

A köles (*Panicum miliaceum*) SSR-, ISSR- és mtDNS szekvencia-stabilitása a 4. és 15. századi régészeti leletektől a mai fajtáig

Lágler Richárd¹ – Gyulai Gábor¹ – Szabó Zoltán^{1,2,3} – Tóth Zoltán¹ – Heszky László¹

¹Szent István Egyetem

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

²Növénytani és Ökofiziológiai Intézet, Gödöllő

³Missouri State University, Department of Agriculture, Mountain Grove, USA
richard.lagler@mkk.szie.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A középkori (Budai Vár, 15. századi feltárás) és 4. századi (Mongólia) régészeti leletekből feltárt köles (*Panicum miliaceum*; $2n=4\times 36$) magmintákból *ősDNS*-t izoláltunk. A teljes genom felszaporításával (WGA – *whole genome amplification*) nagy mennyiségű *ősDNS*-t állítottunk elő. Az *ősDNS* szakaszok szelektív felszaporításával (AFLP – *amplified fragment length polymorphism*) meghatároztuk az *ősDNS* degradációjának mértékét, a 4. századi mintában azonosított 2 (1.2%) AFLP (*Mse*CAA–*Eco*AGT) fragmentum kimutatásával (98.8% degradáció), szemben a 15. századi 158 (40%) (60% degradáció), illetve a „Topáz” mai fajtában kimutatott 264 fragmentum azonosításával (100%). Az AFLP szelektív primer-párok közül az *Eco*AGT–*Mse*-CAA volt a leghatékonyabb. Nyolc AFLP fragmentum klónozásával és szekvenálásával 2529 nt *ősDNS*-t azonosítottunk. Az ismétlődő DNS szakaszok közötti DNS vizsgálata során (ISSR – *inter simple sequence repeats*) a kilenc primerből hét primer, valamint ezek kombinációival 22 ISSR szakaszon (lokuszon) összesen 341 ISSR allélt azonosítottunk a mai fajtákban és a középkori mintában. Az allélek szekvencia adatai teljes azonosságot mutattak a mai fajtákban és a középkori mintában. A felszaporított *ősDNS* minták restriktív endonukleázzal történő emésztése (CAPs – *cleaved amplified polymorphic sequence*) során hat enzimet alkalmaztunk (*Taq*I, *Bsu*RI, *Hinf*I, *Mbo*I, *Alu*I és *Rsa*I) a mitokondrium (mtDNS) 1117 bp hosszúságú 5S-18S rDNS szakaszának elemzésére. Az ALF-SSR allélek szekvencia elemzésében négy génhez kapcsolt ismétlődő DNS szakaszt elemeztünk az *sh1* (*shrunken1*); *gln4* (*glutamine synthetase4*); *rps15* (*ribosomal proteinS15*); *rps28* (*rps28 ribosomal protein S28*) génekben, összesen 810 nt szekvencia meghatározásával. Egyetlen nukleotid-változást (SNP – *single nucleotide polymorphism*) mutattunk ki a 15. századi mintában az *rps28* DNS szakaszban. A morfológiai fajtarekonstrukcióban a középkori minta egy ősi típusú, terpedt bugájú fajtához (Omszkoje) mutatta a legközelebbi rokonságot. Eredményeink igazolják, az egyszikű köles genom rendkívüli stabilitását, összevetve az azonos korból feltárt kétszikű sárgadimye genomban végbement nagymértékű mikroevolúciós változásokkal.

Kulcsszavak: SSR, ISSR, CAPS-mtDNS, szekvencia elemzés

SUMMARY

Seed remains of medieval millet, recovered from a 15th century layer (King's Palace, Budapest, Hungary), showed reddish yellow grain color after rehydrating on tissue culture medium that was

close to grain color of modern cultivar Omszkoje. aDNA of medieval c. millet was extracted successfully, analyzed and compared to modern common millets by ISSR, SSR, CAPS and mtDNA. Analyses of fragments and sequences revealed polymorphism at seven ISSR loci (22 alleles) and at the 5S-18S rDNA locus of mtDNA. CAPS analysis of the 5S-18S rDNA fragment revealed no SNPs in the restriction sites of six endonucleases *Taq*I, *Bsu*RI, *Hinf*I, *Mbo*I, *Alu*I and *Rsa*I. Sequence alignments of the restriction fragments *Rsa*I also revealed consensus sequence in the medieval sample compared to a modern variety. Morphological characterization of twenty common millet (*Panicum miliaceum* L., $2n=4\times 36$) cultivars and landraces revealed four distinct clusters which were apparently consistent with the grain colors of black, black and brown, red, yellow, and white. In the comparative AFLP, SSR and mtDNA analysis modern millet cv. 'Topáz' was used. AFLP analysis revealed that extensive DNA degradation had occurred in the 4th CENT. ancient millet resulting in only 2 (1.2%) AFLP fragments (98.8% degradation), compared to the 15th CENT. medieval millet with 158 (40%) fragments (60% degradation) and modern millet cv. 'Topáz' with 264 fragments (100%). Eight AFLP fragments were sequenced after reamplification and cloning. Microsatellite (SSR) analysis at the nuclear *gln4*, *sh1*, *rps28* and *rps15* loci of the medieval DNA revealed one SNP (*single nucleotide polymorphism*) at the 29th position (A to G) of *rps28* locus compared to modern millet. Mitochondrial (mtDNA) fragment (*Mbo*I) amplified at the 5S-18S-rDNA locus in the medieval millet showed no molecular changes compared to modern millet. The results underline the significance of survived aDNA extraction and analysis of excavated seeds for comparative analysis and molecular reconstruction of ancient and extinct plant genotypes. An attempted phenotype reconstruction indicated that medieval common millet showed the closest morphological similarity to modern millet cultivar Omszkoje.

Keywords: SSR, ISSR, CAPS-mtDNS, sequence alignment

BEVEZETÉS

A régészeti genetika segítségével a kihalt élőlények évszázadok és évmilliók óta konzerválódott szöveteiből és sejtjeiből kivont *ősDNS* rekonstruálható (Brown, 1999; Cooper és Poinar, 2000; Gugerli et al., 2005; Gyulai et al., 2006). A DNS-t az idő múlásával a különböző nukleázok elbontják, azonban szerencsés körülmények, mint pl. alacsony hőmérséklet, gyors

kiszáradás, magas sókoncentráció mellett a DNS kevésbé degradálódik (Poinar et al., 2003; Shen-Miller, 2002; Willerslev et al., 2003). Az utolsó jégkorszakból fennmaradt jégbe fagyott mammutborjú (10-40.000 éves) szöveteiből sikerült DNS-t izolálni. A teljes DNS állomány rekonstruálása terén az első sikerek 2001-ben születtek, amikor egy 400 éve kihalt futómadár (moa) teljes mitokondriális DNS állományának bázispárorsrendjét határozták meg (Cooper et al., 2001). A hosszú DNS szakaszokat is lemásoló PCR (long range PCR) módszerrel (Cheng et al., 1994) technikával elkészített mitokondriális térkép lehetőséget adott evolúciós fejlődési utak felvázolásához. Nagy jelentőségű eredmény volt, amikor igazolódott, hogy a kőületekbe zárt (fossziliákban) DNS is elemezhető (Yang, 1997), ahogy ez 1988-ban sikerült is egy 18 millió éves liliumfa (*Magnolia*) DNS maradványának kivonásával (in Pääbo et al., 2004). Munkánk során 4. századi és 15. századi köles maradványokból vontunk ki DNS-t, elemeztük és hasonlítottuk össze a mai fajták DNS mintáival egy végső fajtarekonstrukció céljából.

