Arcos, M. C., Cappellini, E. J., Romero-Navarro, A., Wales, N., Moreno-Mayar, V., Rasmussen, M. L., Fordyce, S., Montiel, R., Vielle-Calzada, J-P., Willerslev, E., Gilbert, M.T.P. (2011) Application and comparison of large-scale solution-based DNA capture-enrichment methods on ancient DNA. *Sci Rep.* 2011; 1: 74.
- Axelsson, E., Willerslev, E., Gilbert, M.T., Nielsen, R. (2008) The effect of ancient DNA damage on inferences of demographic histories. *Mol Biol Evol.* 2008 Oct; 25(10):2181-7.
- Bacsó, R., Facsar, G., Gyulai, F., Bisztray, Gy.D., Velich, I. (2004) Examinations of 600-year-old seeds by means of archaeobotanical and genetical methods. *Int J Hort Sci* 10(4): 79-80.

- Bada, J.L., Wang, X.Y.S., Hamilton, H. (1999) Preservation of key biomolecules in the fossil record: current knowledge and future challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 354: 77–86.
- Baker, A.J., Huynen, L.J., Haddrath, O., Millar, C.D., Lambert, D.M. (2005) Reconstructing the tempo and mode of evolution in an extinct clade of birds with ancient DNA: the giant moas of New Zealand. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 8257-8262.
- Balke, M., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Vilorio, A., Zillikens, A., Steiner, J., García, M., Hendrich, L., Vogler, A.P. (2008) Ancient associations of aquatic beetles and tank bromeliads in the Neotropical forest canopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 29; 105(17):6356-61.
- Banerjee, M., Brown, T.A. (2002) Preservation of nuclear but not chloroplast DNA in archeological assemblages of charred wheat grains. *Ancient Biomolecules* 4: 59–63.
- Bang, H., Kim, S., Leskovaar, D., King, S. (2007) Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene B-cyclase gene. *Mol Breeding* 20:63-72.
- Barakat, H. (1990) Plant remains from El Omari. *Archeologische Veröffentlichungen Deutsches Archäologisches Institut Abteilung im Kairo*, 82. In Debono, F. and Mortensen, B (eds.) El Omari. A Neolithic settlement and other sites in the vicinity of Wadi Hof, Helwan 82: 109-116.
- Barker, D.L., Hansen, M.S., Faruqi, A.F., Giannola, D., Irsula, O.R., Lasken, R.S., Latterich, M., Makarov, V., Oliphant, A., Pinter, J.H., Shen, R., Sleptsova, I., Ziehler, W., Lai, E. (2004) Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res* 14, 901-907.
- Barna, B., Koleda, I. (1971) Bevezetés a genetikába (Egyetemi Jegyzet). Kertészeti Egyetem, Budapest.
- Barnes, I., Matheus, P., Shapiro, B., Jensen, D., Cooper, A. (2002) Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science (New York, N.Y)* 295, 2267-2270.
- Bársony, Cs., Bisztray, Gy. (1996) Koraiság és beltartalmi értékek variabilitásának vizsgálata a Muskotály sárgadinnye fajtánál. *Növénynevelési Tudományos napok. 95'. MTA. Budapest. 1996 Január 22-23. Összefoglalók p. 63.*
- Bársony, Cs., Bisztray, Gy., Dula, B-né. (1995) Fuzárium rászok szerepe a görög és sárgadinnye rezisztencia nemesítésben. *Növénynevelési Tudományos Napok 94'. MTA. Budapest, 1995 január 16-17. Előadások összefoglalói. p.36.*
- Bauhin, C. (1623, reprints 1671) *Pinax Theatri Botanici*. (Basel)
- Bengtsson, CF., Olsen, ME., Brandt, LØ., Bertelsen, MF., Willerslev, E., Tobin, DJ., Wilson, AS., Gilbert, MT. (2011) DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. Volume 194, Issue 1, 20 January 2012, Pages 17–25
- Bennett, CC., Kaestle, FA. (2010) Investigation of ancient DNA from Western Siberia and the Sargat culture. *Hum Biol.* 2010 Apr; 82 (2):143-56.
- Benoit, JN., Quatrehomme, G., Carle, GF., Pognonec, P. (2012) An alternative procedure for extraction of DNA from ancient and weathered bone fragments. *Med Sci Law*. 2012 Nov 15.
- Bernatzky, R., Tanksley, S.D. (1986) Methods for detection of single or low copy quences in tomato on southern blots. *Breed.* 43: 367-375.
- Binladen, J., Gilbert, M.T., Willerslev, E. (2007) 800,000 year old mammoth DNA, modern elephant DNA or PCR artefact? *Biology letters* 3: 55-6; discussion 60-3.biodiversity. London, Chapman & Hall., 256–261.
- Binladen, J., Willerslev, E. (2010) Why study ancient DNA damage? *Journal of Nordic Archaeological Science* 17, pp. 11–14 (2010)
- Bisognin, D.A. (2002) Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Cienc Rural* 32:715-723.
- Bisztray, Gy. (2000a) A dinnye nemesítése. *Medgyesegyházi Dinnyefesztivál, Medgyesegyháza, 2000. augusztus 4-6.*
- Bisztray, Gy. (2000b) Új dinnyefajták előállításának biotechnológiai lehetőségei. *A dinnye ezer éve a hevesi Tájon, Nemzetközi Dinnyetermesztési tanácskozás, Heves. 2000. július 27-29.*
- Bisztray, Gy., Barna, B., Tóth, Á. (1976) A görögdinnye fuzáriumérzékenység vizsgálati módszerek fejlesztése. *Diplomadolgozat KÉE. Budapest. (100 p. +30 p. supplement).*
- Bisztray, Gy.D., Bacsó, R., Bodor, P., Facsar, G., Gyulai, F., Velich, I. (2004a) Archaeobotanical and genetical methods to analyse 600-years-old seeds of horticultural plants. 5th IVCHB Symposium, *In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, 12-17. September 2004, Debrecen, Hungary, *Book of Abstracts Eds.: Fári MG, I Holb*, 212.p.
- Bisztray, Gy.D., Bodor, P., Bacsó, R., Facsar, G., Gyulai, F., Velich, I. (2004b) Microsatellite investigations on archaeological grape seeds. 5th IVCHB Symposium, *In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, 12-17. September 2004, Debrecen, Hungary, *Book of Abstracts. Eds.: Fári MG, I Holb*, 213 p.
- Blake, L.W. (1981) Early Acceptance of Watermelon by Indians of the United States. *Ethnobiology* 1: 193-199.

- Blatter, R.H.E., Jacomet, S., Schlumbaum, A. (2002) Spelt-specific alleles in HMW glutenin genes from modern and historical European spelt (*Triticum spelta* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 329–337.
- Blouin, M.S., Parsons, M., Lacaille, V., Lotz, S. (1996) Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393 - 401.
- Bodor, P., Deák, T., Bacsó, R., Velich, I., Bisztray, Gy.D., Facsar, G., Gyulai, F. (2004) Morphological and genetic investigation of medieval grape seeds. *Proceedings of the 5th In Vitro Culture and Horticultural Breeding Symposium, 12-17. september 2004., Debrecen, Hungary. (ISHS 725)*
- Boeskorov, G. G., Lazarev, P. A., Sher, A. V., Davydov, S., Bakulina, P., Nadezhda, T., Shchelchkova, M. V., Binladen, J., Willerslev, E., Buigues, B., Tikhonov, A. N. (2011) Woolly rhino discovery in the lower Kolyma River. *Quaternary Science Reviews* 30 (2011) 2262e2272
- Boessenkool, S., Epp, L.S., Haile, J., Bellemain, E., Edwards, M., Coissac, E., Willerslev, E., Brochmann, C. (2012) Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Mol Ecol.* 2012 Apr;21(8):1806-15. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05306.x.
- Bogacsi-Szabó, E., Kalmár, T., Csányi, B., Tömöry, Gy., Priskin, Á., Horváth, F., Downes, Cs., Raskó, I. (2006) Mitochondrial DNA of ancient Cumanians: Culturally asian steppe nomadic immigrants with substantially more western Eurasian mitochondrial DNA lineages. *Hum Biol* 77:629-652.
- Bolnick, D.A., Bonine, H.M., Mata-Míguez, J., Kemp, B.M., Snow, M.H., LeBlanc, S.A. (2012). Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. *Am J Phys Anthropol.* 2012 Feb;147(2):293-300. doi: 10.1002/ajpa.21647.
- Bon, C., Berthouaud, V., Fosse, P., Gély, B., Maksud, F., Vitalis, R., Michel, P., van der Plicht, J., Elalouf, J-M. (2011) Low regional diversity of late cave bears mitochondrial DNA at the time of Chauvet Aurignacian paintings. *Journal of Archaeological Science* Volume 38, Issue 8, August 2011, Pages 1886-1895
- Bottjer, D.J., Davidson, E., Peterson, K.J., Cameron, R.A. (2006) Paleogenomics of echinoderms. *Science* 314: 956-960.
- Bouakaze, C., Keyser, C., Amory, S., Crubézy, E., Ludes, B. (2007) First successful assay of Y-SNP typing by SNaPshot minisequencing on ancient DNA. *Int J Legal Med.* 2007 Nov; 121 (6):493-9.
- Bramley, P.M. (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53 (377):2107–2113
- Brewer, S., Cheddadi, R., De Beaulieu, J.L., Reille, M., Data Contributors (2002) The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* 156: 27–48.
- Briggs, A. W., Stenzel, U., Meyer, M., Krause, J., Kircher, M., Paabo, S. (2009) Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38, No. 6 e87
- Briggs, D., Evershed, P.R., Lockheart, M.J. (2000) *The Biomolecular Paleontology of Continental Fossils. Paleobiology*, 26, No. 4, Supplement (Autumn, 2000), pp. 169-193.
- Brown, T.A. (1999) How ancient DNA may help in understanding the origin and spread of agriculture. *Philos T Roy Soc B* 354, 89-97.
- Bunce, M., Worthy, T.H., Ford, T., Hoppitt, W., Willerslev, E., Drummond, A., Cooper, A. (2003) Extreme reversed sexual size dimorphism in the extinct New Zealand moa *Dinornis*. *Nature* 425, 172-175.
- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B. (2000) Palaeogenetics and cultural heritage. Species determination and STR-genotyping from ancient DNA in art and artefacts. *Thermochimica Acta* 365: 141–146.
- Cai, D., Tang, Z., H. Lu., Speller, C. F., Dongya, Y., Ma, X., Cao J., Zhu, H., Zhou, H. (2009) Ancient DNA provides new insights into the origin of the Chinese domestic horse. *Journal of Archaeological Science* Volume 36, Issue 3, March 2009, Pages 835-842
- Callaway, E. (2010) Taking molecular snaps of ancient crops. *Nature*, Published online 13 September 2010,
- Campbell, K. L., Hofreiter, M. (2012) New Life for Ancient DNA. *Scientific American* 307, 46 - 51 (2012)
- Campos, P.F., Craig, O.E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., Gilbert, M.T. (2012) DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194 (1):7-16. doi: 10.1016/j.aanat.2011.07.003.
- Campos, P.F., Craig, O.E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., Gilbert, M.T. (2012) DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194(1):7-16.
- Cano, R.J., Borucki, M.K. (1995) Revival and Identification of Bacterial-Spores in 25-Million-Year-Old to 40-Million-Year-Old Dominican Amber. *Science* 268, 1060-1064.
- Cano, R.J., Poinar, H.N., Pieniazek, N.J., Acra, A., Poinar, G.O., Jr. (1993b) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363, 536-538.
- Cano, R.J., Poinar, H.N., Pieniazek, N.S., Poinar Jr, G.O. (1993a) Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of DNA from 120–135 million year old weevil. *Nat Rev Genet* 363, 536–538.
- Cano, R.J., Poinar, H.N., Poinar Jr, G.O. (1992a) Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25-40 million year old amber. *Med. Sci. Res.* 20, 249–251.

