

## El ADN antiguo como herramienta interdisciplinar

Rosa Fregel  
Laboratorio de Genética Forense. Instituto de Medicina Legal de Las Palmas  
Trasera del Paseo Blas Cabrera Felipe, S/N. 35016 Las Palmas, Canarias. España.  
E-mail: [rfregel@gmail.com](mailto:rfregel@gmail.com)

Recibido 6-febrero-2012; revisado 13-febrero-2012; aceptado 17-febrero-2012

### Resumen

#### El ADN antiguo como herramienta interdisciplinar

**Introducción:** El análisis de ADN en muestras antiguas puede abrir muchas vías de estudio en la arqueología y otras disciplinas, y sus resultados suelen tener un gran impacto científico. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el uso de estas técnicas implica necesariamente la implementación de protocolos de trabajo que aseguren la autenticidad de los resultados.

**Objetivos:** Determinar unos criterios básicos para la excavación y manipulación de las muestras arqueológicas que vayan a formar parte de proyectos de análisis de ADN antiguo.

**Desarrollo:** Revisar los conceptos básicos sobre la estructura del ADN, la técnica de la PCR, los principales avances del campo del ADN antiguo y sus limitaciones más importantes.

**Conclusiones:** Sin unos criterios de autenticidad en los trabajos arqueológicos y antropológicos previos, las conclusiones obtenidas en los análisis de ADN antiguo pierden credibilidad ante la comunidad científica. Principalmente, se debe evitar la manipulación directa de los restos durante la excavación y posterior análisis, y establecer unas condiciones correctas de conservación, que eviten problemas de degradación y contaminación del ADN.

**Palabras clave:** ADN antiguo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), degradación, contaminación, criterios de autenticidad.

### Summary

#### The ancient DNA as interdisciplinary tool

**Introduction:** The analysis of DNA from ancient remains could be useful for archeological purposes, and their results use to be of great importance on the field. However, the application of these techniques implies the implementation of several criteria that ensure the result authenticity.

**Aim:** The aim of this review is to determine some basic criteria for the excavation process and posterior manipulation for samples susceptible to be use on ancient DNA projects.

**Content:** This publication reviews the basic concepts on DNA structure, the PCR technique, the principal advances of ancient DNA field and their most important limitations.

**Conclusions:** The obtaining of authenticated results on ancient DNA studies depends on the application of certain criteria on the previous archaeological and bioanthropological work. Without these criteria, conclusions obtained from the ancient DNA results lose credibility in the scientific community. Mainly, it is important to avoid direct manipulation of the samples during excavation and subsequent analysis, and the establishment of proper storage conditions to avoid DNA degradation.

**Keywords:** ancient DNA, polymerase chain reaction (PCR), degradation, contamination, authenticity criteria

### Introduction

En el año 1986 el investigador Kary Mullis publicó un artículo en el que presentaba una técnica novedosa para la amplificación *in vitro* del ADN [35]. Esta técnica, denominada Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction), revolucionaría para siempre el campo de la Biología y la Genética Molecular. De hecho, una gran mayoría de las metodologías usadas en la actualidad para el diagnóstico de enfermedades, pruebas de paternidad o la identificación de víctimas en desastres naturales, se basan en la técnica de la PCR. Pero sin duda, un campo en el que el desarrollo de la PCR ha sido crucial, es en el de la obtención y análisis de ADN a partir de restos arqueológicos. Actualmente, el estudio de diversas regiones del genoma de primates ha permitido determinar la relación entre el hombre moderno y éstos, arrojando luz sobre la evolución humana. Gracias a los análisis de ADN se ha podido determinar que los humanos, los chimpancés y los gorilas comparten un origen común, más reciente del que comparten, por ejemplo, con el orangután. Además, el estudio de la variabilidad genética y la distribución de los diferentes linajes humanos han permitido encontrar similitudes entre distintas

poblaciones, y así poder inferir las rutas de migración del hombre moderno desde África hasta el resto del mundo [33]. Finalmente, gracias a los análisis genéticos se ha establecido que el origen del hombre moderno ocurrió en África hace unos 200.000 años y que desde allí migraron hacia el resto del mundo.

Sin embargo, el problema de este enfoque es que los procesos que afectan a la estructura poblacional (como la migración, la mutación, la selección o la deriva génica) son muy complejos y, en la mayoría de los casos, actúan conjuntamente, complicando la interpretación de los resultados. Además, al analizar sólo especies de primates actuales en la evolución del Homo sapiens, perdemos la oportunidad de considerar otras especies de homínidos extintos, como el Hombre de Neandertal. Por todas estas razones, se planteó prácticamente desde el desarrollo de la técnica, la necesidad de obtener ADN a partir de restos humanos antiguos mediante PCR.