A köles (*Panicum miliaceum* L.) a *Panicum* nemzetség legjelentősebb faja a gyomköles (*Panicum rudérale* L.) a hajszálágú kölessel (*Panicum capillare* L.) együtt. Igen jól tűri a szárazságot és a meleget, ezért főleg a kontinentális éghajlatú területeken termesztik (Kelet- és Északnyugat-Afrikában, Kína, India és Pakisztán), kásanövényként, illetve abraktakarmányként.

Morfológia: A kalász morfológiája alapján a köles fajták három csoportba különülnek (Mansfeld, 2001; Bányai, 1971): (1) a terpedt bugájú kölesek (*Panicum miliaceum* L. convar. *effusum* (Alef.) Mansf.); (2) az oldalra hajló, zászlós bugájú kölesek (*Panicum miliaceum* L. convar. *contractum* (Alef.) Mansf.); valamint a (3) tömött bugájú kölesek (*Panicum miliaceum* L. convar. *contractum* (Alef.) Mansf.). A toklász színe további felosztást tesz lehetővé: a fehér, sárga, piros, barna és sűrűke toklászú fajtákkal. Tenyészideje rendkívül rövid (60-90 nap), egy évben kétszer aratható, a tavaszi vetés mellett a nyári másodvetése is beérik. A szélsőséges körülményeket (nagy meleg, sovány talaj, szárazság) is jól tűri. Jellemző a szemre, hogy a csírapajzs vápája rövidebb a szemtermés hosszának felénél (Schermann, 1966). Cséplése-tisztítása során a csíra gyakran kitorik. A köles napjainkra sokat veszített jelentőségéből. Európából kiszorult. Elsősorban Kelet- és Közép-Ázsia, India, Közép-Kelet vidékein termesztik.

Régészeti leletek: A köles tetraploid, önbeporzó faj (*P. miliaceum*, $2n=4\times=36$) az emberiség egyik legősibb növénye, már az i.e. 5000-3200 származó leletekkel (Ho, 1977). A legrégebbi (DK-Ázsiai) *Hoabinh* kultúrából (i.e. 10.000-6.000) nem kerültek elő (Gorman, 1969; Walters, 1989). Sumer és Észak-Indiai kultúrákban az árpa (*Hordeum vulgare*) mellett nagy mértékben termesztették (i.e. 2500).

A köles jelentős magleletei Kelet- és Közép-Európából származnak: Soroki (Ukrajna) (Tripolje-

kultúra) (Janushevich, 1978), Blahutovice (Csehország) (Tempir, 1979) és Eizenberg (Türingia) (i.e. 5. évezred) (Rothmaler és Natho, 1957), Gomolava (Jugoszlávia) (i.e. 4. évezred) (Zeist, 1975), É-Itália (i.e. 3. évezred) (Villaret-von Rochow, 1958). Közép-Ázsiában a köles a bronzkor óta, a 3. évezredtől mutatható ki leletekkel (Lisitsina és Prisepenko, 1977). Újabb az afganisztáni Shortunghai lelőhelyen (i.e. 3. évezred vége/2. évezred eleje) is megtalálták (Willcox, 1991). További kérdéses köles leletek kerültek elő: Tepe Yahya (Irán) (i.e. 5. évezred) (Costantini és Costantini-Biasini, 1985), Grúzia (eneolitikum: i.e. 5-4. évezred) (Lisitsina, 1984) és Észak-Kína területéről (neolitikum) Yang-Shao kultúra (i.e. 4. évezred) (Ho, 1977).

A sztyeppei népek (kelták, hunok, avarok, magyarok) illetve a Termékeny Félhold népeinek legfontosabb gabonája volt (i.e. 2000) az évenkénti kétszeri aratás lehetősége miatt (60 napos tenyészidejű fajták is ismertek) (Harlan, 1971). Az i.e. 1.000-500-ból maradt fenn a kínai Költészet Könyve (*The Book of Poetry; Shih Ching*), amely kilenc éneket ad a kölesről (Keng, 1974). A köles volt a rómaiak kedvelt „*milium*”-a. Észak-Amerikába a 17. század folyamán kerülhetett át, azóta számos új nemesítésű fajtával (Colosi és Schaal, 1997).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényi anyag: A Budai Várban folyt ásatások során (1999) 15. századi köles magvak (*Panicum miliaceum*) kerültek elő, az egykori Teleki-palota területén feltárt középkori kútból (Gyulai et al., 2006; Nyékhelyi, 2003). A magokat flotálásos módszerrel izsapoltuk ki, majd laboratóriumi körülmények között határoztuk meg a fajokat (Schermann, 1966). A 4. századi minta mongóliai (3. sír, Darhan, Mongolia, 1969) feltárásból származik (Gyulai et al., 2006). Felületi sterilizálás után a magokat három hónapig F6 steril táptalajon (Gyulai et al., 2003) inkubáltuk a különböző eredetű fertőzések elkerülésének kizárására. A nem fertőzött 4. századi és középkori (15. század) magokból, valamint a mai termesztett fajtákból (Agrobotanikai Intézet, Tápíószele) (*1. táblázat*) DNS-izolálást végeztünk.

Morfológiai vizsgálat: A 15. századi köles rekonstrukciója, valamint a fajtaköri besoroláshoz 20 mai köles tájfajtát kisparcellás kísérletben (5×5 m) vizsgáltunk két ismétlésben, majd a Tápíószelei Agrobotanikai Intézet és az OMMI felvételezési szempontjai alapján 28 vizsgált tulajdonság szerint (Lágler et al., 2005).