- Cano, R.J., Poinar, H.N., Roublik, D.W., Poinar Jr, G.O. (1992b) Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18S rRNA gene of the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) isolated from 25-40 million year old Dominican amber. *Med. Sci. Res.* 20, 619–622.
- Cappellini, E., Gilbert, M.T., Geuna, F., Fiorentino, G., Hall, A., Thomas-Oates, J., Ashton, P.D., Ashford, D.A., Arthur, P., Campos, P.F., Kool, J., Willerslev, E., Collins, M.J. (2010) A multidisciplinary study of archaeological grape seeds. *Naturwissenschaften* (2010) 97:205–217
- Caramelli, D., Milani, L., Vai, S., Modi, A., Pecchioli, E., Girardi, M., Pilli, E., Lari, M., Lippi, B., Ronchitelli, A., Mallegni, F., Casoli, A., Bertorelle, G., Barbujani, G. (2008) A 28,000 years old Cro-Magnon mtDNA sequence differs from all potentially contaminating modern sequences. *PLoS ONE*. 2008 Jul 16; 3 (7):e2700.
- Carter, H., Mace, A.C. (1977) *The Discovery of the Tomb of Tutankhamen*. Courier Dover Publications, pp 231. London. ISBN 0486235009, 9780486235004.
- Cavalli-Sforza, L.L., Piazza, A. (2003) Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *Eur J Hum Genet.* 1993;1(1):3-18.
- Chalfoun, D.J., Tuross, J. (1999) Botanical remains: utility in protein and DNA research. *Ancient Biomolecules* 3: 67–79.
- Chapco, W., Litzenberger, G. (2004) A DNA investigation into the mysterious disappearance of the Rocky Mountain grasshopper, mega-pest of the 1800s. *Mol Phylogenet Evol.* 2004 Mar; 30 (3):810–4.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y-L., Kron, K.A., Rettig, J.H., Conti, E., Palmer, J.D., Manhart, J.R., Sytsma, K.J., Michaels, H.J., Kress, W.J., Karol, K.G., Clark, W.D., Hedrén, M., Gaut, B.S., Jansen, R.K., Kim, K-J., Wimpee, C.F., Smith, J.F., Furnier, G.R., Strauss, S.H., Xiang, Q-Y., Plunkett, G.M., Soltis, P.S., Swensen, S.M., Williams, S.E., Gadek, P.A., Quinn, C.J., Eguiarte, L.E., Golenberg, E., Learn, G.H. Jr, Graham, S.W., Barrett, S.C.H., Dayanadan, S., Albert, V. (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528–580.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., Higuchi, R. (1994) Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA. *P Natl Acad Sci USA* 91, 5695-5699.
- Clack, A.A., Macphee, R.D., Poinar, H.N. (2012) Case study: ancient sloth DNA recovered from hairs preserved in paleofeces. *Methods Mol Biol.* 2012;840:51-6.
- Cooper, A., Drummond, A.J., Willerslev, E. (2004) Ancient DNA: Would the real neandertal please stand up? *Curr Biol* 14, R431-R433.
- Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J., Ward, R. (2001a) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409, 704-707.
- Cooper, A., Mourer-Chauvire, C., Chambers, G.K., Von Haeseler, A., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1992) Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8741-8744.
- Cooper, A., Poinar, H.N. (2000) Ancient DNA: Do it right or not at ALL. *Science* 289, 1139-1139.
- Cooper, A., Rambaut, A., Macaulay, V., Willerslev, E., Hansen, A.J., Stringer, C. (2001b) Human origins and ancient human DNA. *Science* 292, 1655-1656.
- Crubézy, E., Amory, S., Keyser, C., Bouakaze, C., Bodner, M., Gibert, M., Röck, A., Parson, W., Alexeev, A., Ludes, B. (2010) Human evolution in Siberia: from frozen bodies to ancient DNA. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:25
- Cunningham Jr, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., Gantt, E. (1996) Functional Analysis of the B and E Lycopene Cyclase Enzymes of *Arabidopsis* Reveals a Mechanism for Control of Cyclic Carotenoid Formation. *Plant Cell* 8: 1613-1626.
- Csapó, J. (2000) *Élelmiszerkémia. Egyetemi Jegyzet, Kaposvár*, 370.
- Dakin, E.E., Avise, J.C. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504 – 509.
- Dane, F., Lang, P., Bakhtiyarova, R. (2004) Comparative analysis of chloroplast DNA variability in wild and cultivated *Citrullus* species. *Theor Appl Genet* 108: 958-966.
- Dane, F., Liu, C.J. (2007) Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). *Genet Resour Crop Evol* 54: 1255-1265.
- Danin-Poleg, Y., Reis, N., Tzuri, G., Katzir, N. (2001) Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor Appl Genet* 1002: 61-72.
- de Bruyn, M., Hoelzel, A.R., Carvalho, G.R., Hofreiter, M. (2011) Faunal histories from Holocene ancient DNA. *Trends in Ecology and Evolution* August 2011, Vol. 26, No. 8
- De Winter, B. (1990) A new species of *Citrullus* (Benincaseae) from the Namib Desert, Namibia. *Bothalia* 20:209–211.
- Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L.H., Wu, X.H., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z.Y., Zong, Q.L., Du, Y.F., Du, J., Driscoll, M., Song, W.M., Kingsmore, S.F., Egholm, M., Lasken, R.S. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *P Natl Acad Sci USA* 99, 5261-5266.

- Debruyne R, Chu G, King Ce, Bos K, Kuch M, Schwarz C, Szpak P, Gröcke Dr, Matheus P, Zazula G, Guthrie D, Froese D, Buigues B, De Marliave C, Flemming C, Poinar D, Fisher D, Southon J, Tikhonov An, Macphee Rd, Poinar Hn. (2008b) Out of America: ancient DNA evidence for a new world origin of late quaternary woolly mammoths. *Curr Biol.* 2008 Sep 9; 18 (17):1320-6.
- Debruyne, R., Barriel, V. (2006) Biological evolution and ancient DNA. *M S-Medecine Sciences* 22: 502-506.
- Debruyne, R., Barriel, V., Tassy, P. (2003) Mitochondrial cytochrome b of the Lyakhov mammoth (Proboscidea, Mammalia): new data and phylogenetic analyses of Elephantidae. *Mol Phylogenet Evol* 26, 421-434.
- Debruyne, R., Schwarz, C., Poinar, H. (2008a) Comment on "Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts". *Science.* 2008 Nov 7; 322 (5903):857; author reply 857.
- Deguilloux, M.-F., Pemonge, M.-H., Bertel, L., Kremer, A., Petit, R. (2003) Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Molecular Ecology* 12: 1629–1636.
- Deguilloux, M.-F., Pemonge, M.-H., Petit, R. (2002) Novel perspectives in wood certification and forensics: dry wood as a source of DNA. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 269: 1039–1046.
- Deguilloux, M.-F., Pemonge, M.-H., Petit, R. (2004) DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Annals of Forest Science* 61: 97–104.
- Deguilloux, MF., Ricaud, S., Leahy, R., Pemonge, MH. (2011) Analysis of ancient human DNA and primer contamination: One step backward one step forward. *Forensic Science International Volume 210, Issues 1-3, 15 July 2011, Pages 102-109*
- den Tex, RJ., Maldonado, JE., Thorington, R., Leonard, JA. (2010) Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. *Genetica.* 2010 Oct; 138(9-10):979-84. Epub 2010 Aug 11.
- Desalle, R. (1994). Implications of Ancient DNA for Phylogenetic Studies. *Experientia* 50, 543-550.
- Desalle, R., Barcia, M., Wray, C. (1993). Pcr Jumping in Clones of 30-Million-Year-Old DNA Fragments from Amber Preserved Termites (*Mastotermes-Electrodominicus*). *Experientia* 49, 906-909.
- Desalle, R., Gatesy, J., Wheeler, W., Grimaldi, D. (1992). DNA-Sequences from a Fossil Termite in Oligomiocene Amber and Their Phylogenetic Implications. *Science* 257, 1933-1936.
- Dickson, J.H., Oeggl, K., Handley, L.L. (2003) The iceman reconsidered. *Sci Am.* 2003 May; 288 (5):70-9.
- Dickson, J.H., Oeggl, K., Holden, T.G., Handley, L.L., O'connell, T.C., Preston, T. (2000) The omnivorous Tyrolean Iceman: colon contents (meat, cereals, pollen, moss and whipworm) and stable isotope analyses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2000 Dec 29; 355 (1404):1843-9.
- Duarte, C., Mauricio, J., Pettitt, P.B., Souto, P., Trinkaus, E., Van Der Plicht, H., Zilhao, J. (1999) The early Upper Paleolithic human skeleton from the Abrigo do Lagar Velho (Portugal) and modern human emergence in Iberia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7604-7609.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.-H., Gielly, L., Taberlet, P., Petit, R. (1999) Amplification of oak DNA from ancient and modern wood. *Molecular Ecology* 8: 2137–2140.
- Eglinton, G., Logan, G.A. (1991) Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333: 315-327; discussion 327-318.
- Elena, H., Peyron, O., Bonnefille, R., Jolly, D., Cheddadi, R., Guiot, J., Andrieu, V., Bottema, S., Buchet, G., De Beaulieu, J.-L., Hamilton, A.C., Maley, J., Marchant, R., Perez-Obiol, R., Reille, M., Riollet, G., Scott, L., Straka, H., Taylor, D., Van Campo, E., Vincens, A., Laarif, F., Jonson, (2000) Pollen-based biome reconstruction for southern Europe and Africa 18000 yr BP. *Journal of Biogeography* 27: 621–634.
- Enflo, P., Hawks, J., Wolpoff, M. (2001) A simple reason why Neanderthal ancestry can be consistent with current DNA information. *American Journal Of Physical Anthropology* 114, 62.
- Ermini, L., Olivieri, C., Rizzi, E., Corti, G., Bonnal, R., Soares, P., Luciani, S., Marota, I., De Bellis, G., Richards, M.B., Rollo, F. (2008) Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Curr Biol.* 2008 Nov 11; 18 (21):1687-93.
- Ferris, C., Oliver, R.P., Davy, A.J., Hewitt, G. (1993) Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Molecular Ecology* 2: 337–344.
- Fischer, H. (1929) *Mittelalterliche Pflanzenkunde.* München: Verlag der Münchner Drucke.
- Fish, S.A., Shepherd, T.J., Mcgenity, T.J., Grant, W.D. (2002) Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. *Nature* 417, 432-436.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Ziegenhagen, B., Markussen, (2004) Identification of transgenes from wood of genetically transformed poplar trees. *Journal of Wood Science and Technology* 38: 207–215.
- Flannery, K.V. (1973) The origins of agriculture. *Annual Review of Anthropology* 2: 271-310
- Fletcher, H.A., Donoghue, H.D., Holton, J., Pap, I., Spigelman, M. (2003) Widespread occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from 18th-19th century Hungarians. *Am J Phys Anthropol* 120, 144-152.
- Forstén, A. (1992) Mitochondrial-DNA timetable and the evolution of *Equus*: Comparison of molecular and paleontological evidence. *Ann. Zool. Fennici* 28: 301-309.

