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<br/>egyetemi tanár, az MTA doktora<br/>a biológiai tudományok kandidátusa<br/>SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet<br/>Gödöllő

.....

Dr. Gyulai Gábor témavezető .....

Dr. Heszky László programvezető

Dr. Heszky László a doktori iskola vezetője

# TARTALOMJEGYZÉK

1.	CÉI	LKITŰZI	ŚS	5	
2.	BEV	EVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS			
	2.1	A régés	szeti 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 következménvei		
		2.1.6	ΠS.	38	
		2.1.7	SSR	39	
		2.1.8	cpDNS	41	
		219	γροτιστικό Levh színoén	42	
		2 1 10	WGA	44	
	22	A görö	n of the genetikaj jellemzése	45	
	2.2	221	A görözdinnye ( <i>Citrullus lanatus</i> ) rendszertani besorolása faitatínusai	45	
		2.2.1	a görögdinnye (ellemzése	46	
		2.2.2	A görögdinnye (Citrullus lanatus) domesztikációja és mikroevolúciója	48	
		2.2.3 2.2.4	Pánáczati ác kultúrlalatak		
		2.2.4	A görögdinnus hazai nemesítése		
		2.2.3	A gorogunnye nazar nemesnese.		
3.	AN	YAGES	MODSZER	53	
	3.1	A reges	szeti novenyanyag		
		3.1.1	Magbiológiai meghatározás		
		3.1.2	In vitro inkubáció.	54	
		3.1.3	ösDNS-izolálás	54	
	3.2	Osszeh	asonlító Citrullus fajták és tájfajták	55	
		3.2.1	Morfológiai vizsgálatok	55	
	3.3	Molekı	ıláris vizsgálatok	58	
		3.3.1	ΠS	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	Szekve	nciaanalízis	61	
	3.5	Statiszt	ikai feldolgozás	62	
4.	ERE	EDMÉN	YEK ÉS MEGVITATÁSUK	63	
	4.1	Görögd	linnyemagok feltárása	63	
	4.2	A mai t	fajták morfológiai összehasonlítása görögdinnye-típusok szerint	64	
	4.3	DNS iz	olálás az archeológiai, és a mai fajtákból	68	
	4.4	Teljes g	zenom felszaporítása (WGA)	70	
	4.5	Összeh	asonlító molekuláris vizsgálatok	71	
		4.5.1	ITS elemzés	71	
		4.5.2	SSR elemzések	71	
		4.5.3	cpDNS elemzés	75	
		4.5.4	cvb színgén szekvencia elemzése	76	
	4.6	Szekve	nciaanalízis és faitarekonstrukció klaszter analízis alapián	77	
		4.6.1	Seitmagi DNS analízis	77	
		4.6	1.1 ITS szekvenciák		
		4.6	12 SSR elemzés	79	
		4.6	1.3 A kloroplasztisz DNS (cpDNS) elemzése		
		4.6	14 lcvb színsén elemzése	86	
		462	Eaitarekonstrukció	89	
	4.7	Úi tudo	n ajmeren instancio mányos eredmények	90	
		- j			
5.	KÖ	VETKEZ	TETÉSEK ÉS JAVASLATOK	91	
,	ö~-				
6.	OSS	SZEFOG	LALAS	92	
7.	IRO	DALON	IJEGYZÉK	97	
		,	· · · ·		
8.	AZ	ERTEKE	ZZES TEMAKOREBEN MEGJELENT PUBLIKACIOK	117	
9.	KÖ	SZÖNET	NYILVÁNÍTÁS	120	

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

А	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
Ċ	citozin
CAPS:	Cleaved amplified polymorphic sequence
cM:	centiMorgan
cp:	(Chloroplast) kloroplaszt
cpDNS	kloroplaszt DNS
DNS:	Dezoxi-ribonukleinsay
dNTP:	Dezoxi-nukleotid-trifoszfátok
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsay
EST	(Expressed Sequence Tag) Expresszálódó szekvencia részletek
EtBr:	Etídium-bromid
G	onanin
GC	Gázkromatográfia
IMA <sup>.</sup>	Inter Mikroszatellita Amplifikáció
ITS	(Internal Transcribed Spacer) Belső átíródó rDNS spacer
LB.	Luria-Bertani féle táptalai
MDA.	Multiple Displacement Amplification
MgCl <sub>2</sub> :	Magnézium-klorid
mM·	millimol
MS	Murashige és Skoog alaptáptalai
MSD:	Multiple Strand Displacement
mtDNS:	Mitokondriális DNS
Na-OCI:	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
Т	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 ásatások 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 maradhattak 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 morfotípusa és elkészíthető volt a pontos rokonsági kapcsolatokat feltáró molekuláris klaszter analízis.

5

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.
- 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 fajtával 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 fajtával 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 DNSkárosodásokban 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 erdemények 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 kelthető baktériumok izolálása 3 millió éves leletekből (Shi et al., 1997) később került megcáfolásra (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 zsizsikből (Cano et al., 1993 b), termeszből (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 DNSminták "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 kövületek (Yakutföld, Szibéria) lenyomataiból (*Myrtceae: Paramyrtacicarpus 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 fosszíliák és leletek az ősDNS fennmaradásának időfüggvényében (Hebsgaard *et al.*, 2008).

A 80-as évek közepéig a kutatók úgy gondolták, hogy csak a biokémiailag 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 erszényes 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 nagyrészében 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 földerítése 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 (enzimatikus 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 dATPαS (*deoxyadenosine α-thiotriphosphate*; syn. *5'adenozin foszfoszulfát* - APS) alkalmazásával, amelyet a DNS polimeráz nem érzékel, viszont a luciferáz enzimmel kevésbé lép keresztreakcióba (Ronaghi *et al.*, 1996, 1998).

Erszényes farkas (*Thylacinus cynocephalus*): A 20. század elején kihalt erszényes farkasból (5. ábra) izolált ősDNS (egy felnőtt állat erszényéből származó kölyök, amelyet száz éve konzerváltak, és egy százéves erszényes farkas bőrből), illetve a világ más tájairól származó erszényes 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 ausztáliai erszényeshez, mint a dél-amerikai ragadozó erszényesekhez

(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 tulajdonságinak 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 alaszkai 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 háziasítás 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 alaszkai 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 organellum DNS szakaszokat

"konzerválódott egység"-ként felhasználva a populációgenetikai vizsgálatokban, sikerült az alaszkai 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) bázispársorrendjét 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, futomadár 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 egyedeit azonosítani, és 9-re csökkenteni a kihaltnak 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, galambszerű (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 strigrirostris*). 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 vizsgálatai során megállípításra került, hogy genetikai anyag kinyerését legsikeresebben csontból, iletve 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), zsizsikből (Cano *et al.*, 1993b), és termeszből (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 lókusz, melynek régészeti leleteit tanulmányozták (Cavalli-Sforza, 2003). Rövidítések: mtDNS: mitokondriális DNS, *ACE*: angiotenzin konvertáló enzim, PDHA1: piruvát alegység  $\beta$ -*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.

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
OMagyar katona*	Olaszország	1918-ból

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.

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 lókuszain 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 Euróbában és Nyugat-Ázsiában élő neandervölgyi emberi maradványok (modern ember és a csimpánz közötti forma) vizsgálatakor 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 kétszázezer 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

22

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 ősibb 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 mitokondiális 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 inhibitorként viselkednek, mint az állati vagy emberi szövetek (Ziagenhagen *et al.*, 2003).

A növényi mitokondriumban majdnem tízszer lasabban 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:

növényi régészeti genetika legkutatottabb területe a termesztett növények Α 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' (Lupinis 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 kalászú 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 argentínai 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 megkezdhették a növénytermesztést először talán a Termékeny Félhold (Mezopotámia, Asszíria, Főnicia 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 Thaiföldig 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 növényszerkezetért, 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 tűztől, 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 fosszilia 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*) makrofosszíliákból (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 feltárásra 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 bizonyítékaként 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).

a károsodás típusa	folyamat	A DNS-re kifejtett hatás
DNS száltörések	mikrobák általi lebontás	DNS mennyiségének és
	elhalt sejtek nukleázai	méretének csökkenése
	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

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

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 inaktiválják ezeket az enzimeket így elkerülve az enzimatikus, 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 DNSen lassabb, de megállíthatatlan folyamatok során megy végbe (4. táblázat).

Sérülés típusa	Folyamat	Hatás a DNS-re	Megoldás
A cukor-foszforsav lánc törése (a foszfodiészer 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	Mailard termékek	PTB (N-fenil thiazólium-bromid)
Hidrolitikus léziók	Amino csoportok átalakulása: adenin $\rightarrow$ hypoxantin citozin $\rightarrow$ uracil 5-metil-citozin $\rightarrow$ timin guanin $\rightarrow$ xantin	Kódoló képesség változása	Multi PCR, klónozás, és szekvenálás

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

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 kötései 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<sub>2</sub>), a hidrogén peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), és a hidroxil (OH) okoznak a PCR során történő szálnövekedést blokkolva. A DNS láncban az oxidatív sérülésekre hajlamosabb purinok és pirimidinek kettős kötései 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-metilcitozin (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 4x10<sup>-9</sup>/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 sterilezése (UV, hipó), védőruha és maszk viselése, hogy megfelelően sterilizáljuk az egyes

34

munkafolyamatokat, munkaterületeket, és elkerüljük a DNS kontaminációt (Malmstrom *et al.*, 2007). A minták feltárásákor 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 kivonatból 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).

35

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 et al., 1996).
2.	Ellenőrizni kell a DNS extrakciót, és PCR amplifikációt vak kontrolokkal és legalább három
	ismétléssel (Pääbo et al., 1990).
3.	A kiindulási templát DNS mennyiségi és minőségének meghatározása (Serre et al., 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 et al.,
	1990)

- 6. Negatív korreláció az amplifikáció hatékonysága és a DNS fragmentumok mérete között (Lambert *et al.*, 2002)
- 7. A nucleáris mtDNS inszerciók kiszűrése (Timmis et al., 2004)
- 8. A laborspecifikus szennyeződések kiszűrésére más laboratóriumban meg kell ismételni a kísérletet (Zischler *et al.*, 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 törzsfejlődést 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 korral, 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 kémiailag 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 amin a karbonilcsoportra addícionálódik.