DNS-extrakció: A magvakból 0,1 g-nyi mennyiséget dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben porítottuk, majd SDS (10%) és CTAB (Murray és Thompson, 1980; Doyle és Doyle, 1990) tartalmú DNS extraháló pufferben (700 µl) tártuk fel (1 óra, 65 °C) a DNS-t. A fehérjék kicsapására 24:1 arányú kloroform/izoamilalkohol elegyet (750 µl) (a CTAB módszer esetén), illetve 250 µl Na-acetátot (pH 6.5) (az SDS-es módszernél) alkalmaztunk (30 perc, szobahő). **1. centrifugálás:** A mintákat 15 percen

keresztül 4 °C-ra előhűtött centrifugában 10.000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. A három fázis szétválása után, a növényi DNS-t tartalmazó felülúszót 1.5 ml-es steril eppendorf csövekbe pipettáztuk át. *A DNS kicsapása:* Az átpipettázott frakció 2/3-ának megfelelő mennyiségű izopropanol elegyítettünk a mintákhoz (2 óra, szobahő). A mintákat 4 °C-on 10.000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltuk, az izopropanol dekantálása után a DNS csapadékot 70%-os etanollal mostuk, majd ismételt centrifugálást követően az alkoholt leöntöttük (dekantáltuk), a DNS-t 1-2 órán keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk, és oldottuk TE (pH 8.0) pufferben (100µl). *RNS-mentesítés:* 5µl RN-áz A-val (Sigma, R-4875) végeztük (30 perc, szobahő). A DNS újra kicsapását 1/10 térfogat 8M-os ammónium-acetát, és 2 térfogat etanol keverékével (2 óra, -20 °C) végeztük, majd 10 percig 10.000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszó dekantálása, majd a DNS szárítása (1 óra, szobahő) és újraoldása (100µl TE, pH 8.0) után spektrofotometriás minőségi elemzést végeztünk (Hofreiter et al., 2001; Lágler et al., 2005).

1. táblázat

A fajtarekonstrukcióhoz és az összehasonlító elemzésekhez alkalmazott mai kölesfajták (*Panicum miliaceum*) adatai és származási helyük

#	Fajtanév(1)	Rövid név(2)	Származás(3)	Azonosító(4)
1	Tapiószele-D	TAPD	POL	RCAT073416
2	Tapiószele-C	TAPC	ITA	RCAT073585
3	Tápiói barna	TABA	HUN	RCAT017521
4	Debreceni barnamagvú	DEBR	HUN	RCAT017513
5	Tápiószentmártoni (lr.)	TASZ	HUN	00185/01
6	Tápiószele-B	TAPB	HUN	RCAT017280
7	Fertődi 10.D	FERT	HUN	RCAT017272
8	Püski (lr.)	PÜSK	HUN	RCAT017296
9	Rábaszentandrás (lr.)	RABA	HUN	RCAT017297
10	Bolgár-159.	BOLG	HUN	RCAT017267
11	Fertődi piros	FEPI	HUN	RCAT017291
12	Kecskeméti (lr.)	KEKE	HUN	RCAT017527
13	Omszkoje-9	OMSZ	RUS	02546/00
14	Jászberényi (lr.)	JASZ	HUN	RCAT017555
15	Császárretyi-2	CSAS	HUN	RCAT017277
16	Nyíregyházi (lr.)	NYÍR	HUN	RCAT017526
17	Tápiószele-A	TAPA	RUS	RCAT017509
18	Fertődi fehér	FEFE	HUN	RCAT017290
19	Martonvásári-3	MART	HUN	RCAT017285
20	Mesterházi-lr.	MEST	HUN	RCAT017494

Table 1: List of common millet (*Panicum miliaceum*) cultivars and landraces studied with short name and origin
Variety(1), Short name(2), Origin(3), Id. number(4)

A DNS tartalom meghatározása: A spektrofotométeres koncentrációk meghatározáshoz a NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométert alkalmaztunk (NanoDrop Technologies, Delaware,

USA – BioScience, Budapest) (Gyulai et al., 2006; Lágler et al., 2006; Lágler, 2007).

Teljes Genom felszaporítás (WGA – Whole Genome Amplification; GenomePlex WGA2, Sigma), teljes genom felszaporítás: Az archaeológiai mintákból történő izolálás során korlátozott mennyiségű és töredezett DNS nyerhető ki, ezért a középkori magvakból izolált DNS törzsekből WGA-reakciót: teljes genom felszaporítást végeztünk, amely módszerrel ng mennyiségű kiindulási DNS-ből µg nagyságrendű terméket szaporítottunk fel (2. ábra).

(a) *Fragmentálás:* A felszaporítani kívánt minták DNS-éből ddH₂O-val 1 ng/µl koncentrációjú oldatot készítettünk, a mintákhoz 1 µl 10× fragmentáló puffert és 9 µl DNS-t (1 ng/µl) adtunk, és pontosan 4 percig 95 °C-on denaturáltuk (PCR-készülékben, majd jég, és rövid centrifugálást követően).

(b) *Genomi könyvtár készítése:* A mintánkhoz 2 µl 1× Könyvtár Preparáló Puffert, majd 1 µl stabilizáló puffert adtunk. Enyhe keverés (vortex), majd rövid centrifugálás után 2 percig 95 °C-on denaturáltuk, rövid centrifugálás után ismét jégre helyeztük a mintákat. A következő lépésben 1 µl Könyvtár Preparáló Enzimet adtunk a mintákhoz, majd enyhe vortexelés után ismét jégfürdőt alkalmaztunk. Ezt követően egyetlen ciklusból álló PCR reakciót indítottuk a következő paraméterekkel: 16 °C/20 perc, 24 °C/20 perc, 37 °C/20 perc, 75 °C/5 perc, tárolás 4 °C.

(c) *PCR amplifikálás / 2:* Az előző lépésekben elkészített genomi könyvtárhoz mintánként 60 µl PCR mastermix-et adtunk, ami a következőket tartalmazta: 7.5 µl 10× Amplification Master Mix, 47.5 µl nukleáz mentes víz, 5.0 µl WGA *phi29* DNS polimeráz. Az így kapott 75 µl végtérfogatú oldatból újabb PCR reakciót indítottuk: 95 °C/3 perc (denaturálás), 14 ciklusban: 94 °C/15 mp, denaturálás, 65 °C/5 perc, majd 4 °C tartás, tárolás – 20°C. A felszaporítás hatékonyságát minden esetben agaróz gélen ellenőriztük (3. ábra).

ISSR-vizsgálat: Az ISSR vizsgálatához a Zietkiewitz et al. (1994) által leírt eljárást alkalmaztuk (3. ábra) kilenc primer és kombinációinak alkalmazásával: (1) FV808 – (ag)₈c; (2) FV810 – (ga)₈t; (3) FV811 – (ga)₈c; (4) FV821 – (gt)₈t; (5) FV835 – (ag)₈(t/c)c; (6) FV836 – (ag)₈(t/c)g és (7) FV841 – (ga)₈(t/c)c (Cekic et al., 2001).