- Freitas, F.O., Bendel, G., Allaby, R.G., Brown, T.A. (2003) DNA from primitive maize landraces and archeological remains: implications for the domestication of maize and its expansion into South America. *Journal of Archeological Science* 30: 901–908.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press. 698 pp.
- Fulton, T.L., Stiller, M. (2012) PCR amplification, cloning, and sequencing of ancient DNA. *Methods Mol Biol.* 2012;840:111-9.
- Garcia-Mas, J., Monforte, A.J., Arus, P. (2004) Phylogenetic relationships among Cucumis species based on the ribosomal internal transcribed spacer sequence and microsatellite markers. *Plant Systematics and Evolution* 248, 191-203.
- Gaut, B.S., Morton, B.R., Mccaig, B.C., Clegg, M.T. (1996) Substitution rate comparisons between grasses and palms: Synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcl*. *Proc Natl Acad Sci* 93: 10274–10279.
- Gibbons, A. (2005) Ancient DNA - New methods yield Mammoth samples. *Science* 310: 1889-1889.
- Gigli, E., Rasmussen, M., Civit, S., Rosas, A., de la Rasilla, M., Fortea, J., Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Lalueza-Fox, C. (2009) An improved PCR method for endogenous DNA retrieval in contaminated Neandertal samples based on the use of blocking primers. *Journal of Archaeological Science* Volume 36, Issue 12, December 2009, Pages 2676-2679
- Gilbert, M.T., Binladen, J., Miller, W., Wiuf, C., Willerslev, E., Poinar, H., Carlson, J.E., Leebens-Mack, J.H., Schuster, S.C. (2007) Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Res* 35: 1-10.
- Gilbert, M.T., Drautz, D.I., Lesk, A.M., Ho, S.Y., Qi, J., Ratan, A., Hsu, C.H., Sher, A., Dalén, L., Götherström, A., Tomsho, L.P., Rendulic, S., Packard, M., Campos, P.F., Kuznetsova, T.V., Shidlovskiy, F., Tikhonov, A., Willerslev, E., Iacumin, P., Buigues, B., Ericson, P.G., Germonpré, M., Kosintsev, P., Nikolaev, V., Nowak-Kemp, M., Knight, J.R., Irzyk, G.P., Perbost, C.S., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Miller, W., Schuster, S.C. (2008a) Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jun 17; 105 (24):8327-32.
- Gilbert, M.T., Hansen, A.J., Willerslev, E., Rudbeck, L., Barnes, I., Lynnerup, N., Cooper, A. (2003a) Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *AM J HUM GENET* 72, 48-61.
- Gilbert, M.T., Kivisild, T., Gronnow, B., Andersen, P.K., Metspalu, E., Reidla, M., Tamm, E., Axelsson, E., Götherström, A., Campos, P.F., Rasmussen, M., Metspalu, M., Higham, T.F., Schwenninger, J.L., Nathan, R., De Hoog, C.J., Koch, A., Moller, L.N., Andreasen, C., Meldgaard, M., Villems, R., Bendixen, C., Willerslev, E. (2008c) Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. *Science.* 2008 Jun 27; 320 (5884):1787-9.
- Gilbert, M.T., Shapiro, B., Drummond, A., Cooper, A. (2005) Post-mortem DNA damage hotspots in Bison (*Bison bison*) provide evidence for both damage and mutational hotspots in human mitochondrial DNA
- Gilbert, M.T., Tomsho, L.P., Rendulic, S., Packard, M., Drautz, D.I., Sher, A., Tikhonov, A., Dalén, L., Kuznetsova, T., Kosintsev, P., Campos, P.F., Higham, T., Collins, M.J., Wilson, A.S., Shidlovskiy, F., Buigues, B., Ericson, P.G., Germonpré, M., Götherström, A., Iacumin, P., Nikolaev, V., Nowak-Kemp, M., Willerslev, E., Knight, J.R., Irzyk, G.P., Perbost, C.S., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Miller, W., Schuster, S.C. (2008b) Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science.* 2007 Sep 28; 317 (5846):1927-30.
- Gilbert, M.T., Willerslev, E., Hansen, A.J., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N., and Cooper, A. (2003b). Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 72, 32-47.
- Gilmore, M.R. (1919) *Uses of plants by the Indians of the Missouri river region*. Univ. of Nebraska Press, Lincoln. (reprints from the 33rd Annu. Report Bur. Amer. Rthn., Washington, 1977).
- Ginolhac, A., Vilstrup, J., Stenderup, J., Rasmussen, M., Stiller, M., Shapiro, B., Zazula, G., Froese, D., Steinmann, K. E., Thompson, J. F., AL-Rasheid, K. A. S., Gilbert, T., M. P., Willerslev, E., Orlando, L. (2012) Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA. *BMC Genomics* 2012, 13:177
- Gismondi, A., Rolfo, M.F., Leonardi, D., Rickards, O., Canini, A. (2012) Identification of ancient *Olea europaea* L. and *Cornus mas* L. seeds by DNA barcoding. *C R Biol.* 2012 Jul;335(7):472-9. Epub 2012 Jun 29.
- Giuliano, G., Aquilani, R., Dharmapuri, S. (2000) Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends Plant Sci* 5:406–409
- Godefroit, P., Golovneva, L., Shchepetov, S., Garcia, G., Alekseev, P. (2008) The last polar dinosaurs: high diversity of latest Cretaceous arctic dinosaurs in Russia. *Naturwissenschaften.* 2008 Dec 16.
- Goldstein, D.N., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman M.W. (1995) An Evaluation of Genetic Distances for Use With Microsatellite Loci. *Genetics* 139:463-471.

- Golenberg, E.M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D., Zurawski, G. (1990) Chloroplast DNA-Sequence from a Miocene Magnolia Species. *Nature* 344, 656-658.
- Goloubinoff, P., Pääbo, S., Wilson, A.C. (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an Adh2 gene segment from archeological specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1997-2001.
- Gorman, C. (1970) Excavations at Spirit Cave, North Thailand: Some interim interpretations. *Asian Perspectives* 13: 79-107
- Gorman, C. (1971) The Hoabinhian and After: Subsistence Patterns in Southeast Asia during the Late Pleistocene and Early Recent Periods. *World Archeology* 2: 300-20.
- Gorman, C.F. (1969) Hoabinhian: A pebble-tool complex with early plant associations in Southeast Asia. *Science*, 671-673.
- Gould, B.A., León, B., Buffen, A.M., Thompson, L.G. (2010) Evidence Of A High-Andean, Mid-Holocene Plant Community: An Ancient Dna Analysis Of Glacially Preserved Remains. *American Journal of Botany* 97(9): 1579–1584. 2010.
- Gowda, M., Li, H., Alessi, J., Chen, F., Pratt, R., Wang G.-L. (2006) Robust analysis of 5'-transcript ends (5'-RATE): a novel technique for transcriptome analysis and genome annotation. *Nucleic Acids Res.* 34: e126.
- Gravlund, P., Aaris-Sørensen, K., Hofreiter, M., Meyer, M., Bollback, J.P., Noe-Nygaard, N. (2012) Ancient DNA extracted from Danish aurochs (*Bos primigenius*): genetic diversity and preservation. *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194(1):103-11. Epub 2011 Nov 17.
- Green, R.E., Malaspinas, A.S., Krause, J., Briggs, A.W., Johnson, P.L., Uhler, C., Meyer, M., Good, J.M., Maricic, T., Stenzel, U., Prüfer, K., Siebauer, M., Burbano, H.A., Ronan, M., Rothberg, J.M., Egholm, M., Rudan, P., Brajković, D., Kučan, Z., Gusić, I., Wikström, M., Laakkonen, L., Kelso, J., Slatkin, M., Pääbo, S. (2008) A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell.* 2008 Aug 8; 134(3):416-26.
- Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M.H., Hansen, N.F., Durand, E.Y., Malaspinas, A.S., Jensen, J.D., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, H.A., Good, J.M., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm, M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Doronichev, V.B., Golovanova, L.V., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, R.W., Johnson, P.L., Eichler, E.E., Falush, D., Birney, E., Mullikin, J.C., Slatkin, M., Nielsen, R., Kelso, J., Lachmann, M., Reich, D., Pääbo, S. (2010) A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 328, 710 (2010);
- Greenwood, A.D., Capelli, C., Possnert, G., Pääbo, S. (1999) Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna. *Mol Biol Evol* 16, 1466-1473.
- Greenwood, A.D., Castresana, J., Feldmaier-Fuchs, G., Pääbo, S. (2001a) A molecular phylogeny of two extinct sloths. *Mol Phylogenet Evol* 18, 94-103.
- Greenwood, A.D., Lee, F., Capelli, C., Desalle, R., Tikhonov, A., Marx, P.A., Macphee, R.D. (2001b) Evolution of endogenous retrovirus-like elements of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) and its relatives. *Mol Biol Evol* 18, 840-847.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.F., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (1996) *Introduction to Genetic Analysis*, 5th Edition. W.H. Freeman, New York.
- Gugerli, F., Parducci, L., Petit, R.J. (2005) Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytol* 166, 409-418.
- Gutiérrez, G., Marín, A. (1998) The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems. *Mol Biol Evol.* 1998 Jul;15(7):926-9.
- Gyulai, G., Humphreys, M., Bittsánszky, A., Skot, K., Kiss, J., Skot, L., Gullner, G., Heywood, S., Szabó, Z., Lovatt, A., Radimszky, L., Roderick, H., Abberton, M., Rennenberg, H., Kómíves, T., Heszky, L. (2005) AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshI-poplar clones (*Populus canescens* L.) in vitro. *Z. Naturforschung* 60c:300-306.
- Gyulai, G., Humphreys, M., Lagler, R., Szabó, 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.
- Gyulai, G. (ed.) (2011) *Plant Archaeogenetics*. Nova Science Publisher Inc. New York, USA. ISBN 978-1-61122-644-7.
- Gyulai, G., Janovszky, J., Kiss, E., Lelik, L., Csillag, A., Heszky, L. (1992) Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordia of the intergeneric hybrid *Agropyron repens* (L.) Beauv. x *Bromus inermis* Leyss. cv. nanus on a modified nutritive medium. *Plant Cell Report* 11, 266-269.
- Gyulai, G., Jekkel, Z., Kiss, E., Kiss, J., Heszky, L. (1995) A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation in vitro. *J Plant Physiol* 145: 379-382.
- Haddrath, O., Baker, A.J. (2001) Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society London B* 268, 939–945.

- Hagelberg, E., Sykes, B., Hedges, R. (1989) Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342:485.
- Hagelberg, E., Thomas, M.G., Cook, C.E., Jr., Sher, A.V., Baryshnikov, G.F., Lister, A.M. (1994) DNA from ancient mammoth bones. *Nature* 370, 333-334.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T. (1982) Novel Repeated Element with Z-DNA-Forming Potential is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6465-69.
- 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.
- Handt O., Krings M., Ward R. H., Pääbo S. (1996) The retrieval of ancient human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics* 59, 368–76.
- Handt, O., Hoss, M., Krings, M., Pääbo, S. (1994a) Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 50, 524-529.
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorf, M., Kilger, C., Simanainen, J., Georgiev, O., Bauer, K., Stone, A., Hedges, R., Schaffner, W., Utermann, G., Sykes, B., Pääbo, S. (1994b) Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 264:1775-1778
- Hanelt, P. (2001) Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural crops. Vol. 1-6 (P. Hanelt, ed.). (Vol. 3: p.1534) First English edition. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.
- Hansen, A., Willerslev, E., Wiuf, C., Mourier, T., Arctander, P. (2001) Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Molecular Biology and Evolution* 18, 262– 65.
- Harlan, J. (1971) Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174, 468-473.
- Hartyányi, P., Nováki, Gy. (1975) Samen- und fruchtfunde in Ungarn von der neusteinzeit bis zum 18. Jahrhundert. *Agrártört Szemle, Budapest* 17: 1-88.
- Hashizume, T., Shimamoto, I., Harusima, T., Yui, M., Sato, T., Imai, T., Hirai, M. (1996) Construction of a linkage map for watermelon (*Citrullus lanatus*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Euphytica* 90:265–273.
- Hashizume, T., Shimamoto, I., Hirai, M. (2003) Construction of a linkage map and QTL analysis of horticultural traits for watermelon [*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM & NAKAI] using RAPD, RFLP and ISSR markers. *Theor Appl Genet.* 2003 Mar; 106 (5):779-85.
- Hawks, J.D., Wolpoff, M.H. (2001) The accretion model of Neandertal evolution. *Evolution Int J Org Evolution* 55, 1474-1485.
- Hebsgaard, M. B., Gilbert, M. T. P., Arneborg, J., Heyn, P. M., Allentoft, M. E., Bunce, M., Munch, K., Schweger, C., Willerslev, E. (2008) “The Farm Beneath the Sand” - An Archeological Case Study on Ancient “Dirt” DNA. *Antiquity*.
- Hebsgaard, M.B., Wiuf, C., Gilbert, M.T.P., Glenner, H., Willerslev, E. (2007). Evaluating neanderthal genetics and phylogeny. *J Mol Evol* 64, 50-60.
- Henderson, W.R., Scott, G.H., Wehner, T.C. (1998) Interaction of flesh color genes in watermelon. *J Heredity* 89: 50–53
- Heupink, TH., Huynen, L., Lambert, DM. (2011) Ancient DNA Suggests Dwarf and ‘Giant’ Emu Are Conspicuous. *PLoS ONE* 6(4): e18728. doi:10.1371/journal.pone.0018728
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiburger, M., Ryder, O.A., Wilson, A.C. (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 282-284.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 66:411-453
- Hirschberg, J. (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4:210–218
- Ho S.Y.W., Heupink, T.H., Rambaut, A., Shapiro, B. (2007) Bayesian Estimation of Sequence Damage in Ancient DNA. *Mol Biol Evol* 24:1416-1422.
- Ho, P.-T. (1977) The indigenous origins of Chinese agriculture. *Origins of Agriculture* (Ed) Reed CA, Mouton, Publ., Paris., 413-418.
- Hodkinson, T., Waldren, S., Parnell, J., Kelleher, C., Salamin, K., Salamin, N. (2007) DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation. *J Plant Res.* 2007 Jan; 120 (1):17-29.
- Hofreiter, M. (2007) Pleistocene extinctions: haunting the survivors. *Curr Biol.* 2007 Aug 7; 17 (15): R609-11.
- Hofreiter, M. (2008) DNA sequencing: Mammoth genomics. *Nature.* 2008 Nov 20; 456 (7220):330-1.
- Hofreiter, M. (2011) Special issue ancient DNA. *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194(1):1-2.
- Hofreiter, M., Betancourt, J.L., Sbriller, A.P., Markgraf, V., McDonald, H.G. (2003b) Phylogeny, diet, and habitat of an extinct ground sloth from Cuchillo Cura, Neuquen Province, southwest Argentina. *Quaternary Research* 59, 364–378
- Hofreiter, M., Capelli, C., Krings, M., Waits, L., Conard, N., Munzel, S., Rabeder, G., Nagel, D., Paunovic, M., Jambresic, G., Meyer, S., Weiss, G., Pääbo, S. (2002) Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial

- DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of late pleistocene cave bears. *Mol Biol Evol* 19, 1244-1250.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Haeseler, A. Von, Pääbo, S. (2001) DNA sequences from multiple amplifications reveal artefacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research* 29:4793-4799.
- Hofreiter, M., Mead, J.I., Martin, P., Poinar, H.N. (2003a) Molecular caving. *Curr Biol* 13, R693-R695.
- Hofreiter, M., Poinar, H.N., Spaulding, W.G., Bauer, K., Martin, P.S., Possnert, G., Pääbo, S. (2000) A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Mol Ecol* 9, 1975-1984.
- Hoss, M., Dilling, A., Carrant, A., Pääbo, S. (1996b) Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwini*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 181-185.
- Hoss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroglu, M., Pääbo, S. (1996a) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24, 1304-1307.
- Hoss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F., Schroder, W. (1992) Excrement Analysis by Pcr. *Nature* 359, 199-199.
- Hoss, M., Pääbo, S., Vereshchagin, N.K. (1994) Mammoth DNA-Sequences. *Nature* 370: 333-333.
- Hsiao, C., Chatterton, N.J., Asay, K.H., Jensen, K.B. (1995) Phylogenetic-Relationships of the Monogenic Species of the Wheat Tribe, Triticeae (Poaceae), Inferred from Nuclear Rdna (Internal Transcribed Spacer) Sequences. *Genome* 38, 211-223.
- Huynen, L., Gill, B.J., Millar, C.D., Lambert, D.M. (2009) Ancient DNA reveals extreme egg morphology and nesting behavior in New Zealand's extinct moa. *PNAS* September 14, 2010 | vol. 107 | no. 37 | 16201-16206
- Huynen, L., Millar, C.D., Scofield, R.P., Lambert, D.M. (2003) Nuclear DNA sequences detect species limits in ancient moa. *Nature* 425, 175-178.
- Huynen, L., Millar, C.D., Lambert, D.M. (2012). Resurrecting ancient animal genomes: The extinct moa and more. *Bioessays*. 2012 Aug; 34(8):661-9. doi: 10.1002/bies.201200040. Epub 2012 Jun 6.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., Gyllensten, U. (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408, 708-713.
- Isaacson, T., Ohad, G.I., Beyer, P., Hirschberg, J. (2004) Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol* 136:4246-4255
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., Hirschberg, J. (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of b-carotene and xanthophylls in plants. *The Plant Cell* 14:333-342
- Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44: 223-270.
- Jaenicke-Despres, V., Buckler, E.S., Smith, B.D., Gilbert, M.T., Cooper, A., Doebley, J., Pääbo, S. (2003) Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 302, 1206-1208.
- Jahren, A.H., Petersen, G., Seberg, O. (2004) Plant DNA: a new substrate for carbon stable isotope analysis and a potential paleoenvironmental indicator. *Geology* 32: 241-244.
- Janick, J. (2004) Caravaggio's fruit. A mirror on Baroque horticulture. *Chronica Horticulturae* 44(4):9-15.
- Janick, J., Paris, H.S. (2006) The Cucurbit Images (1515-1518) of the Villa Farnesina, Rome. *Annals of Botany* 97: 165-176.
- Janick, J., Paris, H.S., Parrish, D.C. (2007) The Cucurbits of Mediterranean Antiquity: Identification of Taxa from Ancient Images and Descriptions. *Annals of Botany*: 100: 1441-1457.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429.
- Jarret, R.L., Merrick, L.C., Holms, T., Evans, J., Aradhya, M.K. (1997) Simple sequence repeats in watermelon *Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum & Nakai. *Genome* 40:433-441.
- Jeffreys, A.J. (1987) Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem Soc Trans* 15:309-317.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Johnson, S.S., Hebsgaard, M.B., Christensen, T.R., Mastepanov, M., Nielsen, R., Munch, K., Brand, T., Gilbert, M.T., Zuber, M.T., Bunce, M., Ronn, R., Gilichinsky, D., Froese, D., Willerslev, E. (2008) Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10631.
- Jørgensen, T., Haile, J., Möller, P., Andreev, A., Boessenkool, S., Rasmussen, M., Kienast, F., Coissac, E., Taberlet, P., Brochmann, C., Bigelow, N.H., Andersen, K., Orlando, L., Gilbert, M.T., Willerslev, E. (2012) A comparative study of ancient sedimentary DNA, pollen and microfossils from permafrost sediments of northern Siberia reveals long-term vegetational stability. *Mol Ecol*. 2012 Apr;21(8):1989-2003.
- Kaessmann, H., Wiebe, V., Weiss, G., Pääbo, S. (2001) Great ape DNA sequences reveal a reduced diversity and an expansion in humans. *Nat Genet* 27, 155-156.

- Kalmár, T., Bachrati, C.Z., Marcsik, A., Rasko, I. (2000) A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res.* 28(12):E67.
- Kanda, T. (1951) The inheritance of seed-coat colouring in the watermelon. *Jpn J Genet* 7: 30–48.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U., Cregan, B.P. (1996) Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet* 93: 1282–1290.
- Keng, H. (1974) Economic Plants of Ancient North-China as Mentioned in Shih-Ching (Book of Poetry). *Econ Bot* 28, 391-410.
- Kihara, H. (1951) Triploid watermelons. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 58:217-230.
- Kim, S., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Suh, Y. (2004) DNA sequences from Miocene fossils: an *ndhF* sequence of *Magnolia latahensis* (Magnoliaceae) and an *rbcL* sequence of *Persea pseudocarolinensis* (Lauraceae). *American Journal of Botany* 91: 615–620.
- Kimura, B., Marshall, F.B., Chen, S., Rosenbom, S., Moehlman, P.D., Tuross, N., Sabin, R.C., Peters, J., Barich, B., Yohannes, H., Kebede, F., Teclai, R., Beja-Pereira, A., Mulligan, C.J. (2010) Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proc. R. Soc. B* 7 January 2011 vol. 278 no. 1702 50-57
- King, G. A., Gilbert, M., Thomas, P., Willerslev, E., Collins M. J., Kenward H. (2009) Recovery of DNA from archaeological insect remains: first results, problems and potential. *Journal of Archaeological Science* 36 (2009) 1179–1183
- Kirsanow, K., Burger, J. (2012) Ancient human DNA. *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194(1):121-32. Epub 2011 Nov 18.
- Kistler L., Shapiro, B. (2011) Ancient DNA confirms a local origin of domesticated chenopod in eastern North America. *Journal of Archaeological Science* Volume 38, Issue 12, December 2011, Pages 3549–3554
- Kistler, L. (2012) Ancient DNA extraction from plants. *Methods Mol Biol.* 2012;840:71-9. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9_10.
- Kittler, R., Stoneking, M., Kayser, M. (2002) A whole genome amplification method to generate long fragments from low quantities of genomic DNA. *Anal Biochem* 300, 237-244.
- Koch, M.A., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. (2000) Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and related genera (Brassicaceae). *Mol Biol Evol* 17: 1483–1498.
- Krajewski, C., Buckley, L., Westerman, M. (1997) DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved. *Proc Biol Sci* 264, 911-917.
- Krajewski, C., Driskell, A.C., Baverstock, P.R., Braun, M.J. (1992) Phylogenetic relationships of the thylacine (Mammalia: Thylacinidae) among dasyuroid marsupials: evidence from cytochrome b DNA sequences. *Proc Biol Sci* 250, 19-27.
- Krause, J., Dear, P.H., Pollack, J.L., Slatkin, M., Spriggs, H., Barnes, I., Lister, A.M., Ebersberger, I., Pääbo, S., Hofreiter, M. (2006) Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature* 439: 724-7.
- Krause, J., Unger, T., Noçon, A., Malaspinas, A.S., Kolokotronis, S.O., Stiller, M., Soibelzon, L., Spriggs, H., Dear, P.H., Briggs, A.W., Bray, S.C., O'Brien, S.J., Rabeder, G., Matheus, P., Cooper, A., Slatkin, M., Pääbo, S., Hofreiter, M. (2008) Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary. *BMC Evol Biol.* 2008 Jul 28; 8:220.
- Krings, M., Capelli, C., Tschentscher, F., Geisert, H., Meyer, S., Von Haeseler, A., Grossschmidt, K., Possnert, G., Paunovic, M., Pääbo, S. (2000). A view of Neandertal genetic diversity. *Nat Genet* 26, 144-146.
- Krings, M., Geisert, H., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Pääbo, S. (1999) DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the neandertal type specimen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5581-5585.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M., Pääbo, S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90, 19-30.
- Kuch, M., Rohland, N., Betancourt, J.L., Latorre, C., Stepan, S., Poinar, H.N. (2002) Molecular analysis of a 11,700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile. *Molecular Ecology* 11: 913–924.
- Kutil, B.L., Williams, C.G. (2001) Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. *J Heredity* 92:327–332.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates *Nucl Acid Res* 21:1111-15.
- Lágler, R. (2007) A köles (*Panicum miliaceum*): ISSR and SSR szekvencia stabilitása középkor óta. PhD Értekezés. SZIE, Gödöllő. Témavezető: Gyulai G.
- Lágler, R., Gyulai, G., Humphreys, M., Szabó, Z., Horváth, L., Bittsánszky, A., Kiss, J., Holly, J., 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 archeological samples excavated from the 4th and 15th centuries. *Hung Agric Res* 2006/1:14-19.
- Lambert, D.M., Ritchie, P.A., Millar, C.D., Holland, B., Drummond, A.J., Baroni, C. (2002) Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science* 295, 2270–73.
- Lamers, R., Hayter, S., Matheson, C.D. (2009) Postmortem miscoding lesions in sequence analysis of human ancient mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 2009 Jan;68(1):40-55.
- Lascoux, M., Palmé, A.E., Cheddadi, R., Latta, R.G. (2004) Impact of Ice Ages on the genetic structure of trees and shrubs. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 359: 197–207.
- Lehtonen, S., Christenhusz, M.J.M. (2010) Historical herbarium specimens in plant molecular systematics – an example from the fern genus *Lindsaea* (*Lindsaeaceae*). *Biologia* 65/2: 204–208, 2010 Section Botany
- Leino, M. W., Hagenblad, J. (2010) Nineteenth Century Seeds Reveal the Population Genetics of Landrace Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* 27(4):964–973. 2010
- Leino, M. W., Hagenblad, J., Edqvist, J., Strese, E-M. K., (2009) DNA preservation and utility of a historic seed collection. *Seed Science Research / Volume 19 / Issue 03 / September 2009*, pp 125-135
- Leino, M.W., Hagenblad, J., Edqvist, J., Strese, E-M. (2009) DNA preservation and utility of a historic seed collection. *Seed Science Research* (2009), 19: 125-135
- Leonard, J.A., Rohland, N., Glaberman, S., Fleischer, R.C., Caccione, A., Hofreiter, M. (2005) A rapid loss of stripes: the evolutionary history of the extinct quagga. *Biol Lett.* 2005 Sep 22; 1(3):291-5.
- Leonard, J.A., Wayne, R.K., Cooper, A. (2000) Population genetics of ice age brown bears. *P Natl Acad Sci USA* 97, 1651-1654.
- Lerman J. C. & E. M. Cigliano (1971) New Carbon-14 Evidence for Six Hundred Years Old *Canna compacta* Seed. *Nature* 232, 568 - 570 (20 August 1971)
- Levi, A., Thomas, C.E., Keinath, A.P., Wehner, T.C. (2001) Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 559–566
- Li, C., Lister, D. L., Li, H., Xu, Y., Cui, Y., Bower, M. A., Jones, M. K., Zhou, H. (2011) Ancient DNA analysis of desiccated wheat grains excavated from a Bronze Age cemetery in Xinjiang. *Journal of Archaeological Science* 38 (2011) 115e119
- Liepelt, S., Bialozyt, R., Ziegenhagen, B. (2002) Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 14590–14594.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709–715.
- Lindahl, T. Karlstro O. (1973) Heatinduced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* 12, 5151–54.
- Lindahl, T. Nyberg B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 3610.
- Linnaeus, C. (1753) *Species Plantarum*. 2 vols. Salvius, Stockholm. Facsimile edition (1957–1959), Ray Society, London.
- Lippai, J. (1664-1967): *Posoni kert. I. Virágoskert*, pp. 148. (Nagyszombat); *II. Veteményeskert*, pp. 244 (1664, Wiena); *III. Gyümölcs kert*, pp. 302 (1664, Wiena), (reprints, 1977), Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Lippold, S., Knapp, M., Kuznetsova, T., Leonard, J.A., Benecke, N., Ludwig, A., Rasmussen, M., Cooper, A., Weinstock, J., Willerslev, E., Shapiro, B., Hofreiter, M. (2011) Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. *Nat Commun.* 2011 Aug 23;2:450. doi: 10.1038/ncomms1447.
- Litt, T., Schmincke, H.U., Kromer, B. (2003) Environmental response to climatic and volcanic events in central Europe during the Weichselian Late glacial. *Quaternary Science Reviews* 22: 7–32.
- Llomas, B., Holland, M. L., Chen, K., Copley, J. E., Cooper, A., Suter, C. M. (2012) High-Resolution Analysis of Cytosine Methylation in Ancient DNA. *PLoS ONE* 7(1): e30226.
- 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.
- Logan, G.A., Smiley, C.J., Eglinton, G. (1995) Preservation of fossil leaf waxes in association with their source tissues, *Clarkia*, ANCIENT DNA 675 Northern Idaho, USA. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 751–63.
- Loomis, W.D. (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* 1974;31(Pt A):528-44.
- Loreille, O., Orlando, L., Patou-Mathis, M., Philippe, M., Taberlet, P., Hanni, C. (2001) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Curr Biol* 11, 200–203.
- Lowenstein, E.J. (2009) Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. *Childs Nerv Syst.* 2009 Feb 11. [Epub ahead of print]
- Ma, J., Bennetzen, J.L. (2004) Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12404–12410.
- Maggs-Kölling, G.L., Madsen, S., Christiansen, J.L. (2000) A phenetic analysis of morphological variation in *Citrullus lanatus* in Namibia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 385–393, 2000.