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 "Amadorivegyületnek" 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 aldozil-aminból 3-dezoxi-glukodiulozon keresztül hidroxi-metil-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 színanyagok képződése közben. Az átalakulásnál keletkezett  $\lambda$ -dikarbonil-származékok további reakciósort indítanak el. Aminosavakkal reagálva lejátszódik a Streckerféle 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 keresztkötések 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 írodik 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 szeres (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]<sub>10</sub>; a megszakított (imperfect) SSR, pl. [AT]<sub>10</sub>CACA[AT]<sub>10</sub> (ennek az elemnek kialakult egy másik szinoním elnevezése: IRS - interspersed repetitive sequence); valamint az összetett (compound) SSR, pl. [AT]<sub>10</sub>[CA]<sub>6</sub> (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 bkp-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 tandemszámmal, 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 mikroszatelliták genetikai jelentősége kiemelkedik a humán orvoslásban, mert bebizonyosodott, hogy számos, igen súlyos és örökletes betegségben a defektív gének regulátor régióinak mikroszatellita 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]<sub>n</sub> és a [GC]<sub>n</sub>, 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). Természetszerűleg 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 klorplasztisz 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 órájájára (rátájára) nincs egységes adat. A számított szubsztitúció/év adatok eltérnek a különböző vizsgálatokban: az 1,3 x  $10^{-8}$  nt / év (Ma és Bennetzen, 2004), az 1.5 1,3 x  $10^{-8}$  nt / év (Koch *et al.*, 2000), és a 6,5 x  $10^{-9}$  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 zárvatermő növények átlagos kloroplasztisz méretét (120-217 x  $10^3$  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 lókuszok 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.	<b>P</b> 1		P2	F1	F <sub>2</sub>
Narancs	sárga	narancs	x	sárga	narancs	3 narancs : 1 sárga
y° y°	уу			14	1	
Sárga	vörös	sárga	x	vörös	sárga	3 sárga : 1 vörös
уу	rr	275		$\bigcirc$	14	
Narancs	vörös	narancs	x	vörös	narancs	9 narancs : 3 sárga : 4 vörös
y° y°	rr			$\bigcirc$		

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

Paradicsom (*Lycopersicon lycopersicon*) színmutációja és karotin bioszintézise esetén figyelték meg a szintetikus folyamatokat, azonban görögdinnye eseténben még nem alkalmazták ezen géneket a gyümölcsszín vizsgálatában. Két likopin cikláz a *lycopin*  $\beta$ -*cikláz* (*LCYB*) és a *lycopin*  $\varepsilon$ -*cikláz* (*LYCE*) ismert, amelyek a lycopin-t  $\beta$  illetve  $\alpha$  -karotinná alakítják át (18. ábra). A *Lycopin*  $\beta$ -*cikláznak* két formáját találták már meg paradicsomban, az egyik az *LCYB* a másik pedig a kromoplaszt-specifikus *lycopin*  $\beta$ -*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  $\beta$ -karotin, míg a *Delta* mutánsban az LYCE upregulációja figyelhető meg melynek a következménye a  $\delta$ -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  $\beta$ -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 vannak, amelyek a görögdinnye gyümölcsszín mutánsok jelen 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 enzimatikus 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/lcyb* (*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 bárminemű 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, fajtatípusai

A görögdinnye (*Citrullus lanatus*; 2n = 2x = 22;  $4.25 - 4.54 \times 108$  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 rehmii* (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 növő, hanem termesztett forma is. Ezt a fajt 3 alfajra oztották:

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

A három alfaj közül a *mucosospermus* (nyálkásmagvú dinnye) a botanikai irodalomban ís 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. Csírázóképességét 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.



Takarmánydinnye (Citrullus lanatus citroides) Görögdinnye vad tipusa (Citrullus lanatus)



Görögdinnye (Citrullus lanatus lanatus)

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) féltárása (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 füzete) 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 paralysi. 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 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 törökkor elmúlása után kezdtek terjedni. Itáliában viszont, a piros bélű 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, Pensionaute 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 festhetett (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 FUTO 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- jászsági a legfontosabb, a Kecskemétnagykőrösi; 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 élettani 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

51

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 termeszte	tt jelentős görögdin	nye fajták és jellemz	ző tulajdonságai (ABI	, Tápiószele)
---------------------------------------	----------------------	-----------------------	-----------------------	---------------

Fajtanév	Növekedési típusa	Virágzás habitusa	Tenyészidő	Termés alakja	Hússzíne	Tömege (kg)	Termelési mód
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	élénkvörös	3–4	szabadföldi
Napsugár	középerős	monoikus	középérésű	gömb	sárga	4–5	szabadföldi
Orosházi F1	erős	monoikus + andromonoikus	rövid	tojásdad	sötétrózsaszín	6–7	szabadföldi
ldeál	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, Tápiószele) DNS-izolálást végeztünk.

## 3.1.1 Magbiológiai meghatározás

A magbiológiai meghatározást számítógépes képanalizáló szoftver segítségével (a tápiószelei Agrobotanikai Intézet segítségével) végeztük. A feldolgozás során sztereo-binokuláris mikroszkóp alatt a magvakat és a terméseket az egyéb szerves és szervetlen maradványoktól, szennyeződésektől elkülönítettük. A szervetlen maradványok mellett sok és változatos szervesanyag maradványt is találtunk: bőr, faszén, csigahéj töredék, rovar töredék, nyű/báb, giliszta maradványok, csont, 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 szakcikkek alapján azonban nem minden darab volt azonosítható biztonsággal. Ezért azokat minden esetben recens mag- és termésgyűjteményben található összehasonlító anyaggal vetettük egybe.

#### 3.1.2 In vitro inkubáció

Az ép régészeti magvak felületi fertőtlenítését követően (HgCl<sub>2</sub>, Na-OCl) félsteril körülmények között 20°C-on csíráztattuk az esetleges túlélő embriók izolálásához (Gyulai *et al.*, 1992). A sejttenyészetek 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 eljáráson alapuló (Bernatzky, 1986) módszert használtunk. Ezen módszert kiegészítettük NaCl a poliszacharid, illetve PVP (Polyvinylpyrrolidone) (Hanania, 2004) hozzáadásával a polifenol (Lodhi et al., 1994) szint csökkentése érdekében. A fenol oxidációjának (Loomis, 1974) megakadályozása céljából Nátrium biszulfátot használtunk. 0,1 g magot porítottunk cseppfolyós nitrogénben, majd 1000 µl Homogenizációs pufferben (1M hexilene-glicol, 10mM Tris (pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% triton, 5mM β-mercaptoethanol) szuszpendáltuk. A mintákat 10000g 10 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a felső fázis eltávolítása után 1000 µl Mosó puffert adtunk hozzá (0.5 M hexilene glycol, 10m Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% triton, 5mM β-mercaptoethanol), majd centrifugáltuk (10 perc 4°C-on 10000g). Eltávolítottuk a felúszó réteget. A mintákhoz 1000 µl Extrakciós puffert (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris,5mM EDTA, 4% sodium biszulfát) + 1000 µl 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 spectrofotometerrel (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.

<sup>7.</sup> 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).