ALF-SSR-fragmentum elemzés: A mikroszatellita allélok elektroforetikus elválasztását PAGE-alapú (poliakrilamid gél) ALF-ExpressII (Automatikus Lézer Fluorométer; Amersham – AP Magyarország, Budapest) gélkazettában végeztük négy lokuszon: *gln4*, *sh1*, *rps28*, és *rps15* (3. táblázat). Az elektroforézis során az allél méretét Cy-5 jelölt belső molekulatömeg standardokkal állapítottuk meg. Az alkalmazott primerek egyik szálát szintén Cy-5 fluoreszcens festékkel jelöltük (Röder et al., 1998; Szabó et al., 2005a, b; Gyulai et al., 2006).

AFLP analízis. Az AFLP (amplifikált fragmentum hossz polimorfizmus-amplified DNA fragment length polymorphism) vizsgálatokban a

módszer fluoreszcens változatát alkalmaztuk (fAFLP – fluorescent amplified DNA fragment length polymorphism) Vos et al. (1995) alapján, kisebb módosításokkal (Cresswell et al., 2001; Skot et al., 2002; Gyulai et al., 2005). A kettős emésztéshez *EcoRI-MseI* restrikciós endonukleázokat alkalmaztunk. A nem-szelektív amplifikációt 30 ciklusban végeztük a következő ciklusidőkkel: 94 °C/30 s, 56 °C/30 s, 72 °C/1 perc. A terméket 0,1× TE-vel 5-szörös amplifikáltuk a szelektív PCR reakciókban. A szelektív amplifikációhoz 24 primerkombinációt használtunk JOE fluoreszcens festékkel jelölt **Eco* primerekkel. Az első tizenkét primer kombinációban az *Mse*-CAC primert párosítottuk a jelölt **Eco* -aaa, -aac, -aag, -aat, -aca, -acc, -agg, -act, -aga, -agc, -agg, -agt primerekkel. A második tizenkettő kombinációban a jelölt **Eco*-AGT primert párosítottuk az *Mse* -caa, -cag, -cat, -cca, -ccc, -ccg, -cct, -cga, -cgc, -cgg, -cgt, -cta primerekkel. *Hot Start* PCR-rel kombinált *touchdown* PCR reakciót alkalmaztunk a minták felszaporítására (Don et al., 1991; Erlich et al., 1991). A reakcióelegy végtérfogata 10 µl amely tartalmazott 1× AmpliTaq Gold PCR Master Mix-et, mindkét primert 20 pmolban, valamint 50 ng preamplifikált DNS templátot. A *touchdown* PCR-t PE 9700 Thermocycler készülékben (Applied Biosystem) következők szerint végeztük: 12 cikluson keresztül a 30 s hosszú kapcsolódási hőmérsékletet (T_m) egyenletesen 66 °C- ról 56 °C-ra csökkentettük. További 25 ciklust 56 °C kapcsolódási hőmérséklettel végeztünk, majd az utolsó ciklus: 60 °C-on 45 s-ig tartott. A szelektív AFLP amplifikátumokat 5 percig 98 °C-on denaturáltuk és 30 percig 60 °C-on tartottuk vagy közvetlenül ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készülékkel fragment analízist végeztünk. Az eredményeket ABI PRISM Genotyper 3.7 NT szoftverrel dolgoztuk fel.

Klaszter-analízis: a 28 felvételezett morfológiai bélyeg alapján összehasonlítottuk a 20 mai köles (*Panicum miliaceum*) fajtát és tájfajtát (morfológiai dendrogram), valamint az ISSR primerek által felszaporított fragmentum mintázatot (molekuláris dendrogram). Az analízist és a kódolást a Jaccard-index (1908) alapján végeztük a csoportok közötti átlagos távolság szerinti összefüggésében, SPSS-14 szoftverrel.

Organellum-specifikus PCR: Az 5S-18S mitokondriális rDNS egy szakaszát a (Petit et al., 1998) szaporítottuk fel mind a középkori, mind a mai kölesben (*Panicum miliaceum*) (3. táblázat).

CAPS-analízis: Az agaróz gélből (0.8%) (GibcoBRL, 15510-027) kivágott mitokondriális DNS fragmentumot hat restrikciós endonukleázzal (*TaqI*, *BsuRI*, *HinfI*, *MboI*, *AluI* és *RsaI*) emésztettük (Fermentas) (2. táblázat).

A CAPS-analízist az emésztett fragmentumokon, 1,6%-os agaróz gélen történő szétválasztás után végeztük el, majd ChemImager rendszerben (Alpha Innotech Corp.) dokumentáltuk. A középkori mintából, valamint az Omszkoje-9 mai fajtából származó fragmenteket oszlopon tisztítottuk (Sigma, 5-6501), és megszekvenáltuk.

2. táblázat

A CAPS-mtDNS szekvencia elemzéséhez alkalmazott hat restrikciós endonukleáz (RE) enzimek adatai, valamint a kimutatott CAPS fragmentumok méretei (bp)

RE enzim(1)	Hasítási hely(2)	Kód #(3)	Fragmentumok Mérete (bp)(4)	# CAPS frag.(5)
<i>TaqI</i>	T↓CGA	ER0671	124, 124, 492, 116, 104, 32	6
<i>BsuRI</i>	GG↓CC	ER0151	282, 139, 15, 164, 100, 292	6
<i>HinfI</i>	G↓ANTC	ER0801	268, 224, 302, 76, 104, 18	6
<i>MboI</i>	↓GATC	ER0811	568, 92, 193, 91, 48	5
<i>AluI</i>	AG↓CT	ER0011	88, 757, 148	3
<i>RsaI</i>	GT↓AC	ER1121	204, 99, 16, 274, 13, 75, 311	7

Table 2: List of the restriction endonucleases (RE) applied to CAPS-mtDNA analysis

RE enzyme(1), Restriction site(2), Code(3), Fragment size(4), No. of fragments(5)

Szekvenciaelemzés: A szekvenálást ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem, Magyarország) automata DNS szekvenátorban végeztük, a kapott szekvenciákat a Chromas Pro 11 (Technelysium Pty Ltd, USA) programmal vizsgáltuk. A szekvenciák illesztését és analízisét a BioEdit (NCSU, USA), valamint a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programcsomagokkal végeztük (National Center for Biotechnology Information).

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS

Morfológiai vizsgálat: Az összehasonlító fajtarekonstrukcióhoz választott mai köles fajták átfogták a köles három fő bugatípusát (Mansfeld, 2001; Bányai, 1971; Colosi és Schaal, 1997; Scholz és Mikolas, 1991): a laza szétterülő, a zászlós oldalra hajló, valamint az álló tömött bugájú fajtákat (Radics, 2002). A magok színe fekete, barna, vöröses, okker, arany és krémszínűen át a fehérig változott. A felvételezett 28 morfológiai tulajdonság alapján végzett klaszter-analízis a fajtákat négy fő csoportba sorolta, elsősorban a magszín szerinti csoportosításban (1. ábra).