- Magyari, E. K., Major, Á., Bálint, M., Nédli, J., Braun, M., Rácz, I., Parducci, L. (2011) Population dynamics and genetic changes of *Picea abies* in the South Carpathians revealed by pollen and ancient DNA analyses. *BMC Evolutionary Biology* 2011, 11:66
- Mahmoudi Nasab, H., Mardi, M., Talaei, H., Fazeli Nashli, H., Pirseyedi, S. M., Hejabri Noubari, A., Mowla, S. J. (2010) Molecular Analysis of Ancient DNA Extracted from 3250-3450 Year-old Plant Seeds Excavated from Tepe Sagz Abad in Iran. *J. Agr. Sci. Tech.* (2010) Vol. 12: 459-470
- Malmstrom, H., Svensson, E., Gilbert, M., Willerslev, E., Gotherstrom, A., Holmlund, A. (2007) More on Contamination: The Use of Asymmetric Molecular Behavior to Identify Authentic Ancient Human DNA. *Mol. Biol. Evol.* 24: 998-1004
- Malmström, H., Vretemark, M., Tillmar, A., Durling, MB., Skoglund, P., Gilbert, MT., Willerslev, E., Holmlund, G., Götherström, A. (2012), Finding the founder of Stockholm – A kinship study based on Y-chromosomal, autosomal and mitochondrial DNA. *Ann Anat.* 2012 Jan 20; 194 (1):138-45.
- Manen, J. -F., Bouby, L., Dalnoki, O., Marinval, P., Turgay, M., Schlumbaum, A. (2003) Microsatellites from archeological *Vitis vinifera* seeds allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars. *Journal of Archeological Science* 30, 721-729
- Manniche, L. (1989) *An ancient Egyptian herbal*. Univ. Texas Press, Austin USA.
- Marchant, J. (2011) Ancient DNA Curse of the Pharaohs. *DNA, NATURE, VOL 472*
- Margulies, M., W.E., Egholm, S., Altman, J.S., Attiya, L.A., Bader, J., Bemben, M.S., Berka, M.S., Braverman, L., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.P., Fierro, J.M., Gomes, B.C., Godwin, W., He, S., Helgesen, Ho, C.H., Irzyk, G.P., Szilveszter, C., Jando, M., Alenquer, T., Jarvie, K., Jirage, J.-B., Kim, J., Knight, J., Lanza, J., Leamon, S., Lefkowitz, M., Lei, J., Li, K., Lohman, H., Lu, V., Makhijani, K., Mcdade, Mp., Mckenna, E., Myers, E., Nickerson, J., Nobile, R., Plant, B., Puc, M., Ronan, G., Roth, G., Sarkis, J., Simons, J., Simpson, M., Srinivasan, K., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M. (2006) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Mateiu, L.M., Rannala, B.H. (2008) Bayesian inference of errors in ancient DNA caused by postmortem degradation. *Mol Biol Evol.* 2008 Jul; 25 (7):1503-11.
- Matthews, J.M. (1964) *The Hoabinhian in Southeast Asia and elsewhere*. PhD thesis. Australian National University, Canberra
- Matthews, J.M. (1966) A Review of the 'Hoabinhian' in Indo-China. *Asian Perspectives* 9: 86-95
- Maynard, D.N., Zhang, X., Janick, J. (2007) Watermelons: New choices, New trends. *Chronica Hort* 47(4):26-29.
- Mcgraw, J.B. (1993) Ecological genetic variation in seed banks. IV. Differentiation of extant and seed bank-derived populations of *Eriophorum vaginatum*. *Arctic and Alpine Research* 25: 45–49.
- Mende, B.G. (2006) Possibilities and limitations in the archeogenetic analysis of ancient human remains. *Archeometriai Műhely* 2006/1:29-33.
- Messier, W., Li, S-H., Stewart, C-B. (1996) The birth of microsatellites. *Nature* 381 (6 June): 483
- Meszter, Z.R. (2006) Phenotype reconstruction of watermelon using bioinformatics tools. MSc Thesis, supervisor: C Bessant and G Gyulai. pp.66. Universities of Cranfield, UK and Gödöllő, HU.
- Miller, W., Drautz, D.I., Janecka, J.E., Lesk, A.M., Ratan, A., Tomsho, L.P., Packard, M., Zhang, Y., McClellan, L.R., Qi, J., Zhao, F., Gilbert, M.T., Dalén, L., Arsuaga, J.L., Ericson, P.G., Huson, D.H., Helgen, K.M., Murphy, W.J., Götherström, A., Schuster, S.C. (2009) The mitochondrial genome sequence of the Tasmanian tiger (*Thylacinus cynocephalus*). *Genome Res.* 2009 Feb;19(2):213-20.
- Miller, W., Drautz, D.I., Ratan, A., Pusey, B., Qi, J., Lesk, A.M., Tomsho, L.P., Packard, M.D., Zhao, F., Sher, A., Tikhonov, A., Raney, B., Patterson, N., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Knight, J.R., Irzyk, G.P., Fredrikson, K.M., Harkins, T.T., Sheridan, S., Pringle, T., Schuster, S.C. (2008) Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature.* 2008 Nov 20; 456 (7220):387-90.
- Molak, M., Ho, SY. (2011) Evaluating the impact of post-mortem damage in ancient DNA: a theoretical approach. *J Mol Evol.* 2011 Oct;73(3-4):244-55. Epub 2011 Nov 20.
- Morin, P.A., Chambers, K.E., Boesch, C., Vigilant, L. (2001) Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10, 1835– 44.
- Morris, A.B., Baucom, R.S., Cruzan, M.B. (2002) Stratified analysis of the soil seed bank in the cedar glade endemic *Astragalus bibullatus*: evidence for historical changes in genetic structure. *American Journal of Botany* 89: 29–36.
- Moser, J. (2001) *Hoabinhian: Geographie und Chronologie eines steinzeitlichen Technocomplexes in Südostasien* Köln, Lindensoft.
- Mullis, K., Faloona, S., Schrf. S., Saiki. R., Horn. G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold S. H. S. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- Nadel, D., Danin, A., Werker, E., Schick, T., Kislev, M.E., Stewart, K. (1994) 19,000-Year-Old Twisted Fibers From Ohalo II. *Current Anthropology* 35: 451-458.

- Nadel, D., Grinberg, U., Boaretto, E., Werker, E. (2006) Wooden objects from Ohalo II (23,000 cal BP), Jordan Valley, Israel. *J Human Evol* 50: 644-662.
- Nagy, J. (2003a) A magyar görög- és sárgadinnye. In: *Kertészeti hungarikumok*. Szerk. Nyéki, J., Papp, J. pp. 84–96. MTA Társadalomkutató Központ, Budapest.
- Nagy, J. (2003b) A görögdinnye, sárgadinnye és az uborka szabadföldi termesztése. *Őstermelő* 7 (1): 71–76.
- Nakamura, N. (1987) Variable number of tandem repeat (vntr) markers for human-gene mapping *Science* 235:1616-22.
- Noguchi, H., Park, J., Takagi, T. (2006) MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. *Nucleic Acids Res.* 34: 5623-5630.
- Noonan, J.P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., Alessi, J., Chen, F., Platt, D., Pääbo, S., Pritchard, J.K., Rubin, E.M. (2006) Sequencing and Analysis of Neanderthal Genomic DNA. *Science* 314: 1113-1118.
- Noro, M., Masuda, R., Dubrovo, I.A., Yoshida, M.C., Kato, M. (1998) Molecular phylogenetic inference of the woolly mammoth *Mammuthus primigenius*, based on complete sequences of mitochondrial cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. *J Mol Evol* 46, 314-326.
- Nyékelyi, B.D. (2003) *Monumenta Historica Budapestinensia XII*. Historical Museum of Budapest, Hungary, pp.1-102.
- Olivieri, C., Ermini, L., Rizzi, E., Corti, G., Bonnal, R., Luciani, S., Marota, I., DeBellis, G., Rollo, F. (2009) Characterization of Nucleotide Misincorporation Patterns in the Iceman's Mitochondrial DNA. *PLoS ONE* 5(1): e8629. doi:10.1371/journal.pone.0008629
- Olivieri, C., Ermini, L., Rizzi, E., Corti, G., Bonnal, R., Luciani, S., Marota, I., De Bellis, G., Rollo, F. (2010) Characterization of Nucleotide Misincorporation Patterns in the Iceman's Mitochondrial DNA. *PLoS ONE* 5(1): e8629. doi:10.1371/journal.pone.0008629
- Olsen, ME., Bengtsson, CF., Bertelsen, MF., Willerslev, E., Gilbert, MT. (2012) DNA from keratinous tissue Part II: Feather. *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194 (1):31-5. doi: 10.1016/j.aanat.2011.03.003.
- Orlando, L., Bonjean, D., Bocherens, H., Thenot, A., Argant, A., Otte, M., Hänni, C. (2002) Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Mol Biol Evol.* 2002 Nov;19(11):1920-33.
- Orlando, L., Eisenmann, V., Reynier, F., Sondaar, P., Hänni, C. (2003a). Morphological convergence in *Hippidion* and *Equus* (*Amerhippus*) South American equids elucidated by ancient DNA analysis. *J Mol Evol.* 2003; 57 Suppl 1: S29-40.
- Orlando, L., Leonard, J.A., Thenot, A., Laudet, V., Guerin, C., Hänni, C. (2003b). Ancient DNA analysis reveals woolly rhino evolutionary relationships. *Mol Phylogenet Evol.* 2003 Sep; 28 (3):485-99.
- Orlando, L., Male, D., Alberdi, M.T., Prado, J.L., Prieto, A., Cooper, A., Hänni, C. (2008a) Ancient DNA clarifies the evolutionary history of American Late Pleistocene equids. *J Mol Evol.* 2008 May; 66 (5):533-8.
- Orlando, L., Pagés, M., Calvignac, S., Hughes, S., Hänni, C. (2007) Does the 43 bp sequence from an 800,000 year old cretan dwarf elephantid really rewrite the textbook on mammoths? *Biol Lett.* 2007 Feb 22; 3(1):57-9; discussion 60-3.
- Orti, G., Pearse, DE., Avise, JC. (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10745–10749.
- Oskam, C., Haile, J., McLay, E., Rigby, P., Allentoft, M., Olsen, M., Bengtsson, C., Miller, G., Schwenninger, J., Jacomb, C., Walter, R., Baynes, A., Dortch, J., Parker-Pearson, M., Gilbert, M., Holdaway, R., Willerslev, E., Bunce, M. (2010) Fossil avian eggshell preserves ancient DNA. *Proc Biol Sci.* 2010 Jul 7; 277(1690):1991-2000
- Oskam, C.L., Jacomb, C., Allentoft, M.E., Walter, R., Scofield, P. R., Haile, J., Holdaway, R.N. Bunce, M. (2011) Molecular and morphological analyses of avian eggshell excavated from a late thirteenth century earth oven. *Journal of Archaeological Science* Volume 38, Issue 10, October 2011, Pages 2589-2595
- Oskam, CL., Bunce, M. (2012) DNA extraction from fossil eggshell. *Methods Mol Biol.* 2012;840:65-70.
- Otoni, C., Koon, H.E., Collins, M.J., Penkman, K.E., Rickards, O., Craig, O.E. (2009) Preservation of ancient DNA in thermally damaged archeological bone. *Naturwissenschaften.* 2009 Feb; 96(2):267-78.
- Ozerov, I.A., Zhinkina, N.A., Efimov, A.M., Machs, E.M., Rodionov, A.V. (2006) Feulgen-positive staining of the cell nuclei in fossilized leaf and fruit tissues of the Lower Eocene Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150: 315-321.
- Pääbo, S. (1985) Molecular-Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature* 314, 644-645.
- Pääbo, S. (1989b) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1939-1943.
- Pääbo, S. (1999) Human evolution. *Trends Cell Biol* 9, M13-16.
- Pääbo, S. (2000) Of bears, conservation genetics, and the value of time travel. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1320-1321.