1         Finn 168         Citrullus colocynthis         RCAT036172           2         Belga 172         Citrullus colocynthis         RCAT036172           3         Portugal 547         Citrullus colocynthis         RCAT035547           4         Szeged 099         Citrullus lanatus         RCAT035235           6         Újszilvás 816         Citrullus lanatus         RCAT035235           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         RCAT036105           9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         RCAT036105           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         RCAT036152           12         Belyj Dlinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT035389           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT036096           17         Kkonike R7 096         Citrullus lanatus         RCAT036149           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT036149           21         Ukranskij 545	#	Fajtanév	Típus	Kód
2         Belga 172         Citrullus colocynthis         RCAT036172           3         Portugál 547         Citrullus colocynthis         RCAT035247           4         Szeged 099         Citrullus lanatus         RCAT035235           6         Újszilvás 816         Citrullus lanatus         RCAT035235           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         0026005           12         Bely Dilninji 152         Citrullus lanatus         RCAT036152           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT036152           14         Csárdaszálás 113         Citrullus lanatus         RCAT035114           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT036096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036149           17         Klondike R7 096         Citrullus lanatus         RCAT036149           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036149           19	1	Finn 168	Citrullus colocynthis	RCAT036168
3         Portugal 547         Citrullus colocynthis         RCAT035547           4         Szeged 099         Citrullus lanatus         RCAT036099           5         Román 235         Citrullus lanatus         RCAT035235           6         Újszlívás 816         Citrullus lanatus         RCAT035235           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         00257/05           9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         00260/05           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         RCAT036152           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         RCAT036152           12         Belyj Dlinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT035112           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT035089           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT036096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036149           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT036149           21         Ukrainskij	2	Belga 172	Citrullus colocynthis	RCAT036172
4         Szeged 099         Citrullus lanatus         RCAT036099           5         Román 235         Citrullus lanatus         RCAT055816           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT055816           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         RCAT036105           9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         S0026005           12         Belyi Dlinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT036152           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT035812           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035389           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT036096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036096           19         Taktaharkány 790         Citrullus lanatus         RCAT036149           22         Szirma 782         Citrullus lanatus         RCAT034790           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT034749           21         Ukrainski 545 149	3	Portugál 547	Citrullus colocynthis	RCAT035547
5         Román 235         Citrullus lanatus         RCAT035235           6         Újszlivás 816         Citrullus lanatus         RCAT035816           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         00257/05           9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         00257/05           10         Devaványa 101         Citrullus lanatus         RCAT036105           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         RCAT036152           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT036152           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT035114           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT036096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036192           19         Taktaharkány 790         Citrullus lanatus         RCAT036149           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT036149           22         Szirma 782         Citrullus lanatus         RCAT034762           23         Marsowsz	4	Szeged 099	Citrullus lanatus	RCAT036099
6         Újszilvás 816         Citrullus lanatus         RCAT055816           7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         00257/05           9         Sádnórfalva 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         RCAT036105           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         RCAT036152           12         Belyj Dlinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT035113           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT035114           17         Klondike R7 096         Citrullus lanatus         RCAT036096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036199           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT036149           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT036149           22         Szima 782         Citrullus lanatus         RCAT034782           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034767           24 <td< td=""><td>5</td><td>Román 235</td><td>Citrullus lanatus</td><td>RCAT035235</td></td<>	5	Román 235	Citrullus lanatus	RCAT035235
7         Bácsbokod 917         Citrullus lanatus         RCAT035917           8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         00257/05           9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         Stol1/02           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         RCAT036152           12         Belyj Dinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT035112           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT035114           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT036096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT036192           19         Taktaharkány 790         Citrullus lanatus         RCAT034790           20         Türkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT034742           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT034782           22         Szirma 782         Citrullus lanatus         RCAT034742           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034754           25 <t< td=""><td>6</td><td>Újszilvás 816</td><td>Citrullus lanatus</td><td>RCAT055816</td></t<>	6	Újszilvás 816	Citrullus lanatus	RCAT055816
8         Napsugár 257         Citrullus lanatus         00257/05           9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         S101./02           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         90260/05           12         Belyj Dinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT036152           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT035812           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035389           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT035114           17         Klondike R7 096         Citrullus lanatus         RCAT035096           18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         RCAT035112           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT034790           20         Túrkeve 122         Citrullus lanatus         RCAT034712           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT034782           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034784           25         Debrecen 111         Citrullus lanatus         RCAT034754           25         <	7	Bácsbokod 917	Citrullus lanatus	RCAT035917
9         Sándorfalva 105         Citrullus lanatus         RCAT036105           10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         5101./02           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         00260/05           12         Belyj Dlinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT036152           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT035113           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT036096           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT036096           17         Klondike R7 096         Citrullus lanatus         RCAT034790           20         Taktaharkány 790         Citrullus lanatus         RCAT034790           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT034782           22         Szirma 782         Citrullus lanatus         RCAT034782           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034754           25         Debrecen 111         Citrullus lanatus         RCAT034785           29         Hevesi 258         Citrullus lanatus         RCAT034775           21         Na	8	Napsugár 257	Citrullus lanatus	00257/05
10         Dévaványa 101         Citrullus lanatus         5101./02           11         Szentesi sugárhasú 260         Citrullus lanatus         00260/05           12         Belyj Dlinnij 152         Citrullus lanatus         RCAT036152           13         Ráckeve 812         Citrullus lanatus         RCAT035113           14         Csárdaszállás 113         Citrullus lanatus         RCAT035113           15         Tura 389         Citrullus lanatus         RCAT035114           16         Biri 114         Citrullus lanatus         RCAT035114           17         Klondike R7 096         Citrullus lanatus         RCAT03700           19         Taktaharkány 790         Citrullus lanatus         RCAT034790           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT034790           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT034790           22         Szirma 782         Citrullus lanatus         RCAT034782           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034754           25         Debrecen 111         Citrullus lanatus         RCAT035111           26         Sibiriak 098         Citrullus lanatus         RCAT034754           27         Nagy	9	Sándorfalva 105	Citrullus lanatus	RCAT036105
11Szentesi sugárhasú 260Citrullus lanatus00260/0512Belyi Dilnnij 152Citrullus lanatusRCAT03615213Ráckeve 812Citrullus lanatusRCAT03511314Csárdaszállás 113Citrullus lanatusRCAT03511315Tura 389Citrullus lanatusRCAT03511416Biri 114Citrullus lanatusRCAT03609617Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatusRCAT03609619Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03611220Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT036114921Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03477423Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03477424Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03511125Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03477426Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03477527Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03476730Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03514533Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03514535Nyíregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03514536Kecskemét	10	Dévaványa 101	Citrullus lanatus	5101./02
12Belyj Dlinnij 152Citrullus lanatusRCAT03615213Ráckeve 812Citrullus lanatusRCAT05581214Csárdaszállás 113Citrullus lanatusRCAT03511315Tura 389Citrullus lanatusRCAT03538916Biri 114Citrullus lanatusRCAT03511417Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatus00263/0519Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03511220Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03611221Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03611222Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03475424Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03511125Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03611126Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03611127Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03611128Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03476235Nyiregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03477837Ilk 236 <t< td=""><td>11</td><td>Szentesi sugárhasú 260</td><td>Citrullus lanatus</td><td>00260/05</td></t<>	11	Szentesi sugárhasú 260	Citrullus lanatus	00260/05
13Råckeve 812Citrullus lanatusRCAT05581214Csårdaszållås 113Citrullus lanatusRCAT03511315Tura 389Citrullus lanatusRCAT03511416Biri 114Citrullus lanatusRCAT03511417Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatusRCAT03609619Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03614920Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03614921Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03614923Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03477224Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03475426Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyckaid 785Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálió 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT0356233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03476234Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03514635Nyiregyháza 778Citrullus	12	Belyj Dlinnij 152	Citrullus lanatus	RCAT036152
14Csárdaszállás 113Citrullus lanatusRCAT03511315Tura 389Citrullus lanatusRCAT03538916Biri 114Citrullus lanatusRCAT03511417Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatusRCAT03479020Tárkaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03479020Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03611221Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szima 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03475426Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03478529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03476732Oros 862Citrullus lanatusRCAT03476233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03476234Körnör 62Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03477836Necskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03477837Ilk 236Citrullus lanatusRCAT03477838Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03476239Gyöngy	13	Ráckeve 812	Citrullus lanatus	RCAT055812
15Tura 389Citrullus lanatusRCAT03538916Biri 114Citrullus lanatusRCAT03511417Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatusRCAT03470019Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03479020Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03479021Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03478224Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03477530Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03515533Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03476734Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03514537Ilk 236Citrullus lanatusRCAT03514638Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03514634Kibéd 172Citrullus lanatusS172./0242Sugar baby /G	14	Csárdaszállás 113	Citrullus lanatus	RCAT035113
16Biri 114Citrullus lanatusRCAT03511417Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatus00263/0519Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03479020Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03511221Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03475424Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03475426Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03477527Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagyéalió 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476730Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03586231Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03514532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03546233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT034776234Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03514535Nyíregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03514636Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03514637Ilk 236Citrullus lanatusRCAT03514638Pusztadobos 146	15	Tura 389	Citrullus lanatus	RCAT035389
17Klondike R7 096Citrullus lanatusRCAT03609618Charleston gray 263Citrullus lanatus00263/0519Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03479020Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03511221Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatusRCAT03475424Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT036511126Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykalló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476730Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03514533Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03476234Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT034776235Nyiregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03477837Ilk 236Citrullus lanatusRCAT03476238Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusS172./0241Kibéd 172 <td>16</td> <td>Biri 114</td> <td>Citrullus lanatus</td> <td>RCAT035114</td>	16	Biri 114	Citrullus lanatus	RCAT035114
18         Charleston gray 263         Citrullus lanatus         00263/05           19         Taktaharkány 790         Citrullus lanatus         RCAT034790           20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT035112           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT036149           22         Szima 782         Citrullus lanatus         RCAT03782           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034782           24         Háromfa 754         Citrullus lanatus         RCAT034754           25         Debrecen 111         Citrullus lanatus         RCAT036098           27         Nagyessed 775         Citrullus lanatus         RCAT034775           28         Nagykálló 785         Citrullus lanatus         RCAT034775           29         Hevesi 258         Citrullus lanatus         RCAT034767           30         Nagykálló 785         Citrullus lanatus         RCAT035155           32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT034767           33         Rákóczifalva 145         Citrullus lanatus         RCAT034762           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyiregyháza 7	17	Klondike R7 096	Citrullus lanatus	RCAT036096
19Taktaharkány 790Citrullus lanatusRCAT03479020Túrkeve 112Citrullus lanatusRCAT03511221Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatus00256/0524Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03609827Nagycsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476730Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyírbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03566233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03514534Kömör 762Citrullus lanatusRCAT03477835Nyíregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03514538Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03514634Kibéd 172Citrullus lanatusRCAT03514634Kibéd 172Citrullus lanatusS172./0242Sugar baby /Génbanki 261Citrullus lanatus00252/0544Korai kincs 255Citrullus lanatus00251/05	18	Charleston gray 263	Citrullus lanatus	00263/05
20         Túrkeve 112         Citrullus lanatus         RCAT035112           21         Ukrainskij 545 149         Citrullus lanatus         RCAT036149           22         Szima 782         Citrullus lanatus         RCAT034782           23         Marsowszky 256         Citrullus lanatus         RCAT034782           24         Háromfa 754         Citrullus lanatus         RCAT034754           25         Debrecen 111         Citrullus lanatus         RCAT036098           27         Nagyecsed 775         Citrullus lanatus         RCAT034775           28         Nagyecsed 775         Citrullus lanatus         RCAT034775           29         Hevesi 258         Citrullus lanatus         RCAT034775           30         Nagyvárad 767         Citrullus lanatus         RCAT034767           31         Nyirbátor 155         Citrullus lanatus         RCAT035862           32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT034767           33         Rákóczífalva 145         Citrullus lanatus         RCAT034762           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034778           36         Kecskeméti vörösh	19	Taktaharkány 790	Citrullus lanatus	RCAT034790
21Ukrainskij 545 149Citrullus lanatusRCAT03614922Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatus00256/0524Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagyekâlió 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03477530Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03515533Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03546234Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03477837Ilk 236Citrullus lanatusRCAT03523638Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514539Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03496940Crimson sweet 262Citrullus lanatusS172./0241Kibéd 172Citrullus lanatusS172./0242Sugar baby /Génbanki 261Citrullus lanatusRCAT03497044Korai kincs 255Citrullus lanatus0025/05	20	Túrkeve 112	Citrullus lanatus	RCAT035112
22Szirma 782Citrullus lanatusRCAT03478223Marsowszky 256Citrullus lanatus00256/0524Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03511126Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT0369827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagyckiló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatusRCAT03476730Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03546233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03477835Nyiregyháza 778Citrullus lanatusRCAT034776236Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03523638Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03496940Crimson sweet 262Citrullus lanatusS172./0242Sugar baby /Génbanki 261Citrullus lanatusS172./0244Korai kincs 255Citrullus lanatusRCAT03497044Korai kincs 255Citrullus lanatus00256/05	21	Ukrainskij 545 149	Citrullus lanatus	RCAT036149
23     Marsowszky 256     Citrullus lanatus     00256/05       24     Háromfa 754     Citrullus lanatus     RCAT034754       25     Debrecen 111     Citrullus lanatus     RCAT035111       26     Sibiriak 098     Citrullus lanatus     RCAT034754       27     Nagyecsed 775     Citrullus lanatus     RCAT034775       28     Nagyecsed 775     Citrullus lanatus     RCAT034775       29     Hevesi 258     Citrullus lanatus     RCAT034767       30     Nagyvarad 767     Citrullus lanatus     RCAT034767       31     Nyirbátor 155     Citrullus lanatus     RCAT035155       32     Oros 862     Citrullus lanatus     RCAT035155       33     Rákóczifalva 145     Citrullus lanatus     RCAT035145       34     Kömörő 762     Citrullus lanatus     RCAT034778       35     Nyiregyháza 778     Citrullus lanatus     RCAT034778       36     Kecskeméti vöröshúsú 259     Citrullus lanatus     RCAT034778       37     Ilk 236     Citrullus lanatus     RCAT035146       39     Gyöngyös 969     Citrullus lanatus     RCAT034778       38     Pusztadobos 146     Citrullus lanatus     RCAT034969       40     Crimos sweet 262     Citrullus lanatus     S172./02 <td< td=""><td>22</td><td>Szirma 782</td><td>Citrullus lanatus</td><td>RCAT034782</td></td<>	22	Szirma 782	Citrullus lanatus	RCAT034782
24Háromfa 754Citrullus lanatusRCAT03475425Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03511126Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálió 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatus00258/0530Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT03476235Nyiregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03476236Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03523637Ilk 236Citrullus lanatusRCAT03514539Gyöngyős 969Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyős 969Citrullus lanatusRCAT03496940Crimson sweet 262Citrullus lanatus0026210541Kibéd 172Citrullus lanatus002610543Lipót 970Citrullus lanatus002610544Korai kincs 255Citrullus lanatus0025/05	23	Marsowszky 256	Citrullus lanatus	00256/05
25Debrecen 111Citrullus lanatusRCAT03511126Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatus00258/0530Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyírbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03566233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03514534Kömör 762Citrullus lanatusRCAT03477835Nyíregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03523638Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyős 969Citrullus lanatusRCAT03496940Crimson sweet 262Citrullus lanatus00226/0541Kibéd 172Citrullus lanatus00261/0543<	24	Háromfa 754	Citrullus lanatus	RCAT034754
26Sibiriak 098Citrullus lanatusRCAT03609827Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03477529Hevesi 258Citrullus lanatus00258/0530Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nylirbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03566233Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03514534Kömör 762Citrullus lanatusRCAT03476235Nyiregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03523638Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03496940Crimson sweet 262Citrullus lanatus00262/0541Kibéd 172Citrullus lanatus5172./0242Sugar baby /Génbanki 261Citrullus lanatusRCAT03497044Korai kincs 255Citrullus lanatusRCAT034970	25	Debrecen 111	Citrullus lanatus	RCAT035111
27Nagyecsed 775Citrullus lanatusRCAT03477528Nagykálló 785Citrullus lanatusRCAT03478529Hevesi 258Citrullus lanatus00258/0530Nagyvárad 767Citrullus lanatusRCAT03476731Nyírbátor 155Citrullus lanatusRCAT03515532Oros 862Citrullus lanatusRCAT03514533Rákóczifalva 145Citrullus lanatusRCAT03514534Kömörő 762Citrullus lanatusRCAT034776235Nyíregyháza 778Citrullus lanatusRCAT03477836Kecskeméti vöröshúsú 259Citrullus lanatusRCAT03523638Pusztadobos 146Citrullus lanatusRCAT03514639Gyöngyös 969Citrullus lanatusRCAT03496940Crimson sweet 262Citrullus lanatusS172./0241Kibéd 172Citrullus lanatus5172./0242Sugar baby /Génbanki 261Citrullus lanatusRCAT03497044Korai kincs 255Citrullus lanatusRCAT034970	26	Sibiriak 098	Citrullus lanatus	RCAT036098
28         Nagykálló 785         Citrullus lanatus         RCAT034785           29         Hevesi 258         Citrullus lanatus         00258/05           30         Nagyvárad 767         Citrullus lanatus         RCAT034767           31         Nyirbátor 155         Citrullus lanatus         RCAT035155           32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT035155           33         Rákóczifalva 145         Citrullus lanatus         RCAT03545           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyiregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT0347762           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT034778           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT034929           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         RCAT034969           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai	27	Nagyecsed 775	Citrullus lanatus	RCAT034775
29         Hevesi 258         Citrullus lanatus         00258/05           30         Nagyvárad 767         Citrullus lanatus         RCAT034767           31         Nyirbátor 155         Citrullus lanatus         RCAT035155           32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT03562           33         Rákóczifalva 145         Citrullus lanatus         RCAT035145           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034762           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT034778           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT035236           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyős 969         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyős 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         00261/05           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43 <t< td=""><td>28</td><td>Nagykálló 785</td><td>Citrullus lanatus</td><td>RCAT034785</td></t<>	28	Nagykálló 785	Citrullus lanatus	RCAT034785
30         Nagyvárad 767         Citrullus lanatus         RCAT034767           31         Nyírbátor 155         Citrullus lanatus         RCAT035155           32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT035662           33         Rákóczifalva 145         Citrullus lanatus         RCAT035145           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT035236           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT035236           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimon sweet 262         Citrullus lanatus         0026205           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         0026105           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         0026105           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         0026105           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         0025/05	29	Hevesi 258	Citrullus lanatus	00258/05
31         Nyírbátor 155         Citrullus lanatus         RCAT035155           32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT035862           33         Rákóczífalva 145         Citrullus lanatus         RCAT035145           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034762           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT035236           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyős 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         0026205           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         0026105           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         0026105           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         0025/05	30	Nagyvárad 767	Citrullus lanatus	RCAT034767
32         Oros 862         Citrullus lanatus         RCAT035862           33         Rákóczifalva 145         Citrullus lanatus         RCAT035145           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT035745           35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034762           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT035236           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         0025/05	31	Nyírbátor 155	Citrullus lanatus	RCAT035155
33         Rákóczifalva 145         Citrullus lanatus         RCAT035145           34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034762           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         RCAT035236           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         RCAT034969           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00256/05	32	Oros 862	Citrullus lanatus	RCAT035862
34         Kömörő 762         Citrullus lanatus         RCAT034762           35         Nyiregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034778           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         00259/05           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         0025/05	33	Rákóczifalva 145	Citrullus lanatus	RCAT035145
35         Nyíregyháza 778         Citrullus lanatus         RCAT034778           36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         00259/05           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         0025/05	34	Kömörő 762	Citrullus lanatus	RCAT034762
36         Kecskeméti vöröshúsú 259         Citrullus lanatus         00259/05           37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT035146           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172/02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	35	Nyíregyháza 778	Citrullus lanatus	RCAT034778
37         Ilk 236         Citrullus lanatus         RCAT035236           38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	36	Kecskeméti vöröshúsú 259	Citrullus lanatus	00259/05
38         Pusztadobos 146         Citrullus lanatus         RCAT035146           39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	37	llk 236	Citrullus lanatus	RCAT035236
39         Gyöngyös 969         Citrullus lanatus         RCAT034969           40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	38	Pusztadobos 146	Citrullus lanatus	RCAT035146
40         Crimson sweet 262         Citrullus lanatus         00262/05           41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	39	Gyöngyös 969	Citrullus lanatus	RCAT034969
41         Kibéd 172         Citrullus lanatus         5172./02           42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	40	Crimson sweet 262	Citrullus lanatus	00262/05
42         Sugar baby /Génbanki 261         Citrullus lanatus         00261/05           43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	41	Kibéd 172	Citrullus lanatus	5172./02
43         Lipót 970         Citrullus lanatus         RCAT034970           44         Korai kincs 255         Citrullus lanatus         00255/05	42	Sugar baby /Génbanki 261	Citrullus lanatus	00261/05
44 Korai kincs 255 Citrullus lanatus 00255/05	43	Lipót 970	Citrullus lanatus	RCAT034970
	44	Korai kincs 255	Citrullus lanatus	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).