A sejtmagi nSSR és a mitokondriális mtDNS vizsgálatokban alkalmazott primer-párok adatai.
A mikroszatellita-kapcsolt gének *sh1* (*shrunken1*); *gln4* (*glutamine synthetase4*); *rps15*; *rps 28* (*rps28 ribosomal protein S28*)

Loci (NCBI #)(1)	Primer párok szekvenciái (5'-3') bp(2)	Referencia(3)
<i>gln4</i> (D14577) (<i>glutamine synthetase4</i>)	agc aga acg gca agg gct act ttt ggc aca cca cga cga	Chin <i>et al.</i> (1996)
<i>rps15</i> (AW424565) (<i>ribosomal protein S15</i>)	aag aag aaa gag aag aag cac ggg gga cag ctc gta tta taa cct gcg	Chin <i>et al.</i> (1996)
<i>rps28</i> (AF544115) (<i>ribosomal protein S28</i>)	aga cga acc cac cat cat ctt tc cgc ttg gca tet cca tgt ata tet	Chin <i>et al.</i> (1996)
<i>sh1</i> (AV062092) (<i>shrunken1</i>)	atc gaa atg cag gcg atg gtt ctc atc gag atg ttc tac gcc ctg aag t	Chin <i>et al.</i> (1996)
mtDNA (Z11512)	gtg ttg ctg aga cat gcg cc ata tgg cgc aag acg att cc	Petit <i>et al.</i> (1998)

Table 3: Loci and primer pairs of nuclear microsatellites and mtDNA applied in the molecular analysis. The SSR-linked genes: *sh1* (*shrunken1*); *gln4* (*glutamine synthetase4*); *rps15*; *rps 28* (*rps28 ribosomal protein S28*)
Loci(1), Primer sequences(2), References(3)

1. ábra: Molekuláris (a) és morfológiai (b) dendrogram elemzés a mai (1-20), valamint a 15. századi kölesben (*Panicum miliaceum*)

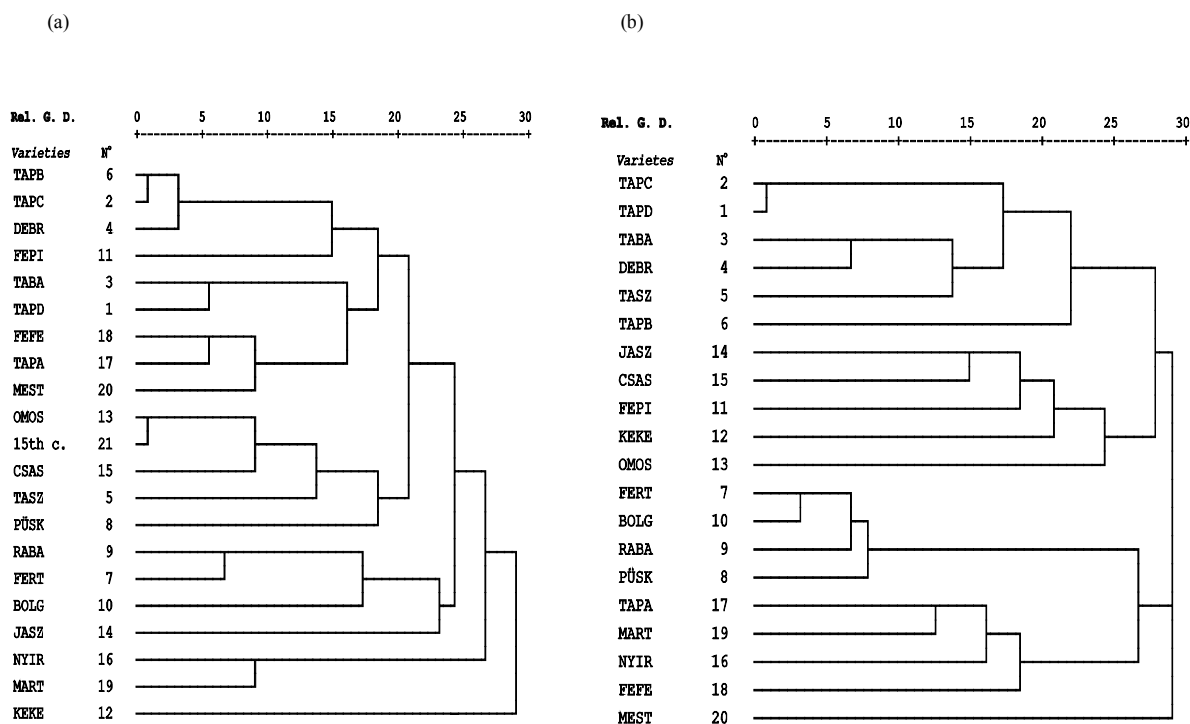


Figure 1: Molecular (a) and morphological (b) clusters of medieval (15th century) and current (1-20) common millet varieties (*Panicum miliaceum*)

Molekuláris vizsgálatok: A steril magokból izolált és WGA-amplifikált (2. ábra, 4. táblázat) DNS-mintákban (Michelmore *et al.*, 1991) a kilenc ISSR primerből hét primer, valamint ezek kombinációival 22 ISSR lokuszon összesen 341 ISSR allélt határoztunk meg a mai fajtákban és a középkori mintában. (4. 5. ábra, 5. táblázat). Az ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) módszerrel a genom közeli fordított irányú ismétlődő DNS szakaszai („*hajtűkanyarok*”, illetve „*masnik a DNS-en*”) közötti szekvenciák azonosíthatók, amelyek stabilitása szokatlanul nagymértékű, ezért genotípus azonosításra, genetikai térképezésre, illetve a DNS

szerkezeti elemzésére igen alkalmasak (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Gyulai *et al.*, 1999).

A teljes genom amplifikáció (WGA) hasonlóan az izotermikus MDA-WGA módszerhez (*multiple displacement amplification*) a legújabb nagy hatékonyságú módszere a sérült, fragmentált DNS minták szekvenciájú amplifikációjára (Mitchell *et al.*, 2005). Az általunk amplifikált mintákban közel 100-szoros mennyiségű össz-DNS felszaporítást értünk el a WGA-kezelés során (4. táblázat). A WGA szekvenciájú amplifikációját ISSR szekvencia elemzéssel igazoltuk (4. ábra), melyben egy 476 bp hosszúsági ISSR szekvenciában egyetlen

nukleotidban sem született hibás amplifikáció. Az ISSR fragmentum mintázat alapján készített rokonsági dendrogrammon a középkori köles minta az „Omszkoje” mai fajtával mutatta a legközelebbi genetikai rokonságot (1. ábra), amely egy ősbibb típusba sorolható terpedt bugájú fajta. A mitokondrium specifikus primerpár által felszaporított 1117 bp hosszúságú konszenzus szekvenciát azonosítottunk az 5S-18S rDNS lokuszon a 15. századi mintában. A CAPS-elemzésben a fragmentumok a *TaqI*, *BsuRI*, *HinfI*, *MboI*, *AluI* és *RsaI* restriktív enzimekkel történt emésztése után megegyező mintázatot mutattak (5. ábra), amely eredmény azt jelzi, hogy az eltelt 600 év során a genetikailag stabil mtDNS-ben – a nem is várható nem-szinoním szubsztitúciók mellett szinonim nukleotid szubsztitúciók sem mentek végbe az alkalmazott restriktív hasítóhelyek szekvenciáiban (Lágler et al., 2005). Módszertanilag a CAPs (CAPs – restriktív szekvencia-polimorfizmus) közel áll az RFLP-hez (Botstein et al., 1980), azzal a különbséggel, hogy a RE emésztést PCR-amplifikált fragmentumon (Mullis és Faloona, 1987) alkalmazzuk. A CAPs markerek előnye, hogy kodominánsak és ezzel a homozigóta és heterozigóta egyedek elkülöníthetők (Konieczny és Ausubel, 1993). A CAPs mutációk rendkívüli mértékű gyakoriságát jelzi, hogy két *Arabidopsis* ökotípus térképező populációjában megközelítően