- Pääbo, S., Gifford, J.A., Wilson, A.C. (1988) Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16, 9775-9787.
- Pääbo, S., Higuchi, R.G., Wilson, A.C. (1989a) Ancient DNA and the Polymerase Chain-Reaction - the Emerging Field of Molecular Archeology. *J Biol Chem* 264, 9709-9712.
- Pääbo, S., Irwin, D.M., Wilson, A.C. (1990) DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 265, 4718-4721.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M. (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Rev Genet* 38: 645-679.
- Pääbo, S., Wilson, A.C. (1991) Miocene DNA sequences - a dream come true? *Curr Biol* 1, 45-46.
- Paffetti, D., Vettori, C., Caramelli, D., Vernesi, C., Lari, M., Paganelli, A., Paule, L., Giannini, R. (2007) Unexpected presence of *Fagus orientalis* complex in Italy as inferred from 45,000-year-old DNA pollen samples from Venice lagoon. *BMC Evol Biol.* 2007 Aug 16; 7 Suppl 2:S6.
- Palmer, J.D. (1985) Comparative organization of chloroplast genomes. *Ann. Rev. Genet.* 19:325-354.
- Palmer, S. A., Smith, O., Allaby, R.G. (2012) The blossoming of plant archaeogenetics. *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194(1):146-56.
- Paplinska, J.Z., Taggar, D.A., Corrigan, T., Eldridge, M.D.B., Austin, J.J. (2011) Using DNA from museum specimens to preserve the integrity of evolutionarily significant unit boundaries in threatened species. *Biological Conservation* 144 (2011) 290-297
- Parducci, L., Petit, R.J. (2004) Ancient DNA – unlocking plants' fossil secrets. *New Phytologist* 161: 335-339.
- Paris, H.S., Daunay, M.-C., Pitrat, M., Janick, J. (2006) First Known Image of *Cucurbita* in Europe, 1503-1508. *Annals of Botany* 98: 41-47.
- Pask, A.J., Behringer, R.R., Renfree, M.B. (2008) Resurrection of DNA function in vivo from an extinct genome. *PLoS ONE.* 2008 May 21; 3(5):e2240.
- Pereira, S.L., Johnson, K.P., Clayton, D.H., Baker, A.J. (2007) Mitochondrial and nuclear DNA sequences support a Cretaceous origin of Columbiformes and a dispersal-driven radiation in the Paleocene. *Syst Biol.* 2007 Aug;56(4):656-72.
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., De Beaulieu, J.-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S., Vendramin, G.G. (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565.
- Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., Van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapègue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátyás, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M.-H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Taurichini, D., De Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B., Kremer, A. (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Petit, R.J., Hampe, A., Vendramin, G.G., Fineschi, S., Salvini, D., Duminil, J. (2005) Comparative organisation of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689-701.
- Phukhachon, S. (1988) Archeological research of the Hoabinhian culture or technocomplex and its comparison with ethnoarcheology of the Phi Tong Luang, a hunter-gatherer group of Thailand. Tubingen: Verlag Archeologica Venatoria: Institut für Urgeschichte der Universität Tübingen.
- Piperno, D.R., Weiss, E., Holst, I., Nadel, D. (2004) Processing of wild cereal grains in the Upper Palaeolithic revealed by starch grain analysis. *Nature* 430:670-673.
- Poinar, H. N., Kuch, M., Sobolik, K. D., Barnes, I., Stankiewicz, A. B. (2001) A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences USA* 98, 4317-22.
- Poinar, H., Kuch, M., McDonald, G., Martin, P., Pääbo, S. (2003) Nuclear gene sequences from a late Pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol* 12, 1150-1152.
- Poinar, H.N., Cano, R.J., Poinar, G.O. (1993) DNA from an Extinct Plant. *Nature* 363, 677-677.
- Poinar, H.N., Hofreiter, M., Spaulding, W.G., Martin, P.S., Stankiewicz, B.A., Bland, H., Evershed, R.P., Possnert, G., Poinar, H.N., Höss, M., Bada, J.L., Pääbo, S. (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA.
- Poinar, H.N., Schwarz, C., Qi, J., Shapiro, B., Macphee, R.D.E., Buigues, B., Tikhonov, A., Huson, D.H., Tomsho, L.P., Auch, A., Rampp, M., Miller, W., Schuster, S.C. (2006) Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. *Science* 311: 392 - 394.
- Poole, C.F. (1944) Genetics of cultivated cucurbits. *J Heredity* 35:122-128
- Porsild, A.E., Harington, C.R., Mulligan, G.A. (1967) *Lupinus arcticus* Wats grown from seeds of pleistocene age. *Science* 158, 113-114.

- Poulakakis, N., Parmakelis, A., Lymberakis, P., Mylonas, M., Zouros, E., Reese, D., Glaberman, S., Caccone, A. (2006) Ancient DNA forces reconsideration of evolutionary history of Mediterranean pygmy elephants. *Biol Lett.* 2006 Sep 22; 2(3):451-4.
- Poulakakis, N., Theodorou, G., Zouros, E., Mylonas, M. (2002) Molecular phylogeny of the extinct pleistocene dwarf elephant *Palaeoloxodon antiquus falconeri* from Tilos Island, Dodekanisa, Greece. *J Mol Evol.* 2002 Sep; 55(3):364-74.
- Preus, H. R., Marvik, O., J., Selvig, K. A., Bennike, P. (2011) Ancient bacterial DNA (aDNA) in dental calculus from archaeological human remains. *Journal of Archaeological Science* Volume 38, Issue 8, August 2011, Pages 1827-1831
- Pruvost, M., Schwarz, R., Correia, V.B., Champlot, S., Braguier, S., Morel, N., Fernandez-Jalvo, Y., Grange, T., Geigl, E.M. (2007) Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 16; 104(3):739-44.
- Pusch, C. M., Bachmann, L. (2004) Spiking of contemporary human template DNA with ancient DNA extracts induces mutations under PCR and generates nonauthentic mitochondrial sequences. *Molecular Biology and Evolution* 21, 957–64
- Queller, D.C., Strassman, J.E., Hughes, C.R. (1993) Microsatellites and Kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 285 – 288.
- Quinn, R.M. (1999) Kamut: Ancient grain, new cereal. In: J Janick (Ed) *Perspectives on new crops and new uses.* pp. 182–183, ASHS Press, Alexandria, VA.
- Rambaut, A., Ho, S.Y., Drummond, A.J., Shapiro, B. (2009) Accommodating the effect of ancient DNA damage on inferences of demographic histories. *Mol Biol Evol.* 2009 Feb;26(2):245-8.
- Raniello, R., Procaccini, G. (2002) Ancient DNA in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Ecology – Progress Series* 227: 269–273.
- Rasmussen, M., Li Y., Lindgreen, S., Pedersen, JS., Albrechtsen, A., Moltke, I., Metspalu, M., Metspalu, E., Kivisild, T., Gupta, R., Bertalan, M., Nielsen, K., Gilbert, MT., Wang, Y., Raghavan, M., Campos, PF., Kamp, HM., Wilson, AS., Gledhill, A., Tridico, S., Bunce, M., Lorenzen, ED., Binladen, J., Guo, X., Zhao, J., Zhang, X., Zhang, H., Li, Z., Chen, M., Orlando, L., Kristiansen, K., Bak, M., Tommerup, N., Bendixen, C., Pierre, TL., Grønnow, B., Meldgaard, M., Andreasen, C., Fedorova, SA., Osipova, LP., Higham, TF., Ramsey, CB., Hansen, TV., Nielsen, FC., Crawford, MH., Brunak, S., Sicheritz-Pontén, T., VILLEMS, R., Nielsen, R., Krogh, A., Wang, J., Willerslev, E. (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*, Vol 463 11 February 2010 doi:10.1038/nature08835
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., Caramelli, D. (2012) Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution* 2012, 44:21
- Roberts, D.L., Solow, A.R. (2003) Flightless birds: when did the dodo become extinct? *Nature.* 2003 Nov 20;426(6964):245.
- Rogers, A.R., Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9, 552-569.
- Rohland, N. (2012) DNA extraction of ancient animal hard tissue samples via adsorption to silica particles. *Methods Mol Biol.* 2012;840:21-8.
- Rohland, N., Malaspina, A.S., Pollack, J.L., Slatkin, M., Matheus, P., Hofreiter, M. (2007) Proboscidean mitogenomics: chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biol.* 2007 Aug; 5(8):e207.
- Rohland, N., Reich, D., Mallick, S., Meyer, M., Green, R. E., Georgiadis, N. J. (2010) Genomic DNA Sequences from Mastodon and Woolly Mammoth Reveal Deep Speciation of Forest and Savanna Elephants. *PLoS Biol* 8(12): e1000564
- Rompler, H., Rohland, N., Lalueza-Fox, C., Willerslev, E., Kuznetsova, T., Rabeder, G., Bertranpetit, J., Schoneberg, T., Hofreiter, M. (2006) Nuclear gene indicates coat-color polymorphism in mammoths. *Science* 313:62.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. (1996) Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* 242: 84-89.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363-365.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., Hirschberg, J. (2000) An alternative pathway to b-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc Natl Acad Sci* 97:11102–11107
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J. (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripeningband is elevated in the mutant Delta. *The Plant J* 17:341–351
- Ruckenbauer, P. (1971) Keimf'ahiger Winterweizen aus dem Jahre 1877. *Beobachtungen und Versuche.* pp. 372–386. Inst. f. Pflanzenbau und Pflanzenzuchtung d. Hochschule f. Bodenkultur in Wien.