1

Г

<ol> <li>Növény - fejlődési erély</li> </ol>	<ol> <li>Terméskezdemény - alak</li> </ol>	19. Termés - hús szín
3 gyenge	3 gömbölyű	1 fehér
5 közepes	5 ovális	2 citromsárga
7 erős	7 hengeres	3 aranysárga
2. Szár - főinda hossza	12. Terméskezdemény szőrözöttség	4 halvány rózsaszín
1 nagyon rövid	1 nagyon ritka	5 rózsaszín
3 rövid	3 ritka	6 narancssárga
5 közenes	5 silri	7 skarlátvörös
7 hogenú	7 nomozos	/ skallatvolos
7 nosszu	/ nemezes	8 kariimpiros
9 nagyon nosszu	9 tovises	9 mainaszinu
3. Szar - szorozottseg	13. Termes - alak	20. Hus - konzisztencia
3 gyenge	1 lapított	1 szemcsés
5 közepes	2 gömbölyű	2 zsenge, lágy
7 erős	3 tompa elliptikus	3 nyálkás
<ol><li>Levéllemez - alak</li></ol>	5 ovális	4 durva
3 keskeny	6 körte-alakú	5 telt, kemény
5 közepes	7 hengeres	6 kemény
7 széles	14. Termés - felszín	7 vattaszerű
5. Levél - szín	3 sima	21. Hús –levesség
1 sárga	5 barázdált	3 száraz
3 zöld	7 érszerű kidudorodások	5 kevésnedvű
5 sötétzöld	9 egyenetlen	7 nedvdús
7 szürkészöld	15 Termés - héi színe	9 nagyon leves
9 galambezürke	1 feháras	$22$ Hús $_{-17}$
6 Lovál horaz		1 kosorí
0. Level - HOSSZ	2 salgas	2 (=tolog
1 nagyon apro	5 krem	3 iztelen
3 apro	4 szalmasarga	5 gyengen edes
5 kozepes	5 narancs	/ edes
/ nagy	6 világoszóld	9 nagyon édes
9 nagyon nagy	7 zöld	23. Mag - szín
7. Levél - szeldeltség	8 sötétzöld	1 fehér
1 nincs	9 feketészöld	2 krém
2 nagyon gyenge	<ol><li>16. Termés - héj rajzolat</li></ol>	3 szürke
3 gyenge	1 nincs	4 dohányszínű
5 közepes	2 van	5 világosbarna
7 erős	17. Termés - héj rajzolat típus	6 olajzöld
9 nagyon erős	1 hálózatos	7 barna
8. Levél - lebeny	2 hálós csíkok	8 piros
3 keskenv	3 fonalas csíkok	9 fekete
5 közepes	4 márványozott	24. Érési csoport
7 széles	5 keskeny tövis-alakú csíkok	1 korai nap
9 Virág szirom - méret	6 széles tövis-alakú csíkok	3 közénkorai
3 apró	7 füzérszerű csíkok	5 középérésű
5 közenes	8 szálas almosódó csíkok	7 középkései
7 nagy	0 mozaikos	9 kásaj
10 Virág griromlavál alala	19 Tormán bái grilárdaán	> KC2C1
10. v irag sziroinlevel - alak	10. Termes - nej sznardsag	
5 Kerek szeles	5 nem szilard	
5 kerek keskeny	5 közép szílárd	
7 kihegyesedő	7 szilárd	

Sorszám	Név	Növény fejlődési erély	Szár főinda hossza/m/	Szár szörözöttség	Levéllemez alak	Levél szín	Levél hossz /cm/	Levél szeldeltség	Levél lebeny	Virág szirom- méret /cm/	Virág sziromlevél alak	Terméskezdemény alak	Termés kezdemény szörözöttség	Termés alak	Termés felszín	Terméshéj színe	Terméshéj rajzolat	Termés héj rajzolat típus	Termés kéreg Vastagság /cm/	Terméshéj vastagságság	Terméhús szín	Hús konzisztencia	Hús levesség	Hús íz
Citrullus la	natus var. Lana	tus																						
Magyar fajt	uvar faitak																							
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
	Kecskeméti	5	4	5	5	7	19	7	5	1.6	3	5	5	2	3	7	2	3	1	7	7	7	5	7
2	Korai kines	3	4	5	5	7	19	5	7	17	3	5	3	2	5	8	2	2	15	7	5	7	7	7
1	Marsowerky	7	3.5	7	5	7	17	7	5	1.8	3	5	5	5	3	8	2	7	1,0	7	4	5	5	3
5	Napsugár	5	3,5	5	5	7	20	0	3	1,0	3	5	5	2	3	6	2	3	1,4	7	2	1	7	0
5	Szentesi	2	3,5			,	20	0	2	1,0		2			2	7	2		1	7	2	7	0	É.
6	sárgahúsú	3	3	,	,		16	9	3	1,0	,	3	2	2	3	/	2	0	1,5	/	2	/	9	)
8	Charleston	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
-	Crimson	3	3.5	7	7	7	17	5	5	14	3	5	5	5	5	7	2	6	15	7	5	7	9	7
9	sweet 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	<u> </u>
11	Sibiriak	3	3,5	5	5	5	17	9	7	1.9	3	3	3	2	3	8		2	1	5	7	1	5	7
12	Sugar baby	3	3	7	5	9	16	5	5	1,0	3	3	5	2	3	8	2	5	12	5	7	1	5	7
13	Ukrainskii	5	4.5	7	5	7	20	7	3	1,0	3	3	5	2	9	7	2	8	1,2	5	5	7	7	7
Táifaiták	Oktuniskij	2	190			· ·	20	,		1,10	v	v	<i>,</i>	-		,	~	Ŷ	1,50	Ŷ	~	,	<u> </u>	<u> </u>
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	í	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	Nagykálló	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	Nyirbator	7	3	7	>	7	22	7	2	2,2	3	3	5	2	3	7	2	1	1,3	5	7	2	9	7
29	Nyiregyhaza	1	4	/	5	/	20	1	)	2	3	3	5	2	3	0	2	0	2,5	5	2	1		5
21	Dios	7		5	5	9	20	0	2	1,9	5	5	3	2	3	0	1		1,7	3	7	1	1 7	7
32	Ráckava	7	3.5	5	5	7	10	7	3	1,9	3	3	3	2	3	6	2	6	1,2	7	2	7	5	7
32	Pákóczifalya	5	5,5	5	7	7	19	5	5	1,/	5	7	7	5	3	6	2	2	1,5	3	7	3	5	5
34	Sándorfalva	7	4.5	7	5	7	22	0	3	2	3	7	5	2	5	6	2	3	1	7	3	1	7	7
35	Szirma	7	5	5	5	7	23	5	5	2	3	5	5	2	9	7	2	8	12	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	1,2	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	Türkeye	7	3.5	5	5	7	19	7	5	15	3	7	5	5	3	8	2	2	1,22	5	7	7	3	3
Citrullus la	natus var. Citro	ides	.,.		· · ·					-,-							-	-	-				· · ·	<u> </u>
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 c	olocynthis	•		•								•						•		•	•			-
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	15	3	3	7	2	3	7	2	5	15	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'-cgcgtttacaaacaaattgtcc-3'

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

ITS4/2: 5'-gtcccccaaaggatgacgc-3'

## 3.3.2 SSR

Az összehasonlító SSR vizsgálatokban 47 mikroszatellita oligonukleotid-párból 12 bizonyult hatékonynak (10. táblázat).