5.000-13.000 *AluI* hasítóhely polimorfizmus fordulhat elő (az *Arthrobacter luteus* baktérium fajból izolált restriktív endonukleáz enzim hasító szekvenciája után: 5' AG/CT 3') (Lister és Dean, 1993).

2. ábra: Az egységnyi (9 ng) DNS mintákból történő teljes genom felszaporítás (WGA) hatékonysága a középkori köles (*Panicum miliaceum*) (15. század) (5, 6); és a mai fajta (2, 3), valamint a kontrol humán DNS (1) és a DNS-mentes ellenőrző (4) mintában

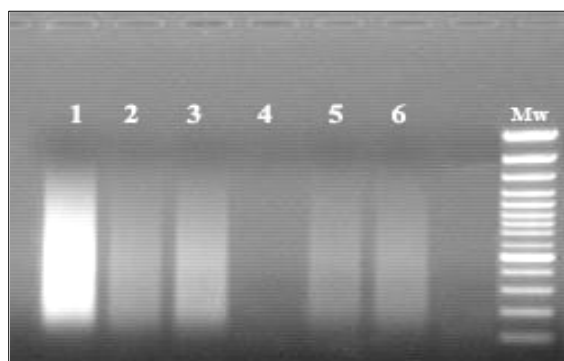


Figure 2: WGA amplification of 9 ng DNA samples of the medieval (15. century) (5, 6) and current common millet (*Panicum miliaceum*) cultivar (2, 3) compared to controls of Human DNA (1) and DNA-free (4) samples

3. ábra: ISSR-PCR elemzés (0,8% agaróz) a mai (1-20), valamint a középkori (15. század) köles (*Panicum miliaceum*) DNS mintáiban az ISSR-811 – (GA)₈C – genom helyen a polimorf allélek jelölésével (nyilak) (Mw – 100 bp tömeg marker)

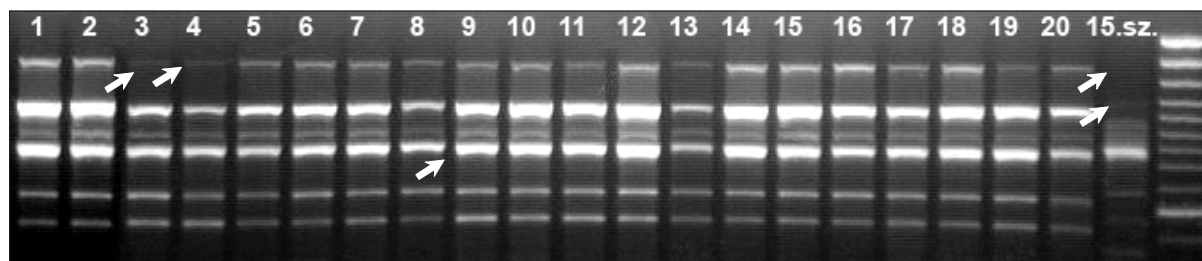


Figure 3: Samples of ISSR-PCR analysis (agarose, 8%) at the (GA)₈C ISSR-811 locus of the current varieties (1-20) of common millet (*Panicum miliaceum*) and medieval (15th cent.) sample

4. táblázat

A teljes genom felszaporítás (WGA) hatékonysága az eredeti DNS izolátum (a) és WGA amplifikált (b) DNS mintákban (köles – *Panicum miliaceum*): mennyiségi (ng/ul) és UV-spektrofotometriás minőségi értékeiben (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}), valamint (c) a WGA-felszaporítás hatékonysága

(a)				(b)				(c)
DNS	ng/ul	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNS	ng/ul	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	
- humán	9,14	2,11	1,09	- humán	932,87	1,77	1,64	× 102,1
- mai-1	9,91	2,15	1,77	- mai-1	954,82	1,77	1,67	× 96,4
- mai-2	10,02	2,46	1,97	- mai-2	951,36	1,78	1,7	× 95,0
- 15. sz.-1	9,78	1,38	1,33	- 15. sz.-1	998,88	1,78	1,69	× 102,1
- 15. sz.-2	8,76	1,7	1,72	- 15. sz.-2	988,69	1,78	1,7	× 112,9

Table 4: Sequence fidelity of WGA amplification in the DNA samples of common millet (*Panicum miliaceum*) prior to (a) and after WGA amplification with data of quantity (ng/ul DNS×0.1g⁻¹ fresh wt) and purity indexes (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230})

A genom 22 helyén (lokuszán) azonosított 341 ISSR-allél eloszlása a középkori (15. sz) köles (*Panicum miliaceum*) mintában és a mai fajtákban

	FV 808						FV 821					FV 835				FV 841						
	430	480	510	570	800	900	650	690	750	900	940	240	290	350	460	260	290	320	350	420	680	750
FEPI	•	•	•	•		•	•				•	•	•	•					•		•	
KEKE	•		•	•		•	•		•	•	•	•			•				•			
FEFE	•	•	•	•		•	•	•		•	•	•	•	•			•					
MEST	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•
JASZ	•	•	•	•		•		•			•			•						•		•
NYIR	•	•	•			•			•	•	•				•	•		•			•	•
TABA	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•			•	•		•	•		•	•
DEBR	•	•	•	•		•	•	•			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
PÜSK	•		•		•	•	•			•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	•
RABA	•	•	•	•		•	•	•			•			•	•	•	•		•	•	•	•
TASZ	•	•	•	•		•	•	•			•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•
TAPA	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•
FERT	•	•	•	•		•	•	•		•	•	•	•		•	•		•		•	•	•
BOLG	•			•	•	•				•				•		•	•		•		•	•
CSAS	•	•	•			•		•	•		•	•	•	•		•	•		•	•	•	•
OMOS	•	•	•	•		•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•		•	•
TAPB	•	•	•	•	•	•	•	•			•	•	•	•	•	•		•	•		•	•
TAPC	•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•		•	•		•	•
TAPD	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•
MART	•	•	•			•	•			•		•	•		•	•	•		•		•	•
15.sz.	•		•	•		•	•	•		•		•	•	•	•	•	•					