- Sain, R.S., Joshi, P., Ev, E., Sastry, D. (2002) Cytogenetic analysis of interspecific hybrids in genus *Citrullus* (Cucurbitaceae) *Euphytica* 128: 205–210.
- Saltonstall, K. (2002) Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 2445–2449.
- Saltonstall, K. (2003) Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular Ecology* 12: 1689–1702.
- Savolainen, V., Cuénoud, P., Spichiger, R., Martinez, M.D.P., Crèvecoeur, M., Manen, J.-F. (1995) The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics – evaluation and improvement. *Plant Systematics and Evolution* 197: 87–98.
- Savolainen, V., Reeves, G. (2004) A plea for DNA banking. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1445.
- Schaaper, R.M., Kunkel, T.A., Loeb, L.A. (1983) Infidelity of DNA-synthesis associated with bypass of apurinic sites. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences USA* 80, 487–91 ANCIENT DNA 677
- Schermann, Sz. (1966) *Magismeret, I, II.* (Akadémiai Kiadó, Budapest)
- Schlotterer, C., Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20: 211–215.
- Schlumbaum, A., Glabeke, S., Roldan-Ruiz, I. (2011) Towards the onset of fruit tree growing north of the Alps: Ancient DNA from waterlogged apple (*Malus* sp.) seedfragments. *Ann Anat.* 2012 Jan 20;194(1):157-62. doi: 10.1016/j.aanat.2011.03.004. Epub 2011 Mar 31
- Schlumbaum, A., Tensen, M., Jaenicke-Despres V. (2007) Ancient plant DNA in archeobotany. *Veget Hist Archeobot* (in press. DOI 10.1007/s00334-007-0125-7).
- Schmitz, R.W., Serre, D., Bonani, G., Feine, S., Hillgruber, F., Krainitzki, H., Pääbo, S., Smith, F.H. (2002) The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13342-13347.
- Schneller, J.J. (1998) How much genetic variation in fern populations is stored in the spore banks A study of *Athyrium filix-femina* (L.) Roth. *Botanical Journal of the Linnean Society* 127: 195–206.
- Schubert, M., Ginolhac, A., Lindgreen, S., Thompson, J.F., Al-Rasheid, K.A., Willerslev, E., Krogh, A., Orlando, L. (2012) Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC Genomics*. 2012 May 10;13(1):178.
- Schweitzer, M.H., Chiappe, L. Garrido, A.C., Lowenstein, J.M., Pincus, S.H. (2005) Molecular preservation in Late Cretaceous sauropod dinosaur eggshells. *Proc Biol Sci.* 2005 Apr 22;272(1565):775-84.
- Serre, D., Hofreiter, M., Pääbo, S. (2004) Mutations induced by ancient DNA extracts? *Mol Biol Evol* 21, 1463-1467.
- Shapiro, B., Hofreiter, M. (2010) Analysis of ancient human genomes: using next generation sequencing, 20-fold coverage of the genome of a 4,000-year-old human from Greenland has been obtained. *Bioessays*. 2010 May;32(5):388-91.
- Shapiro, R. (1981) Damage to DNA caused by hydrolysis. In *Chromosome Damage and Repair*, ed. E Seeberg, K Kleppe, pp. 3–12. New York: Plenum
- Shen-Miller, J. (2002) Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. *Seed Sci Res* 12, 131-143.
- Shepherd, LD., Worthy, TH., Tennyson, A.J., Scofield, RP., Ramstad, KM., Lambert, DM. (2012) Ancient DNA Analyses Reveal Contrasting Phylogeographic Patterns amongst Kiwi (*Apteryx* spp.) and a Recently Extinct Lineage of Spotted Kiwi. *PLoS ONE* 7(8): e42384.
- Shi, T., Reeves, R.H., Gilichinsky, D.A., Friedmann, E.I. (1997) Characterization of Viable Bacteria from Siberian Permafrost by 16S rDNA Sequencing. *Microbial Ecology* 33:169-179.
- Shoocongdej, R. (2000) Forager Mobility Organization in Seasonal Tropical Environments of Western Thailand. *World Archeology* 32: 14-40.
- Sidow, A., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1991) Bacterial-DNA in *Clarkia* Fossils. *Philos T Roy Soc B* 333, 429-433.
- Simón, M., González-Ruiz, M., Prats-Muñoz, G., Assumpció, M., (2011) Comparison of two DNA extraction methods in a Spanish Bronze Age burial cave. *Quaternary International Volume* 247, 9 January 2012, Pages 358–362
- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, H., Smith, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchell, S.E., Kresowitch, S., Ziegler J. (1997) An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet* 95:163-173.
- Sohrabi, M., Myllys, L., Stenroos, S. (2010) Successful DNA sequencing of a 75 year-old herbarium specimen of *Aspicilia aschabadensis* (J. Steiner) Mereschk. *The Lichenologist* (2010), 42: 626-628
- Solheim, W.G. (1972) An earlier agricultural revolution. *Scientific American* 226: 34-41
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., Smiley, C.J. (1992) An Rbcl Sequence from a Miocene Taxodium (Bald Cypress). *P Natl Acad Sci USA* 89, 449-451. solution. *Biochemistry* 12, 5151–54.
- Spencer, M., Howe, C.J. (2004) Authenticity of ancient-DNA results: a statistical approach. *American Journal of Human Genetics* 75: 240–250.

- Sperisen, C., Büchler, U., Gugerli, F., Mátyás, G., Geburek, T., Vendramin, G.G. (2001) Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology* 10: 257–263.
- Stakhov, V.L., Gubin, S.V., Maksimovich, S.V., Rebrikov, D.V., Savilova, A.M., Kochkina, G.A., Ozerskaia, S.M., Ivanushkina, N.E., Vorob'eva, E.A. (2008) [Microbial communities of ancient seeds derived from permanently frozen Pleistocene deposits] *Mikrobiologiya*. 2008 May-Jun;77(3):396-403.
- Stanković, A., Nadachowski, A., Doan, K., Stefaniak, K., Baca, M., Socha, P., Wegleński, P., Ridush, B. (2011) First ancient DNA sequences of the Late Pleistocene red deer (*Cervus elaphus*) from the Crimea. *Ukraine, Quaternary International* 245 (2011) 262e267
- Stehlik, I. (2003) Resistance or emigration? Response of alpine plants to the ice ages. *Taxon* 52: 499–510.
- Stiller, M., Fulton, T.L. (2012) Multiplex PCR amplification of ancient DNA. *Methods Mol Biol.* 2012;840:133-41.
- Stone, G., Van Der Ham, R., Brewer, J. (2008) Fossil oak galls preserve ancient multitrophic interactions. *Proc Biol Sci.* 2008 Oct 7; 275(1648):2213-9.
- Stringer, C. (2002) Modern human origins: progress and prospects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 563-579.
- Stringer, C.B., Andrews, P. (1988) Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science* 239, 1263-1268.
- Suarez, A.V., Tsutsui, N.D. (2004) The value of museum collections for research and society. *BioScience* 54, 66–74.
- Sun, G., Kaushal, R., Pal, P., Wolujewicz, M., Smelser, D., Cheng, H., Lu, M., Chakraborty, R., Jin, L., Deka, R. (2005) Whole-genome amplification: relative efficiencies of the current methods. *Leg Med (Tokyo)* 7, 279-286.
- Suyama, Y., Kawamuro, K., Kinoshita, I., Yoshimura, K., Tsumura, Y., Takahara, H. (1996) DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes and Genetic Systems* 71: 145–149.
- Sykes, B. (1991) Ancient DNA. The past comes alive. *Nature* 352:381–382.
- Sykes, B. (2001) *The seven daughters of Eve: The Science That Reveals Our Genetic Ancestry*, London, WW Norton, ISBN 0-393-02018-5
- Sykes, B. (2003) *Adam's Curse: A Story of Sex, Genetics, and the Extinction of Men*. London, Bantam Press. ISBN 0-593-05004-5
- Szabó, Z. (2006) A sárgadinnye (*Cucumis melo*) archeogenetikája: ITS és SSR szekvencia heterogenitás. PhD Tézis, pp. 1-103, témavezető: Gyulai G. Gödöllő
- 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.
- 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., Lágler, R., Tóth, Z., Heszky, L. (2007) SNP elemzés az rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókusznál mai és középkori sárgadinnyében (*Cucumis melo*). *Agrártudományi Közlemények* (in press)
- Szamota, I., Zolnai, G. (1902-1906) *Magyar Oklevél-szótár*. Budapest.
- Szikszai Fabriczius, B. (1591) *Nomenclatura*. In: Melich J.: Szikszai Fabriczius Balázs latin-magyar szójegyzéke (1906).
- Taberlet, P., Cheddadi, R. (2002) Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science* 297: 2009–2010.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P., Bouvet, J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189–3194.
- Tadmor, Y., Katzir, N., King, S., Levi, A., Davis, A., Hirschberg, J. (2004) Fruit coloration in watermelon: lesson from the tomato. *Proc Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Olomouc, Czech Republic, pp 181–185
- Taleb-Hossenkhan, N., Bhagwant, S., Noelle, G. (2012) Extraction of nucleic acids from ancient formalin- and ethanol-preserved specimens of the parasitic Anoplocephalidea *Bertiella studeri*: which method works best? *J Parasitol.* 2012 Dec 12.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1596-9.
- Tanaka, K., Honda, T., Ishikawa, R. (2010) Rice archaeological remains and the possibility of DNA archaeology: examples from Yayoi and Heian periods of Northern Japan. *Archaeol Anthropol Sci* (2010) 2:69–78

- Tani, N., Tsumura, Y., Sato, H. (2003) Nuclear gene sequences and DNA variation of *Cryptomeria japonica* samples from the postglacial period. *Molecular Ecology* 12: 859–868.
- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.
- Taylor, J.S., Durkin, J.M.H., Breden, F. (1999) The Death of a Microsatellite: A Phylogenetic Perspective on Microsatellite Interruptions. *Mol Biol Evol* 16:567–572.
- Taylor, G.M., Murphy, E., Hopkins, R., Rutland, P., Chistov, Y. (2007) First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology*. 2007 Apr;153(Pt 4):1243-9.
- Thomas, M.P., Gilbert, W., Miller, S., Schuster, C. (2008) Response to Comment on "Whole-Genome Shotgun Sequencing of Mitochondria from Ancient Hair Shafts" *Science* 7 November 2008: Vol. 322. no. 5903, p. 857
- Thomas, M.R., Scott, N.S. (1993) Microsatellite Repeats in Grapevine Reveal DNA Polymorphisms When Analyzed as Sequence-Tagged Sites (Stss). *Theor Appl Genet* 86, 985-990.
- Thomas, R.H., Schaffner, W., Wilson, A.C., Pääbo, S. (1989) DNA Phylogeny of the Extinct Marsupial Wolf. *Nature* 340, 465-467.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J. (1994) CKUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Threadgold, J., Brown, T.E. (2003) Degradation of DNA in artificially charred wheat seeds. *J Archeol Sci* 30: 1067-1076.
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y., Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* 5, 123–35.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10:967-981.
- Tóth, Z., Gyulai, G., Horváth, L., Szabó, Z., Heszky, L. (2007b) Watermelon (*Citrullus l. lanatus*) production in Hungary from the Middle Ages. *Hungarian Agricultural Res.* 2007/4: 14-19.
- Tóth, Z., Gyulai, G., Szabó, Z., Heszky, L. (2007a) Mikroszatellita lókusok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*) a középkor óta; (CT)₃ deléció a (CT)₂₆ nSSR-ban. *Agrártudományi Közlemények.* 27: 125-134.
- Turnpenny, P., Ellard, S. (2005) *Emery's Elements of Medical Genetics*, 12th. ed. Elsevier, London.
- Tuross, N. (1994) The biochemistry of ancient DNA in bone. *E.vperientia* 50, 530-535.
- Valdiosera, C., García, N., Dalén, L., Smith, C., Kahlke, R.D., Lidén, K., Angerbjörn, A., Arsuaga, J.L., Götherström, A. (2006) Typing single polymorphic nucleotides in mitochondrial DNA as a way to access Middle Pleistocene DNA. *Biol Lett.* 2006 Dec 22; 2(4):601-3.
- Valdiosera, C.E., García, N., Anderung, C., Dalén, L., Crégut-Bonnoure, E., Kahlke, R.D., Stiller, M., Brandström, M., Thomas, M.G., Arsuaga, J.L., Götherström, A., Barnes, I. (2003) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Mol Ecol.* 2007 Dec; 16(24):5140-8.
- Valdiosera, C.E., García-Garitagoitia, J.L., Garcia, N., Doadrio, I., Thomas, M.G., Hänni, C., Arsuaga, J.L., Barnes, I., Hofreiter, M., Orlando, L., Götherström, L. (2008) A. Surprising migration and population size dynamics in ancient Iberian brown bears (*Ursus arctos*). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1; 105(13):5123-8.
- Van Leeuwen, J.F., Froyd, C.A., Van Der Knaap, W.O., Coffey, E.E., Tye, A., Willis, K.J. (2008) Fossil pollen as a guide to conservation in the Galapagos. *Science.* 2008 Nov 21; 322(5905):1206
- Van Tan, H. (1994) The Hoabinhian in Southeast Asia: Culture, cultures or technocomplex? *Vietnam Social Sciences* 5: 3-8
- Van Tan, H. (1997) The Hoabinhian and before. *Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association (Chiang Mai Papers, Volume 3)* 16: 35-41
- Vartavan, C.D.E. (1990) Contaminated plant-foods from the tomb of Tutankhamun: A new interpretiv system. *Journal of Archeological Science* 17:473-494. Academic Press Ltd. London.
- Vartavan, C.D.E. (1993) "Combined-systems" analysis for the interpretation of the Tutankhamun plant remains. Ph.D. thesis (Institute of Archeology, University College, University of London) .
- Vartavan, C.D.E., Amorós A.V. (1997) Codex of ancient Egyptian plant remains. *Codex des restes végétaux de l'Egypte ancienne.* London, 401 pp.
- Vasan, S., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S. (1996) An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 382, 275–78.
- 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.