#	lókusz	primer-pár szekvenciák	Hivatkozás
1.	CmTC 51	attggggtttctttgaggtga ccatgtctaaaaactcatgtgg	Katzir <i>et al.</i> , 1996
2.	CmTC 168	*atcattggatgtgggattctc acagatggatgaaaccttagg	Katzir <i>et al.</i> , 1996
3.	CMACC 146	caaccaccgactactaagtc cgaccaaacccatccgataa	Katzir <i>et al.</i> , 1996
4.	Bngl 339	ccaaccgtatcagcatcagc gcagagctctcatcgtcttctt	Smith et al., 1997
5.	Bngl 118-2	gccttccagccgcaaccct cactgcatgcaaaggcaaccaac	Smith et al., 1997
6.	Bngl 161	gctttcgtcatacacacacattca atggagcatgagcttgcatattt	Smith et al., 1997
7.	Phi 121	aggaaaatggagccggtgaacca ttggtctggaccaagcacatacac	Smith et al., 1997
8.	Phi 118-2	atcggatcggctgccgtcaaa agacacgacggtgtgtccatc	Smith et al., 1997
9.	Cl 1-06	caccctcctccagttgtcattcg aaggtcagcaaagcggcatagg	Jarret et al., 1997
10.	Cl 1-20	cgcgcgtgaggaccctata aaccgcctcaatcaattgc	Jarret et al., 1997
11.	Cl 2-23	gaggcggaggagttgagag acaaaacaacgaaacccatagc	Jarret et al., 1997
12.	Cl 2-140	ctttttcttctgatttgactgg actgtttatcccgacttcacta	Jarret et al., 1997

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

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

### 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP és 1 egység (U) Taq polimeráz (Sigma) felhasználásával. A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen módosítottuk: 2 perc 95°C, majd 5 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 62\*°C, 1 perc 72°C, majd 35 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 57°C, 1 perc 72°C, végül 5 perc 72°C (\*-Touch down 65°C - 55°C). A reakciótermékek elválasztását horizontális (1,5%) agaróz gélen végeztük EtBr-os festést alkalmazva (60 W, 1 óra).

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

#	lókusz	primerpár szekvenciák	hivatkozás
1.	clp12	agttcgagcctgattatccc gatgaacgctggcggcatgc	Al-Janabi et al., 1994
2.	ycf 9	aattagagggagggggtctcttgc ataataggctagctctgcactgatg	Dane et al., 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 MgCl<sub>2</sub>, 0.001% zselatin), 1-2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTP és 1 egység (U) Taq polimeráz (Sigma) felhasználásával. A reakciókörülmények közül a ciklusidőket és a hőmérsékletet a következőképpen módosítottuk: 2 perc 95°C, majd 5 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 65\*°C, 1 perc 72°C, majd 35 x ismétlődően: 10 mp 95°C, 30 mp 60°C, 1 perc 72°C, végül 5 perc 72°C (\*-Touch down 65°C - 55°C). A reakciótermékek elválasztását horizontális (1,5%) agaróz gélen végeztük EtBr-os festést alkalmazva (60 W, 1 óra).

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 gaaaaagtgagtggtgtgagga	Pong et al. 2007
2.	LCYB 1134	aatgatggtgtgaccattcaag cttacaatccaggctaccagg	Dalig <i>et ut.</i> , 2007

## 3.3.5 WGA

A WGA felszaporítás lépéseit a következőképpen hajtottuk végre:

(a) Fragmentálás: A felszaporítani kívánt minták DNS-éből ddH<sub>2</sub>O-val 1 ng/µl koncentrációjú oldatot készítettünk, a mintákhoz 1 µl 10 x fragmentáló puffert és 9 µl DNS-t (1 ng/µl) adtunk, és pontosan 4 percig 95°C-on denaturáltuk (PCR-készülékben, amit rövöd jégen tartás, és rövid centrifugálást követett).

(b) Genomi könyvtár készítése: A mintánkhoz 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  $\mu$ l PCR mastermix-et adtunk, ami a következőket tartalmazta: 7.5  $\mu$ l 10X Amplification Master Mix, 47.5  $\mu$ l nukleáz mentes víz, 5.0  $\mu$ l WGA phi29 DNS polimeráz. Az így kapott 75  $\mu$ l 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 abszorbciója 643 nm-en, emissziója 667 nm-en veszi föl a maximális értéket. Az SSR fragmentek szeparálását ALF express II DNA Analyser (automated laser fluorometer) készülékkel ReproGel High Resolution PAGE gél (24%) (Amersham 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 alkalmaztuk 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 fordulatszámon, 4°C-on centrifugáltuk. Steril körülmények között 5 µl templáthoz az alábbi klónozó mixet adtunk (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 klonozásához 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 lókuszok variabilitását a PIC érték (polymorphism index content) meghatározásával végeztük, amelynek kiszámításához az Anderson *et al.*, (1993) formulát alkalmaztuk : PIC =  $1 - \sum_{n-i} P_i^2$ , ahol a pi érték az i allél gyakorisága. A 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 ásatásai során előkerült növényleleteiből származnak. A 15. századi *Citrullus* magvak a budai királyi vár (Árpád-házi IV. Béla Király, 1243) Zsigmond-kori szárnyának (15. sz. eleje) régészeti feltárása (1999) során (Budapest I. Ker., Szent György tér, Teleki palota, 8 sz. kút) (Nyékhelyi, 2003) kerültek feltárásra. Az ásatások során nagy mennyiségű növénymaradvány került elő, 195 növényfaj több mint 3 millió maglelete (Gyulai *et al.*, 2006). A régészeti kormeghatározás alapján (pénzek, edények stb.) a *Citrullus* magok eredete a 15. század első felére volt azonosítható (Nyékhelyi, 2003). A 19. századi *Citrullus* lelet botanikai gyűjtemény anyaga, az 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 ásatások 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, Tápiószele) 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 abszorbciós elemzésekre is (A260/280 és A260/230).



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<sub>260/280</sub>, A<sub>260/230</sub>) értékei.

minta #	ng/µl	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Minta #	ng/µl	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
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 abszorbciós 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).

Sample ID	ng/µl	A <sub>260/280</sub>	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

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

## 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).

(a)				(b)				(c)
DNS	ng/µl	A <sub>260/A280</sub>	A <sub>260/A230</sub>	DNS	ng/µl	A <sub>260/A280</sub>	A <sub>260/A230</sub>	
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

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

- 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'-cgcgtttacaaacaaattgtcc-3'

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

ITS 4/2: 5'-gtcccccaaaggatgacgc-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.



а

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.

cmtc168

### bngl339



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

72
SSR		cmct168	bngl	161	bngl	118-2	phi1	18-2	bng	1339	phi	121	cma	x146	cmo	ct51		cl1-06		c11	-20	cl2-	-23	cl2-140	
			a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	с	a	b	a	b		Total
nt		126	139	146	124	132	132	136	113	131	124	130	124	136	306	309	130	145	150	181	187	178	183	190	N <sup>o</sup>
PIC (	érték	0	0,4	49	0,	.37	0,	49	0,	48	0,	49	0,	30	0,	44		0,64		0,	,38	0,4	18	0	
#	CV.																								
1.	C.c.	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•		•	•	•	•			•	•		•	18
2.	C.c.	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•			•		•			•	•		•	16
3.	C.c.	•	•	•	•	•		•		•	•	٠	•		•	•		•				•		•	18
4.	C.1.c.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•				•	•	•	20
5.	C.1.c.	•	٠	٠	٠	•	•		٠	٠		٠	٠	•				٠			٠			•	18
6.	C.1.c.	•	•	٠	٠		٠	٠	٠		٠	٠	٠	٠	٠	٠		•			٠	٠	٠	•	18
7.	C.1.1.	•		٠	٠		٠		٠	٠	٠	٠	٠		٠		٠	٠	٠	٠			٠	•	18
8.	C.1.1.	•	•	٠	٠		٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠		•			٠	٠	•		•		•	17
9.	C.1.1.	•	•	•	•		•	•	٠	•	٠	•	•		•			•		٠				•	15
10.	C.1.1.	•	•	•	•		•	•		•	•		•		•		•	•		•				•	14
11.	C.1.1	•	•	•	•		•		•		•		•		•		•		•	•		•		•	14
12.	C.1.1	•	-	•		•	-		•	•	•	•	•				•	•	•	•	•			•	16
13.	C11	•		•	•	-	•		•	•	•	•	-			-	-	•	-	•	-			•	13
14	C11		•		-		•	•	•	•	-	•		•	-	•	•			•					18
15	C11						-		-	-			-	-			-	-			-		-		10
16	C.11		-		•	-		-	•			-			•	-	•			•		-			11
17	C11				•	-			•		•	•	•	-					•	•					20
18	C11		-		•			-		•	-		•				-		•		-				13
10.	C11			-						•		•			-	-				-					13
20	C11			-		•					•						•	•		-		•			15
20,	C.1.1.		•	-	•									•	•	•				-			-		13
21.	C.1.1.			-			•		•	•									•	-					15
22,	C.1.1.			•							•	•					•			-			•		14
23.	C.I.I.		•		•	•		•					•	•											15
24.	C.I.I.			-			•		•	•					•	•		•		-		•			14
25.	C.I.I.			-	•			•			•			•						-					12
26.	C,I,I,	•	•	-	•		•			•	•	•	•		•		•	•	-	•		•	•	•	18
27.	C.I.I.	•		•	•			•		•	•		•						•	•				•	11
28,	C,1,1,	•	•	_			•				•	•	•		•		•	•		•			•	•	13
29,	C.1.1.			-	•		•	•	•			•			•			•	•	•		•		•	13
30.	C.1.1.	•	•	•	•	•		•		•	•		•		•		•	•		•				•	14
31.	C.1.1.	•	•	•	•	•	•		•		•	•	•				•			•				•	13
32,	C.1.1.	•	•		•		•	•	•	•		•	•		•			•		•				•	13
33.	C.1,1,	•		•	•		•	•	•		٠		•							•			٠	•	13
34.	C.1.1.	•		•			•	•			•		•		•		•			•				•	13
35.	C.1,1,	•	•	•	•	•	•					•	•		•		•	•		•				•	13
36.	C.1.1.	•	•	•	•						•	•	•		•	•		•	•	•		•		•	18
37.	C.1.1.	•	•	١			•	•				•						•		•				•	14
38.	C.1.1.	•	•	١		•	•	•							•			•		٠				•	15
39.	C.1,1,	•	•	١						•					•			•	١	٠			١	•	12
40.	C.1.1.	•	•					•							•	•								•	17
41.	C.1.1.	•		٠	•			•	•	•	•	•			•		•		٠	٠				•	13
42.	C.1.1.	•					٠													•				•	12
43.	C.1.1.	•	•	١	١		٠		٠			٠	١	٠	٠			٠	١	٠			١	•	15
44.	C.1.1.	•		١	١		٠	٠	٠		١	٠	٠		٠				٠	٠			١	•	14
45.	C.1.1.	•	•		٠		٠	٠	٠		١	٠	٠			٠	٠	•	٠	٠	١			•	17
46.	C.1.1.	•		•	١		٠		٠	٠	١	٠	٠	٠	٠	٠	٠			٠	٠	•	١	•	19
47.	C.1.c	•	•	•			•	•			•		•		•			•		_		•		•	16
	Nº	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	70	6	5	3	6	7	6	7	1	4	4	7	5	3		81		5	53	3	6	47	701

16. táblázat. Az ALF-SSR (<u>a</u>utomata <u>l</u>aser <u>f</u>luorometer) elemzés mintázata 12 mikroszatellita (SSR) lókusz, 23 allél, 701 fragmentum alapján a 44 mai és a régészeti (#45, 45, 47) mintákban.