Table 5: Diversity of 341 alleles at 22 ISSR loci of common millet (*Panicum miliaceum*) in the medieval sample and current cultivars

4. ábra: Azonos (konszenzus) ISSR szekvenciák összehasonlító elemzése, valamint a WGA-felszaporítás szekvenciahűsége (proofreading) a középkori (15. század) és mai köles (*Panicum miliaceum*) fajtákban (476 bp hosszú; 810-841 primerkombináció)

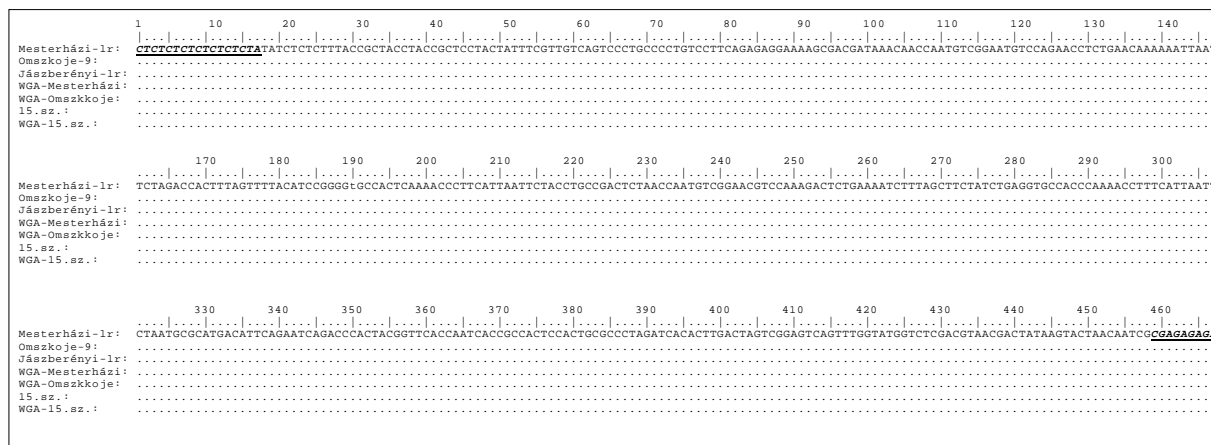


Figure 4: Consensus sequences alignments of medieval millet (15th cent.) compared to modern millet cultivars at nuclear ISSR loci at primer combination of 810-841

IRODALOM

- Bányai L (1971): Kőlesfajták agrobotanikai vizsgálata. *Agrobotanika* 11, Tápíószele, 39-60.
- Botstein, D.-Hite, R. L.-Skonic, M.-David, R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Brown, T. A. (1999): How ancient DNA may help in understanding the origin and spread of agriculture. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 354:89-98.
- Cekic, C.-Battey, N. H.-Wilkinson, M. J. (2001): The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor Appl Genet* 103:540-546.
- Cheng, S.-Fockler, C.-Barnes, W.-Higuchi, R. (1994): Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:5695-5699.
- Chin, E. C. L.-Senior, M. L.-Shu, H.-Smith, J. S. C. (1996): Maize simple repetitive DNA sequences: Abundance and allele variation. *Genome* 39, 866-873.
- Colosi, J. C.-Schaal, B. A. (1997): Wild proso millet (*Panicum miliaceum*) is genetically variable and distinct from crop varieties of proso millet. *Weed Science* 45:509-518.
- Cooper, A.-Lalueza-Fox, C.-Anderson, S.-Rambaut, A.-Austin, J.-Ward, R. (2001): Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409:704-707.
- Cooper, A.-Poinar, H. N. (2000): Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science* 289:1139.
- Costantini, L.-Costantini-Biasini, L. (1985): Agriculture in Baluchistan between the 7th and the 3rd millennium BC. *Newsletter of Baluchistan Studies (Istituto Universitario Orientale, Naples)* 2: 16-30.
- Cresswell, A.-Sackville-Hamilton, N. R.-Roy, A. K.-Viegas, B. M. F. (2001): Use of AFLP markers to assess genetic diversity of *Lolium* species from Portugal. *Mol. Ecol.* 10:229-241.
- Don, R. H.-Cox, P. T.-Wainwright, B. J.-Baker, K.-Mattick, J. S. (1991): Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19:4008.
- Doyle, J. J.-Doyle, J. L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Erllich, H. A.-Gelfand, D.-Sninsky, J. J. (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651.
- Gorman, C. F. (1969): Hoabinhian: A pebble-tool complex with early plant associations in Southeast Asia. *Science* 163:671-673.
- Gugerli, F.-Parducci, L.-Petit, R. J. (2005): Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytologist* 166, 409-418.
- Gyulai, G.-Purnhauser, L.-Heszky, L. (1999): PCR marker selection in leaf rust resistant wheat NILs (Thatcher) by RAPD, SSR and ISSR-PCR. *Plenary lecture, Abstract Book of ECB9 Congress, Brussels*, 1-6.
- Gyulai, G.-Humphreys, M.-Bittsánszky, A.-Sköt, K.-Kiss, J.-Sköt, L.-Gullner, G.-Heywood, S.-Szabó, Z.-Lovatt, A.-Radimsky, L.-Roderick, H.-Abberton, M.-Rennenberg, H.-Kómíves, T.-Heszky, L. (2005): AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic *gshI*-poplar clones (*Populus canescens* L.) *in vitro*. *Z. Naturforschung* 60c:300-306.
- Gyulai, G.-Humphreys, M.-Lágler, R.-Szabo, Z.-Toth, Z.-Bittsánszky, A.-Gyulai, F.-Heszky, L. (2006): Seed remains of common millet from the 4th (Mongolia) and 15th (Hungary) centuries; AFLP, SSR, and mtDNA sequence recoveries. *Seed Science Research* 16:179-191.
- Gyulai, G.-Mester, Z.-Kiss, J.-Szemán, L.-Heszky, L.-Idnurm, A. (2003): Somaclone breeding of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.). *Grass and Forage Science* 58, 210-215.
- Harlan, J. R. (1971): Agricultural origins: centers and noncenters. *Science* 174, 468-473.
- Ho, P.-t (1977): The indigenous origins of Chinese agriculture. In: *Origins of Agriculture* (Ed) Reed CA, pp. 413-418. Mouton, Publ., Paris.
- 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.
- Jaccard, P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44: 223-270.
- Janushevich, Z. V. (1978): Prehistoric food plants in the south-west of the Soviet Union. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 91: 59-66.
- Keng, H. (1974): Economic plants of ancient north China as mentioned in *Shih Ching* (Book of Poetry). *Economic Botany* 28:391-410.
- Konieczny, A.-Ausubel, F. M. (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCRbased markers. *Plant J.* 4:403-410.
- Lágler, R. (2007): Archaeogenetics of common millet (*Panicum miliaceum*): ISSR and SSR sequence heterogeneity from a medieval sample to current varieties. PhD Thesis, Gödöllő, Hungary
- Lágler, R.-Gyulai, G.-Humphreys, M.-Szabó, Z.-Horváth, L.-Bittsánszky, A.-Kiss, J.-Holly, L.-Heszky, L. (2005): Morphological and molecular analysis of common millet (*P. miliaceum*) cultivars compared to an aDNA sample from the 15th century (Hungary). *Euphytica* 146:77-85.
- Lágler, R.-Gyulai, G.-Szabó, Z.-Tóth, Z.-Bittsánszky, A.-Horváth, L.-Kiss, J.-Gyulai, F.-Heszky, L. (2006): Molecular diversity of common millet (*P. miliaceum*) compared to archaeological samples excavated from the 4th and 15th centuries. *Hung Agric Res* 2006/1:14-19.
- Lisitsina, G. N. (1984): The Caucasus – A centre of ancient farming in Eurasia. In: Zeist, W. van-Casparie, W. A. (eds.), *Plants and ancient man*. Rotterdam, 285-292.
- Lisitsina, G. N.-Prisepenko, L. V. (1977): Paleobotaniceszkie nahodki Kavkaza i Blizsnevo Vosztoka. *Moszkva*.
- Lister, C.-Dean, C. (1993): Recombinant inbred lines for mapping RFLP and phenotypic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4:745-750.
- Mansfeld, R. (2001): *Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural crops* (Ed. P Hanelt), Vol I-VI., Springer.