- Vila, C., Leonard, J.A., Gotherstrom, A., Marklund, S., Sandberg, K., Liden, K., Wayne, R.K., Ellegren, H. (2001) Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 291, 474-477.
- Vouillamoz, J.F., Grando, M.S. (2006) Genealogy of wine grape cultivars: "Pinot" is related to "Syrah". *Heredity*. 2006 Aug;97(2):102-10.
- Vörös, L. (1971) Seed collection of Pannonhalma High School from the 1830's (in Hungarian). *Bot. Közl. Budapest, Hungary* 58: 179-180.
- Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., Powers, D.W. (2000) Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407, 897-900.
- Walker, P.M.B. (1971) Repetitive DNA in higher organisms. *Progr Biophys Mol Biol* 23:145.
- Walters, T.W. (1989) Historical Overview on Domesticated Plants in China with Special Emphasis on the Cucurbitaceae. *Econ Bot* 43, 297-313.
- Wang, G. H. – Lu, C. L. (1981): Isolation and Identification of Nucleic Acids of the Liver from a Corpse from the Changsssha Han Tomb. *Sheng wu hua hsueh yu sheng wu li chin chan* (Progress in Biochemistry and Biophysics). 17, 70–75.
- Wang, G. H., Lu, C. L. (1981): Isolation and Identification of Nucleic Acids of the Liver from a Corpse from the Changsssha Han Tomb. *Sheng wu hua hsueh yu sheng wu li chin chan* (Progress in Biochemistry and Biophysics). 17, 70–75.
- Wang, R.L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., Doebley, J. (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* 398, 236-239.
- Warid, W.A. (1995) Vegetable species known to the ancient Egyptians. *Acta Hort* 391: 273-290.
- Wasylikowa, K., Schild, R., Wendorf, F., Krolík, H., Kubiak-Martens, L., Harlan, J.R. (1995) Archeobotany of the Early neolithic site E-75-6 at Nubta Playa, Western Desert, South Egypt (preliminary results) *Acta Palaeobotanica* 35(1): 133-155.
- Wasylikowa, K., Van Der Veen, M. (2004) An archeobotanical contribution to the history of watermelon, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai (syn. *C. vulgaris* Schrad.). *Veget Hist Archeobot* 13: 213–217.
- Wayne, R.K., Leonard, J.A., Cooper, A. (1999) Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 457–477.
- Weber, A., Weber, K., Carr, K., Wilkerson, C., Ohlrogge, J. (2007) Sampling the Arabidopsis Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing. *Plant Physiology* 144: 32-42.
- Weber, I. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7:524-530.
- Weber, J.L., Wong, C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123–1128.
- White, J.C., Gorman, C. (2004) Patterns in "amorphous" industries: The Hoabinhian viewed through a lithic reduction sequence. IN Paz, V. (ed) *Southeast Asian archeology: Wilhelm G. Solheim II Festschrift* University of the Philippines Press, Quezon City. pp. 411-441.
- Whitfield, F.B. (1992) Volatiles from Interactions of Maillard Reactions and Lipids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 31, 1-58.
- Whitt, S.R., Wilson, L.M., Tenaillon, M.I., Gaut, B.S., Buckler, E.S.T. (2002) Genetic diversity and selection in the maize starch pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12959-12962.
- Wicker, T., Keller, B. (2007) Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in Triticeae, rice, and Arabidopsis reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families. *Genome Research* 17:1072-1081.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M.B., Brand, T.B., Hofreiter, M., Bunce, M., Poinar, H.N., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Steffensen, J.P., Bennike, O., Schwenninger, J.L., Nathan, R., Armitage, S., De Hoog, C.J., Alfimov, V., Christl, M., Beer, J., Muscheler, R., Barker, J., Sharp, M., Penkman, K.E., Haile, J., Taberlet, P., Gilbert, M.T., Casoli, A., Campani, E., Collins, M.J. (2007) Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science*. 2007 Jul 6;317(5834):111-4.
- Willerslev, E., Cooper, A. (2005) Ancient DNA. *P Roy Soc Lond B Bio* 272, 3-16.
- Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A., Cooper, A. (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300: 791–795.
- Willerslev, E., Hansen, A.J., Poinar, H.N. (2004) Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol* 19, 141-147.
- Winters, M., Barta, J. L., Monroe, C., Kemp, B. M. (2011) To Clone or Not To Clone: Method Analysis for Retrieving Consensus Sequences In Ancient DNA Samples. *PLoS ONE* 6(6): e21247. doi:10.1371/journal.pone.0021247
- Woide, D., Zink, A., Thalhammer, S. (2010) Technical note: PCR analysis of minimum target amount of ancient DNA. *Am J Phys Anthropol.* 2010 Jun;142(2):321-7.
- Wolpoff, M.H., Hawks, J., Caspari, R. (2000) Multiregional, not multiple origins. *Am J Phys Anthropol* 112, 129-136.

- Wolpoff, M.H., Hawks, J., Frayer, D.W., Hunley, K. (2001) Modern human ancestry at the peripheries: a test of the replacement theory. *Science* 291, 293-297.
- Woodward, S.R., Weyand, N.J., Bunnell, M. (1994) DNA-Sequence from Cretaceous Period Bone Fragments. *Science* 266, 1229-1232.
- Yang, H. (1997) Ancient DNA from Pleistocene fossils: preservation, recovery, and utility of ancient genetic information for quaternary research. *Quaternary Science Reviews* 16: 1145–1161.
- Zhang, X., Jiang, Y. (1990) Edible seed watermelons (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) in northwest China. *Cucurbit Genet. Coop. Rpt.* 13:40-42.
- Zhao, A., Kochert, B. (1993) Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 21:607-614.
- Ziegenhagen, B., Liepelt, S., Kuhlenkamp, V., Fladung, M. (2003) Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissues of their fruits or seeds. *Trees* 17: 345–350.
- Zischler, H., Geisert, H., Von Haeseler, A., Pääbo, S. (1995) A nuclear 'fossil' of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature* 378, 489-492.
- Zohary, D., Hopf, P. (2000) *Domestication of Plants in the Old World*, 3. kiadás. Oxford: University Press, ISBN 0-19-850356-3.

8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Angolnyelvű tudományos folyóiratcikkek

1. Gyulai G, Z Szabó, B Wichmann, A Bittsánszky, L Waters 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. 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 from growers' viewpoint. *Hung Agric Res* 2009/3-4:8-12.
3. **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.
4. 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 4th and 15th centuries. *Hung Agric Res* 2006/1:14-19.
5. Gyulai G, M Humphreys, R Lágler, Z Szabó, **Z Tóth**, A Bittsánszky, F Gyulai, L Heszky (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. (IF: 1,892)
6. Bittsánszky A, G Gyulai, M Humphreys, G Gullner, Zs Csintalan, J Kiss, Z Szabó, R Lágler, **Z Tóth**, H Rennenberg, 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)
7. 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
8. 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.

Angolnyelvű tudományos könyvfejezet

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

11. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Heszky L (2008) Sejtmagi mikroszatellita és cpDNS szekveniák diverzitása görögdivényében (*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 lokuszok evolúciója a görögdivényében (*Citrullus lanatus*) a középkor óta; (CT)₃ deléció a (CT)₂₆ 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 lokuszán 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*) ökremediációs 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 szekvencia-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

17. **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.
18. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Gyulai F, Heszky L (2008a) New *Citrullus* haplotypes at the tRNA-Val – rps12 locus of cpDNA.1Cucurbitaceae 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.
19. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Bittsánszky A, Heszky L (2008b) Genotype (nSSR) and haplotype (cpDNA) identification in watermelons (*Citrullus l. lanatus*). General Meeting EUCARPIA, Valencia, Spain, pp. 253-257.
20. **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.
21. 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.
22. Bittsánszky A, Gyulai G, Gullner G, **Tóth Z**, Kiss J, Szabó Z, Heszky L, Kőmíves T (2009) Paraquat-toleráns nyárfá *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.
23. 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 15th century. General Meeting EUCARPIA, Valencia, Spain, pp. 244-249.
24. 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 15th 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.

Tudományos konferencia absztraktok

1. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Gyulai F, Horváth L, Kiss J, Heszky L (2008) Haplotípusok azonosítása görögdinnyében (*Citrullus lanatus*). XIV^{dik} Növénynevelési Tudományos Napok, MTA Budapest, 2008. március 12. p. 14.
2. **Tóth Z**, Gyulai G, A Başlı, R Lágler, A Güner, Z Szabó, A Kis, A Bittsánszky, L Heszky (2007) Morphological and molecular reconstruction of 15th and 18th cent. watermelons (*C. lanatus*). IWGP14, 14th Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
3. **Tóth Z**, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Güner A, Basli Ga, Bittsánszky A, Kis A, Heszky L (2007) A régészeti genetika születése Magyarországon – (ct)3 deléción és (ct)4 inverzió a görögdinnye (*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
4. **Tóth Z**, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Güner A, Başlı Ga, Bittsánszky A, Heszky L (2007) Összetett mikroszatellita születése egyszerű SSR-ből - (CT)₃ deléción és (CT)₄ inverzió a görögdinnye (*Citrullus lanatus*) (CT)₂₆ nSSR lókuszán.
5. **Tóth Z**, Gyulai G, Horváth L, Gyulai F (2006) Molecular and morphological reconstruction of a medieval melon (*Cucumis melo*). 36th International Symposium on Archaeometry (ISA 2006), május 2 - 6, Quebec City, Canada.
6. **Tóth Z**, Gyulai G, Szabó Z, Mórocz S, Hajósé 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.

7. 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. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.79. Budapest.
8. Kis A, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Gubin Sv, **Tóth Z**, Stakhov VI, 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.
9. Kis A, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Gubin, **Tóth Z**, Stakhov VI, Bittsánszky A, Yashina Sg, Heszky L (2007) Morfológiai és molekuláris elemzés jégkorszaki *Silene* magokban. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.78. Budapest.
10. 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. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, p. 120.
11. Lágler R, Gyulai G, A Güner, **Z Tóth**, A Kis, Z Szabó, Ga Bašli, A Bittsánszky, L Heszky (2007) Morphological and molecular analysis of ancient common millet (*P. miliaceum*) seeds. IWGP14, 14th Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
12. 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. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.80. Budapest.
13. 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
14. Lehoczky P, Gyulai G, Szabó Z, Lágler R, **Tóth Z**, Kis A, Bittsánszky A, Bock I, Heszky L (2007) SNP-elemzés mai és középkori sárgadinnye (*C. melo*) rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókuszn. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred – 14dik Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, április 15-17. P109, 176-177
15. Lehoczky P, Gyulai G, **Tóth Z**, Lágler R, Szabó Z, Bittsánszky A, Bock I, Heszky L (2007) Az rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókuszn SNP-elemzése mai és középkori sárgadinnyében (*Cucumis melo*). XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.81. Budapest.
16. Stakhov V, Gyulai G, Szabó Z, Kovács L, Murenjetz 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
17. Szabó Z, Gyulai G, Ga Bašli, **Z Tóth**, 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. 14th Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
18. 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
19. Szabó Z, Gyulai G, Lágler R, **Tóth Z**, Bittsánszky A, Lehoczky P, Heszky L (2007) A sárgadinnye (*Cucumis melo*) A sárgadinnyében (*Cucumis melo*) sejtmagi mikroszatellita lókusznak evolúciója a középkor óta. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.66. Budapest.
20. Szabó Z, Gyulai G, Lágler R, **Tóth Z**, Kis A, Bittsánszky A, Heszky L (2007) A részégeti genetika születése Magyarországon – a (ctt)25 nSSR lókuszn evolúciója a sárgadinnyében (*C. melo*) a középkor óta. VII. Magyar Genetikai Kongresszus – 14. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, Balatonfüred, április 15-17. P110, 177-178
21. 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 allélek diverzitása és ALF-SSR elemzése sárgadinnyében (*Cucumis melo*): molekuláris mikroevolúció a középkor óta, XII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, p. 158.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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.

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

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