35. ábra: Molekuláris dendrogram elemzés a mai (1-44), valamint a régészeti (45-47) *Citrullus* mintákban a 12 SSR mikroszatellita lókusz, 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 dendrogramm elemzése során elmondható, hogy a 13. századi debreceni lelet a #17 (Klondike) és #36 (Kecskeméti vöröshúsú), a 15. századi budai a #12 (Belyj dlinnij) és #14 (Csárdaszállás), míg a 19. századi *Citrullus* maglalet a #4 (Szeged), #5 (Román 235), #6 (Újszilvás) mai fajtákkal mutatja a legközelebbi rokonságot (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 maglelt 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 kloroplasztiszt 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).



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 lókuszán az *lcyb*-specifikus primerekkel (Bang *et al.*, 2007), #3-43 mai minták, #45, 46, 47 régészeti minták.

- 4.6 Szekvenciaanalízis 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)<sub>8</sub> deléciós-allél hordozásával (385 bp - 392 bp), amely lókuszon a Túrkeve (#20), és a 15. századi (#46) *Citrullus* heterozigóta: (C)<sub>8</sub> / (C)<sub>3</sub>. 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)<sub>3</sub> deléció van a (C)<sub>8</sub> 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)<sub>8</sub> 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 ősibb fajta lehetett, mint a kétszáz évvel korábbi 13. századi (#45) dinnye. A #19, 23, 25, 30, 33 és 43 fajtákban nem (C)<sub>8</sub>, hanem csak (C)<sub>1</sub> 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 $\rightarrow$ T a 407. nt-on; és két T $\rightarrow$ C az 545. és az 575. nt-on). Ezek az SNP-szubsztitúciók az #1-6 mintákban, valamint az ezeken az SNP pontokon is heterozigóta mintákban (#20, cv. Túrkeve; és a 15. századi #46) archeo minta; ld. az #5 sártök minta is heterozigóta) van jelen. Végül a három régészeti és 44 mai *Citrullus* szekvenciájának felhasználásával elkészítettük az ITS dendrogrammot (MEGA4) (40. ábra)

	10 20 30 40	50 380 390	400 410	520 530	550 56	0 570 580	590 600	610
	· · · · ·   · · · ·   · · · ·   · · · ·	//   .	//.		′			
AJ488232	CGCGTTTACAAACAAATTGTCCGTGCCGGTGGGCGGGGGGAAgCAT	TATGCTCGT GCCCCCCCCCCC-	ACACAACACCCCATGCGGG A	ACACTACGGTGGTTGATCCG	TCCTGACGTCGCCTCCTT	GTGGACTCCTACACCGACCCTI	TGAACGCTGTCCCCCCAAAGGATGAC	GC
#					-			
1.			-T	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	T	T	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
2.			-1	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	T	·····	••••••	••
3. 4			-1		т.	т с		••
6.			-T			т.		
47.			-T					
5b		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						•••
5a			-тс	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	T	тс		••
20a	••••••	•••••••••••••••••••••••••••••			•••••	·····	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
20b			-тс		<b>T</b>	TC	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
46a 46b	••••••			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	·····		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
46D			-1				•••••••	••
7.								
8.								••
9.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						•••
11.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						•••
10.	•••••			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	·····c		••
12.	••••••	••••••••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••			••
13.	••••••	••••••••••			•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
14.	••••••	••••••••••		•••••	•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
15.	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	••••••••••••••••••••••••••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••		••••••	••
17	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				•••••			••
18.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						••
21.								
22.								•••
24.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						•••
26.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						•••
28.	•••••			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
29.	••••••	••••••••••			•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
31.	••••••			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
32.	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				•••••		••••••	••
35.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						••
36.								
37.								•••
38.		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						•••
39.	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••							••
40.	••••••	••••••••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
41.	••••••	••••••••••			•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
42.	••••••	•••••••••		•••••	•••••		••••••	••
44.	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				•••••		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
-10.	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••				••••••			••
19.			c					••
23.			c					•••
25.		c	c					•••
27.		c	c					••
30.	•••••	c	c					••
33.	••••••	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	c		•••••	•••••••••••••••••••••••••••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••
43.	••••••••••••••••••	c	c					••

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)<sub>26-30</sub> nSSR (Cl1-20) lókuszon (183 bp) végzett teljes szekvencia elemzés (41. ábra), illesztés és BLAST analízis során egy (CT)<sub>4</sub> inverziót (133-140 bp) azonosítottunk, a régészeti és a mai fajtákban amely (CT)<sub>27</sub> egyszerű mikroszatellita lókuszból kialakuló (CT)<sub>17</sub>-C-(TC)<sub>4</sub>-T-(CT)<sub>5</sub> 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)<sub>3</sub> - deléciót (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 *Citrullust* 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).

	10	70	80 9	0 100	110	120	130	140	150	160	170	180
		7										
1	CGCGCGTGAGGACCCTATA	AAGCGTGCCTTCTTTC	TTCTCATTAGTAG	ceteccetetetetetetetetetetetetetetetete	CTCTCTCTCTCT	CTCTCTCTCTCT	стстсстстст	CTTCTCTCI	CTCTCGAGAG	AGCGAGAAC	CGCCTCAAT	CAATTGC
2						<del></del>		<mark></mark>		<del></del>		
3								<mark></mark>				
4												
5												
6								<mark></mark>				
47								. <b></b>				
12a							<mark></mark> .	. <b></b>				
12b								<mark></mark>				
14a							• • • • • • <mark>• • • • •</mark> •	<mark></mark>				
14b								<mark></mark>				
17a							<mark></mark> .	<mark></mark>				
17b		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •						<mark></mark>	••••			• • • • • • •
36a		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •				• • • • • • • • • • • •	• • • • • • <mark>• • • • •</mark> •	<mark></mark>	••••			• • • • • • •
36b	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••				••••••••••		. <b></b>	••••			• • • • • • •
45a	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••				• • • • • • • • • • • •	<mark></mark> .	. <b></b>	••••			• • • • • • •
45b		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •						<mark></mark>	••••			• • • • • • •
46a	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••				• • • • • • • • • • • •	<mark></mark> .	. <b></b>	••••			• • • • • • •
46b	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••				••••••••••		<mark></mark>	••••			• • • • • • •
7	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••		• • • • • • • • • • • • • •		••••••••••	·	<mark></mark>	••••			• • • • • • •
8	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••				••••••••••		. <b></b>	••••			• • • • • • •
9	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • •		•••••	·····	· • • • • • • • • • •	••••		• • • • • • • • • • •	•••••
10	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • •		•••••	·····	· • • • • • • • • • •	••••		• • • • • • • • • • •	•••••
11	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • •		•••••	·····	· • • • • • • • • • •	••••		• • • • • • • • • • •	•••••
13	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • • • • •		•••••	·····	· • • • • • • • • • •	••••		• • • • • • • • • • •	•••••
15	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••	· · · · · · ·	• • • <mark>• • • • • • • •</mark>	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • •
16	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••	· · · · · · ·	• • • <mark>• • • • • • • •</mark>	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • •
18	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	••••••••••		• • • <mark>• • • • • • • •</mark>	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	•••••
19	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	••••••••••		• • • <mark>• • • • • • • •</mark>	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	•••••
20	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••		• • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	•••••
21	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • •	••••••		• • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • •
22	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••		••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • •
23	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••		••••	•••••	•••••		•••••
24	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••		••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • •
25	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •	•••••••••••		••••	•••••	•••••		•••••
20	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •			••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	•••••
27	•••••	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • •			••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	•••••
20		•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • •			••••••••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	•••••
30									•••••			•••••
31		•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • •			••••••••••	•••••	• • • • • • • • • • •	•••••	•••••
32									•••••			•••••
33									•••••			•••••
34						<del>.</del> .						
35												
37						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						
38						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						
39												
40						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·						
41												
42												
43												
44												

41. ábra: A régészeti és a 44 mai *Citrullus* minta (7. táblázat, 55.old.) elemzése a cl 1-20 lokuszon. A  $(CT)_4$  inverzió (132-140 bp), és a  $(CT)_3$ -deléció kiemelésével.

## 4.6.1.3 A kloroplasztisz DNS (cpDNS) elemzése

A kloroplasztiszt (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) lókusz 320. nt-ján azonosított transzverzió (T=A  $\rightarrow$  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 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* lókusz szekvenciáinak felhasználásával elkészítettük a 44 mai és három régészeti *Citrullus* minta klaszter analízisét (43. ábra), amellyel jól elkülöníthetők az egyes *Citrullus* fajcsoportok egymástól.