- Michelmore, R. W.-Paran, I.-Kesseli, R. V. (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked-segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 9828-9832.
- Mitchell, D.-Willerslev, E.-Hansen, A. (2005): Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research* 571:265-276.
- Mullis, K. B.-Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Murray, M. G.-Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325.
- Nyékelyi, B. D. (2003): *Monumenta Historica Budapestinensia XII.* Historical Museum of Budapest, Hungary. 1-102.
- Pääbo, S.-Poinar, H.-Serre, D. V.-Jaenicke-Despres, V.-Hebler, J.-Rohland, N.-Kuch, M.-Krause, J.-Vigilant, L.-Hofreiter, M. (2004): Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* 38: 645-679.
- Petit, R. J.-Demesure, B.-Dumolin, S. (1998): cpDNA and mtDNA primers in plants. In: Karp, A.-Isaac, P. G.-Ingram, D. S. (Eds) *Molecular tools for screening biodiversity.* 256-261. Chapman and Hall, London.
- Poinar, H. N.-Kuch, M.-McDonald, G.-Martin, P.-Pääbo, S. (2003): Nuclear gene sequences from a late Pleistocene sloth coprolite. *Current Biology* 12: 1150-1152.
- Radics L. (2002): *Alternatív növények termesztése II.* Szaktudás Kiadó Ház. Budapest
- Rothmaler, W.-Natho, I. (1957): *Bandkeramische Kulturpflanzenreste aus Thüringen und Sachsen.* Beitr. Frühgesch. d. Landwirtsch. 3: 73-98.
- Röder, M. S.-Korzun, V.-Wendehake, K.-Plaschke, J.-Tixier, M. H.-Leroy, P.-Ganal, M. W. (1998): A microsatellite map of wheat. *genetics* 149: 2007-2023.
- Saltonstall, K. (2003): Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular Ecology* 12: 1689-1702.
- Schermann Sz. (1966): *Magismeret I, II.* Akadémiai Kiadó, Budapest
- Scholz, H.-Mikolas, V. (1991): The weedy representatives of proso millet (*Panicum miliaceum*, *Poaceae*) in Central Europe. *Thaiszia* 1: 31-41.
- Shen-Miller, J. (2002): Sacred lotus, the long-living fruits of China Antique. *Seed Science Research* 12: 131-143.
- Skot, L.-Hamilton, N. R. S.-Mizen, S.-Chorlton, K. H.-Thomas, I. D. (2002): Molecular genecology of temperature response in *Lolium perenne*: 2. association of AFLP markers with ecogeography. *Mol. Ecol.* 11: 1865-1876.
- Szabó, Z. (2006): *Archaeogenetics of melon (Cucumis melo): ITS and SSR sequence heterogeneity from a medieval sample to current varieties.* PhD Thesis, Gödöllő, Hungary.
- Szabó, Z.-Gyulai, G.-Humphreys, M.-Horváth, L.-Bittsánszky, A.-Lágler, R.-Heszky, L. (2005a): Genetic variation of melon (*C. melo*) compared to an extinct landrace from the Middle Ages (Hungary) I. rDNA, SSR and SNP analysis of 47 cultivars. *Euphytica* 146:87-94.
- Szabó, Z.-Gyulai, G.-Horváth, L.-Bittsánszky, A.-Szani, Sz.-Lágler, R.-Kiss, J.-Gyulai, F.-Holly, L.-Heszky, L. (2005b): Genetic diversity of Hungarian melon landraces (*C. melo*) compared to an extinct sample from the Middle Ages. *Hung Agric Res* 2005/2:18-22.
- Tempír, Z. (1979): *Kulturpflanzen im Neolithikum und Äneolithikum auf dem Gebiet von Böhmen und Mähren.* *Archaeo-Physika* 8: 302-308.
- Tóth, G.-Gáspári, Z.-Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Villaret-von Rochow, E. (1958): *Die Pflanzenreste der bronzezeitlichen Pfahlbauten von Valeggio am Mincio.* Bericht über das Geobot. Forschungsinst. Rübel in Zürich für das Jahr 1957: 96-144.
- Vos, P.-Hogers, R.-Bleeker, M.-Reijans, M. L. T.-van der Hornes, M.-Frijters, A.-Pot, J.-Peleman, J.-Kuiper, M.-Zabeau, M. (1995): A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Walters, T. W. (1989): Historical overview on domesticated plants in China with special emphasis on the *Cucurbitaceae*. *Economic Botany* 43: 297-313.
- Willcox, G. (1991): Carbonised plant remains from Shortughai, Afghanistan. In: Renfrew J (ed.), *New light on early farming. Recent Developments in Palaeobotany.* Edinburgh, 395. 277-279.
- Willerslev, E.-Hansen, A. J.-Binladen, J.-Brand, T. B.-Thomas, M.-Gilbert, P.-Shapiro, B.-Bunce, M.-Wuuf, C.-Gilichinsky, D. A.-Cooper, A. (2003): Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300: 791-795.
- 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.
- Zeist, W. van (1975): Preliminary report on the botany of Gomolava. *J. Archaeol. Sci.* 2: 315-325.
- Zietkiewicz, E.-Rafalski, A.-Labuda, A. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* 20: 176-183.