	10 20    /	320 // /	390 /	400 	470 //	480 	490 .	500	510 520	580 //  /	620 /	630 é	;40 
AY522531 C.c.	AATTAGAGGGAGGGGTCTCTTG	ACATATT	TATAATI	ATATAGAAAAAAGA	GAAATAGTATAG	GTATAAAATATAC	TTTAATATAAAA	TATAGTAAATA	ATATTATATATATAT	AAAACTAG	AATAGG	CTAGCTCTGCACTGA	'G
1.								• • • • • • • • • • •		· · · · · <mark></mark> · · · · ·			•
2.										· · · · · <b></b> · · · · ·			•
3.								•••••		· · · · · <mark></mark> · · · ·			•
AY522539 C.l.l.		A							······.	ATAGC			
4.		A	· ·						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
5.		A							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
6.		A	••						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			·
AY522537 C.l.c.		A								ATAGC			•
7.		A	· ·						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
8.		A	· ·						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
9.		A	· ·						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
10.		A	· ·						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
11.		A							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
12.		A							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
13.		A							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
14.		A							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
15.		A							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATAGC			•
16.		A								ATAGC			
17.		A								ATAGC			
18.		A								ATAGC			
19.		A								ATAGC			
20.		A								ATAGC			
21.		A								ATAGC			
22.		A								ATAGC			
23.		A								ATAGC			
24.		A								ATAGC			
25.		A								ATAGC			
26.		A								ATAGC			
27.		A								ATAGC			
28.		A								ATAGC			
29.		A								ATAGC			
30.		A								ATAGC			
31		Δ								ATAGC			
32.		A								ATAGC			÷
33		Δ								ATAGC			•
34		Δ								ATAGC			•
35		Δ								ATACC			•
36		лн							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATACC			·
27		7	••						•	ATAGC			·
20		лн							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATACC			·
20.			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •						•				·
39. 40		A								AIAGC			·
40.		A								AIAGC			·
41. 40		A								AIAGC			·
±∠. 10		A								ATAGC			·
43.		A							· · · · ·	ATAGC		• • • • • • • • • • • • • • • • • •	·
44.		A							· · · · ·	ATAGC		• • • • • • • • • • • • • • • • • •	·
45.		A							· · · · ·	ATAGC		• • • • • • • • • • • • • • • • • •	·
40.		A								ATAGC			·
47.		A								ATAGC			

42. ábra: A régészeti és a 44 mai *Citrullus* minta (7. táblázat, 55.old. elemzése a cpDNS ycf9-orf62 lokuszon. A deléciós 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* lókuszon (45. ábra): A cpDNS *tRNA-Val - rps12* lókuszán (296 bp) (Jarret *et al.*, 1997) minden *Citrullus* minta egy G $\rightarrow$ 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 $\rightarrow$ 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 takarmánydinnyéket (*Citrullus lanatus citroides*) a görögdinnyéktől (*Citrullus 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 $\rightarrow$ A) szubsztitúció

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

További A $\rightarrow$ G szubsztitúciót (102.416. nt) a #8, #15, #20, #23, #29 fajtákban, valamint egy háromszoros A $\rightarrow$ 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 $\rightarrow$ 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.

LRM	A-VAL(gac) (72 bp)	rps12 (275 bp)	
102.155	102.205 102.215 102.225 102.235 102.245	102.410 102.420 102.430 102.440 102.450 102.460	1 102.485 102.495
	(/	/	/ - 1 1 1 1 1
aggg	//agttcgagcctgattatccc		
c.sat.	$\underline{agttegagcetgattatecc} taaacceaatgtgagtttttetattttgacttg$	$\verb+aattagctttgtctacgaacaaggaagctataagtaatgcaactatgaatctcatggagag$	gatgaacgetggeggeatge
1.		E	
2.		t	
з.	tt	t	
4.	tt	t	
5.	tt	t	
б.	tt		
47_	<b>t</b>	·····t	
7.	t		
10.	tt.		
16.	tt		
18.	ttt		
21.	tt		
24.	······································		
25.	tt		
26.			
27.	tttt.		
34.	T		
39.	······································		
41.	tt		
44.		***************************************	
12.	t	·····	
14.	tt.	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
17.	······································		
36.	······································		
45.	······	aa	
40.	······································	······································	
8.	t	gg.	
15.	tt	q.	
20.	·················	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
23.	······································		
29.	E	gg.	
11.	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ggg.	
19.	tt.	ggg.	
22.	tt		
28.	t		
31.		g	
33.	tt	gggg	
35.	······································	d	
37.	tt	g	
40.	······································	àà	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
42.	······································		
43.	······································		
9.	t	gg	
13.	tt	gggg	
30.	tt		
32.	tt	gg	
38.	t	gg	

45. ábra: A régészeti és a 44 mai *Citrullus* minta (7. táblázat, 55.old.) elemzése a cpDNS a *tRNA*-Val - *rps*12 lokuszon összehasonlítva az adatbanki szekvenciával, kiemelve a szubsztitúciós pontokat (102.407, 102.416, 102.418, 102.442, 102.443 nt).

A két cpDNS lókusz 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*) génbanki 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-

.	/.  /	/	/	/	/
CTGTTCTTCTGGAGTTCTTGGGGGATTTGTTGAAATTTT	CTTTGCTTAAAA	TGGGGTTTCGGAAAAAGTGAGTGGTGTGAGGA	AATGATGGTGTGACCATTCAAGCTGCC	GCCACTGGCTTCTC	TAAGCCTTACAATCCAGGCTACCAGG
		·····			·····
CTGTTCTTCTGGAGTTCTTGGGGGATTTGTTGAAATTTT	CTTTACTTAAAA	TGGGGTTTCGGAAAAAGTGAGTGGTGTGAGGA	AATGATGGTGTGACCATTCAAGCTGCC	GCCACTGGCGTCTC	TAAGCCTTACAATCCAGGCTACCAGG
	A	•••••		G	
••••••	A	•••••		G	
•••••••••••••••••	A	•••••		G	
•••••	A			G	
••••••	A	•••••		G	
•••••	A			G	
	A			G	
•••••••••••••••••	A	•••••		G	
•••••••••••••••••	A	•••••		G	
	A	•••••		G	
•••••••••••••••••	A	•••••		G	
•••••	A			G	
•••••••••••••••••	A	•••••		G	
	A	•••••		G	
••••••••••••••••••	A	••••••		G	
•••••••••••••••••	A	•••••		G	
••••••••••••••••••	A	••••••		G	
	A	••••••		G	
	A	••••••		G	
•••••••••••••••••	A	••••••		G	
•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	A	••••••		G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	
	A			G	

47. ábra: A régészeti és a 44 mai Citrullus minta (7. táblázat, 55.old.) elemzése a lycb lokuszon kiemelve a két SNP pontot (518. és az 1182. nt).

320

EF183522

1. 2.

3.

4.

5.

6 7.

8.

9.

10. 11.

12. 13.

14. 46.

47.

15.

16.

17. 18.

19. 20. 21.

22. 23.

24. 25.

26.

27.

28.

29.

30.

31.

32.

33.

34

35.

36.

37.

38. 39.

40.

41.

42.

43. 44.

45.

EF183521

330

340

2 5 0

E 2 0

EGO

E 7 0

EOO

E 0 0

1140

1150

1160

1100

1210

1 2 2 0

1220

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 ősibb 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 görögdinnyék 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* vörös EF183522 és sárga EF183521 allélek génbanki adatainak összehasonlításával.

## 4.6.2 Fajtarekonstrukció

A morfológiai, ITS SNP, SSR, cpDNS, lcyb színgén allélgyakoriság adatai alapján elvégzett cluster analízisben megállapítható a régészeti *Citrullus* magvak legközelebbi genetikai rokonsága a mai fajtákkal. 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

- 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 fajtával 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.
- Igazoltam a teljes genom amplifikáció (WGA) alkalmazhatóságát az ősDNS minták nagy mennyiségű és szekvenciahű felszaporíthatóságára. A WGA amlifikáció 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 vetettem 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*  $\beta$ -*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 (*trna*VAL-rps12), illetve további kettő (*Ycf*9) haplotípus azonosításával.
- 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 görötgdinnye (*Citrullus lanatus lanatus*), a 15. századi görögdinnye (*Citrullus 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 csírázóképességüket. *In vitro* körülmények között sterilezett magvak jól szelektálhatók az exogén fertőzöttségű magvaktól.

Az alkalmazott DNS izolálási módszerrel megfelelő minőségű és mennyiségű ősDNS izolálható a régészeti magokból. A különböző molekuláris mószerekkel kiszűrhatő 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 nyújhatnak 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 szövettenyészeti 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 összehasonlításábna. 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 regióban 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 SNPszubsztitúciók az #1-6 mintákban, valamint az ezeken az SNP-en is heterozigota 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 igazoltan 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)<sub>8</sub> deléciós-allél hordozásával (385 bp - 392 bp).

Az összehasonlító mikroszatellita ujjlenyomat analízishez a Cy5 fluorescens festékkell jelzett primereket alkalmaztam, amely 632,8 nm-en gerjeszthető, és 660-670 nm-en fluoreszkáló (Helium-Neon lézerrel gerjesztett) (2,5 mW output) ALFexpress II műszert használtam. A fluorescens jelölésből eredően a módszer érzékenysége nagyon magas, és képes volt kimutatni az 50 amol (5 x 10<sup>-14</sup> M) és 45 fmol (4,5 x 10<sup>-11</sup> M) közötti DNS mennyiségeket. Az összehasonlító vizsgálathoz használt 16 SSR lókusz közül a régészeti mintákban 12 SSR primerpár adott megismételhető, és a fajra jellemző mérettartományban alléleket, melyekben 23 lókuszon összesen 701 SSR fragmentumot azonosítottam. A lókuszokon azonosított allélszám 2-3 között változott, átlagosan 2,1 allélszámot azonosítottam, a következő megoszlásban: bngl161 (2 allél), bngl118-2 (5 allél), phi118-2 (2 allél), bngl339 (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 lókuszokon 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 végezteem. A *ycf9-orf62* lókusz 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 takarmánydinnyéket (*Citrullus lanatus citroides*) a görögdinnyéktől (*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 nyújhatnak 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.

#### 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 form 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 (*Phargmites 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 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, recessice), respectively (reviewed in Bang *et al.*, 2007).

The enzyme *LCYB* (*lycopene*  $\beta$ -*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., Lipmand, 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., Sorrels 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 mitdemNachbau keimfahiger Gersten- und Hafer korner aus dem Grundstein des 1832 errichteten. N<sup>-</sup>urnberger 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., Viloria, 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., Leskovar, 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 Veroffentlichungen Deutsches Archaologisches 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 wholegenome 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. Növénynemesítési Tudományos napok. 95'. MTA. Budapest. 1996 Január 22-23. Összefoglalók p. 63.
- Bársony, Cs., Bisztray, Gy., Dula, B-né. (1995) Fuzárium rasszok szerepe a görög és sárgadinnye rezisztencia nemesítésben. Növénynemesítési 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., Taksley, 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.5<sup>th</sup> IVCHB Symposium, In Vitro Culture and HorticulturaBreeding,12-17. September 2004, Debrecen, H ungary, 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. 5<sup>th</sup> IVCHB Symposium, In Vitro Culture and Horticultural Breeding,1 2-17. 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, LS., 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 inmigrants with substantially more western Eurasian mitochondrial DNA lineages. Hum Biol 77:629-652.
- Bolnick, DA., Bonine, HM., Mata-Míguez, J., Kemp, BM., Snow, MH., LeBlanc, SA. (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., Berthonaud, 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 molekular 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, PF., Craig, OE., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., Gilbert, MT. (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, PF., Craig, OE., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., Gilbert, MT. (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., Pieniezak, 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 oldDominican amber. Med. Sci. Res. 20, 619–622.
- Cappellini, E., Gilbert, MT., Geuna, F., Fiorentino, G., Hall, A., Thomas-Oates, J., Ashton, PD., Ashford, DA., Arthur, P., Campos, PF., Kool, J., Willerslev, E., Collins, MJ. (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, AA., Macphee, RD., Poinar, HN. (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, AR., Carvalho, GR., 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.
- Elenga, 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, TL., 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 ifferences 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 33<sup>rd</sup> 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, MF., 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, BA., León, B., Buffen, AM., Thompson, LG. (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, JP., 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., Kućan, 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, RE., Krause, J., Briggs, AW., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, MH., Hansen, NF., Durand, EY., Malaspinas, AS., Jensen, JD., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Prüfer, K., Meyer, M., Burbano, HA., Good, JM., Schultz, R., Aximu-Petri, A., Butthof, A., Höber, B., Höffner, B., Siegemund, M., Weihmann, A., Nusbaum, C., Lander, ES., Russ, C., Novod, N., Affourtit, J., Egholm, M., Verna, C., Rudan, P., Brajkovic, D., Kucan, Z., Gusic, I., Doronichev, VB., Golovanova, LV., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., Schmitz, RW., Johnson, PL., Eichler, EE., Falush, D., Birney, E., Mullikin, JC., 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., Kőmíves, 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 4<sup>th</sup> (Mongolia) and 15<sup>th</sup> (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 Genetetics 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 neusteeinzeit 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 Conspecific. PLoS ONE 6(4): e18728. doi:10.1371/journal.pone.0018728
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, 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. Quatarnary 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., Currant, A., Pääbo, S. (1996b) Molecular phylogeny of the extinct ground sloth Mylodon darwinii. 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 Monogenomic Species of the Wheat Tribe, Triticeae (Poaceae), Inferred from Nuclear Rdna (Internal Transcribed Spacer) Sequences. Genome 38, 211-223.
- Huynen, L., Gill, BJ., Millar, CD., Lambert, DM. (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, CD., Lambert, DM. (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, NH., Andersen, K., Orlando, L., Gilbert, MT., Willerslev, E. (2012) A comparative study of ancient sedimentary DNA, pollen and macrofossils 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, FB., Chen, S., Rosenbom, S., Moehlman, PD., Tuross, N., Sabin, RC., Peters, J., Barich, B., Yohannes, H., Kebede, F., Teclai, R., Beja-Pereira, A., Mulligan, CJ. (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., Steppan, 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, BL., Williams, CG. (2001) Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. J Herdity 92:327–332.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L. (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates Nucl Acid Res 21:1111-15.
- Lágler, R. (2007) A köles (Panicum miliaceum): ISSR and SSR szekvencia stabilitása középkro 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 4<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> 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., Caccone, 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, JA., 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.
- Llamas, B., Holland, M. L., Chen, K., Cropley, 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., Talaee, 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 Ychromosomal, 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 bankderived populations of Eriophorum vaginatum. Arctic and Alpine Research 25: 45–49.
- Mende, B.G. (2006) Possibilities and limitations int he 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.
- Nyékhelyi, 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.
- Ottoni, 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 fur Urgeschichte der Universitat Tubingen.
- 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 elephantids. 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., Malaspinas, 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, JF., Al-Rasheid, KA., 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., Ziegle J. (1997) An evaluation of the utility of SSR éoci 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] Mikrobiologiia. 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, TL. (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 lókuszán 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, Czch 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, JS., Durkin, JMH., 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 lókuszok evolúciója a görögdinnyében (Citrullus lanatus) a középkor óta; (CT)<sub>3</sub> deléció a (CT)<sub>26</sub> 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 (fordítta 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 Changssha Han Tomb. Sheng wu hua hsueh yu sheng wu 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 Changssha Han Tomb. Sheng wu hua hsueh yu sheng wu 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., Krolik, H., Kubiak-Martens, L., Harlan. J.R. (1995) Archeobotany of the Early neolithic site E-75-6 at Nubta Playa, Western Desert, South Egypt (preleminary 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, JL., 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), 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

- Gyulai G, Z Szabó, B Wichmann, A Bittsánszky, LWaters Jr, Z Tóth, F Dane (2012) Conservation genetics

   Heat Map analysis of nuSSRs of aDNA of archaeological watermelons (Cucurbitaceae, Citrullus I. lanatus) compared to current varieties. Genes, Genomes and Genomics 6 (SI1): 86-96.
- 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 4<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> centuries. *Hung Agric Res* 2006/1:14-19.
- Gyulai G, M Humphreys, R Lágler, Z Szabó, Z Tóth, A Bittsánszky, F Gyulai, L Heszky (2006) Seed remains of common millet from the 4<sup>th</sup> (Mongolia) and 15<sup>th</sup> (Hungary) centuries; AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries. *Seed Science Research* 16:179-191. (IF: 1,892)
- 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)
- Başli Ag, G Gyulai, Z Tóth, A Güner, Z Szabó, Vl Stakhov, L Murenyetz, 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 Başli, 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

- 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.
- Gyulai G, Z Tóth, A Bittsánszky, Z Szabó, G Gullner, J Kiss, T Kőmíves and L Heszky (2008) Gene upregulation 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.

## Magyarnyelvű tudományos folyóiratcikkek

- 11. Tóth Z, Gyulai G, Szabó Z, Heszky L (2008) Sejtmagi mikroszatellita és cpDNS szekveniák diverzitása görögdinnyében (*C. lanatus*). *Agr Vidékfejl Szemle* 2008/3(1): 1-5.
- Tóth Z, Gyulai G, Szabó Z, Horváth L, Gyulai G, Heszky L (2007) Mikroszatellita lókuszok evolúciója a görögdinnyében (*Citrullus lanatus*) a középkor óta; (CT)<sub>3</sub> deléció a (CT)<sub>26</sub> nSSR-ban. *Agrártud Közl* 27: 125-134.
- 13. Szabó Z, Gyulai G, **Tóth Z**, Heszky L (2007) SNP elemzés az rDNA ITS-5.8S-ITS2 lókuszán a mai és a középkori sárgadinnyében (*Cucumis melo*). Agrártud Közl 27: 27: 120-124
- 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*) ökoremediációs 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 fajtákig. *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 növénynemesítésben. XV. Növényenmesítési Tudományos Napok, Budapest, ISBN: 978-963-508-575-0, pp. 507-511.
- Tóth Z, G Gyulai, Z Szabó, F Gyulai, L Heszky (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**, G Gyulai, Z Szabó, A Bittsánszky, L Heszky (2008b) Genotype (nSSR) and haplotype (cpDNA) identification in watermelons (Citrullus I. lanatus). General Meeting EUCARPIA, Valencia, Spain, pp. 253-257.
- 20. **Tóth Z**, G Gyulai, Z Szabó, L Heszky (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.
- Kenéz Á, Gyulai G, Tóth Z, Szabó Zoltán, Lágler R, Heszky L, Gyulai F (2009) Római Kori (Keszthely-Fenékpuszta, (5. sz.) Növényleletek Azonosítása: I. Egyszikűek. Hagyomány és haladás a növénynemesítésben. XV. Növéynenmesítési 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) Paraquattoleráns nyárfa *in vitro* szelekciója és molekuláris jellemzése. Hagyomány és haladás a növénynemesítésben. XV. Növéynenmesítési Tudományos Napok, Budapest, ISBN: 978-963-508-575-0, pp. 31-35.
- 23. Szabó Z, G Gyulai, **Z Tóth**, A Bittsánszky, L Heszky (2008) Sequence diversity at the loci of nuclear SSRs and ITS1-5.8S-ITS2 of rDNA of 47 melon (Cucumis melo) cultivars and an extinct landrace excavated from the 15<sup>th</sup> century. General Meeting EUCARPIA, Valencia, Spain, pp. 244-249.
- 24. Szabó Z, G Gyulai, Z Tóth, L Heszky (2008) Morphological and molecular diversity of 47 melon (Cucumis melo) cultivars compared to an extinct landrace excavated from the 15<sup>th</sup> Century. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008, pp.313-321.

#### Tudományos konferencia absztraktok

- Tóth Z, Gyulai G, Szabó Z, Gyulai F, Horváth L, Kiss J, Heszky L (2008) Haplotípusok azonosítása görögdinnyében (Citrullus lanatus). XIV<sup>dik</sup> Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA Budapest, 2008. március 12. p. 14.
- Tóth Z, Gyulai G, A Başli, R Lágler, A Güner, Z Szabó, A Kis, A Bittsánszky, L Heszky (2007) Morphological and molecular reconstruction of 15<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> cent. watermelons (C. lanatus). IWGP14, 14<sup>th</sup> Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
- 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 deléció 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, Szabó Z, Güner A, Başli Ga, Bittsánszky A, Heszky L (2007) Összetett mikorszatellita születése egyszerű SSR-ból (CT)<sub>3</sub> deléció és (CT)<sub>4</sub> inverzió a görögdinnye (Citrullus lanatus) (CT)<sub>26</sub> nSSR lókuszán.
- Tóth Z, G Gyulai, L Horváth, F Gyulai (2006) Molecular and morphological reconstruction of a medieval melon (Cucumis melo). 36<sup>th</sup> International Symposium on Archaeometry (ISA 2006), május 2 - 6, Quebec City, Canada.
- Tóth Z, Gyulai G, Szabó Z, Mórocz S, Hajósné N M, Lágler R, Kálmán L, Kiss J, Bock I, Bittsánszky A, Koncz S, Bottka S, Heszky L (2006) SSR és cpSSR lókuszok Q-PCR és ALF-SSR elemzése kukorica (Zea mays L.) vonalakban és hibridekben, XII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, p. 175.

- 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.
- Kis A, Gyulai G, Lágler R, Szabó Z, Gubin Sv, Tóth Z, Stakhov Vl, 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 Vl, Bittsánszky A, Yashina Sg, Heszky L (2007) Morfológiai és molekuláris elemzés jégkorszaki Silene magokban. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.78.Budapest.
- 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 Başli, A Bittsánszky, L Heszky (2007) Morphological and molecular analysis of ancient common millet (P. miliaceum) seeds. IWGP14, 14<sup>th</sup> Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
- 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.
- 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
- Lehoczky P, Gyulai G, Szabó Z, Lágler R, Tóth Z, Kis A, Bittsánszky A, Bock I, Heszky L (2007) SNPelemzés mai és középkori sárgadinnye (C. melo) rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókuszán. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred – 14dik Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, április 15-17. P109, 176-177
- Lehoczky P, Gyulai G, Tóth Z, Lágler R, Szabó Z, Bittsánszky A, Bock I, Heszky L (2007) Az rDNS ITS1-5.8S-ITS2 lókusz SNP-elemzése mai és középkori sárgadinnyében (Cucumis melo). XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.81. Budapest.
- 16. Stakhov V, Gyulai G, Szabó Z, Kovács L, Murenyetz L, Lagler 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, Illiois, USA, July 7-11. ID: 2131
- 17. Szabó Z, Gyulai G, Ga Başli, 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. 14<sup>th</sup> Int Symp Work Group for Palaeoethnobotany, 17-23 June, 2007, Kraków, Poland.
- 18. Szabó Z, Gyulai G, Kovács L, **Tóth Z**, Lagler R, Bittsanszky A, Kocsis L (2007) Ancient DNA analysis and morphology of grape seeds from antiquity and the middle agesexcavated in Hungary. Botany and Plant biology Joint Congress, Chicago, Illiois, 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 lókuszainak evolúciója a középkor óta. XIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, p.66. Budapest.
- Szabó Z, Gyulai G, Lágler R, Tóth Z, Kis A, Bittsánszky A, Heszky L (2007) A részégeti genetika születése Magyarországon – a (ctt)25 nSSR lókusz evolóciója 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.