### Contenido

#### La molécula de ADN

La molécula de ADN (o ácido desoxirribonucleico) está formada por dos cadenas que se enrollan en espiral. Cada cadena está formada por la unión de cuatro subunidades diferentes o nucleótidos: la adenina (A), la guanina (G), la citosina (C) y la timina (T). Estas subunidades se unen para formar una cadena, y dos cadenas se enrollan en espiral para formar una molécula de ADN. En la unión de las dos cadenas de ADN la citosina y la guanina, y la adenina y la timina, siempre quedan enfrentados (Figura 1).

En la molécula de ADN la información genética está codificada en la composición y en el orden de los diferentes nucleótidos, o lo que es lo mismo, esta codificada en la secuencia de la cadena de

ADN. Así, el color de la piel o la predisposición a ciertas enfermedades está codificado en la secuencia de ADN de nuestros genes.

#### El material genético se conserva en restos antiguos

Desde los años 70, diversos trabajos detectaron la presencia de material genético en restos fósiles antiguos [10,48,50,42,47]. Por ejemplo, Poinar y Hess [6] determinaron la existencia de ADN antiguo en insectos conservados en ámbar de 40 millones de años, mientras que Wang y Lu [47] confirmaron la presencia de ácidos nucleicos en restos humanos antiguos. Además, el investigador Svante Pääbo estudió las características de estas moléculas y determinó que el ADN presente en los restos fósiles está en muy baja cantidad y en un estado altamente fragmentado [40]. El hecho de que el ADN esté tan degradado en los restos antiguos hace que no sea posible su estudio directo y que sea necesario un paso previo de amplificación.

En aquel momento era imposible analizar el ADN antiguo, pero afortunadamente, Kary Mullis publicó su método de amplificación de ADN en el año 1986 [35]. A partir de este momento se inició la era del ADN antiguo.

#### La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A diferencia de las metodologías pioneras que trataban de hacer una síntesis química del ADN, en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, la amplificación del ADN está basada en la forma en que las células copian su material genético antes de la división celular. En una célula se necesitan principalmente cuatro cosas para poder copiar el ADN antes de la división celular. Primero, es necesario disponer de la materia prima, es decir, los nucleótidos que formarán las nuevas moléculas de ADN. También, se debe disponer de la maquinaria celular capaz de sintetizar el ADN, o lo que es lo mismo, una enzima denominada ADN polimerasa, cuya función es unir los nucleótidos para formar cadenas de ADN. Además, es indispensable el

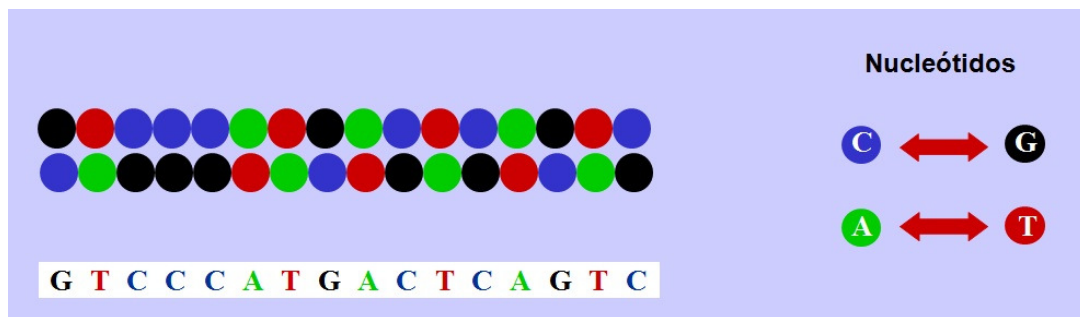


Figura 1 – Estructura del ADN.

ADN molde que va a copiarse y que debe estar en estado monocatenario. Finalmente, la ADN polimerasa necesita un extremo al que unirse para empezar a copiar la cadena monocatenaria. Para reproducir *in vitro* lo que ocurre dentro de la célula, la mezcla de PCR incluye el ADN molde, los cuatro nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina), la ADN polimerasa y unos fragmentos pequeños de ADN que llamamos primers o cebadores, y que aportan el extremo a partir del cual la polimerasa puede empezar a añadir nucleótidos.

Una vez preparada la reacción de PCR, el proceso empieza aumentando la temperatura (Figura 2), de esta forma se rompen los enlaces y las dos cadenas del ADN molde (que es bicatenario en estado natural) se separan, quedando en estado monocatenario. Posteriormente, para permitir que los primers se unan al ADN monocatenario, la temperatura debe bajar a 45-60°C aproximadamente. Esta temperatura es suficientemente alta para mantener el ADN molde en estado monocatenario y lo suficientemente baja para que los primers permanezcan unidos. Estos primers deben ser “complementarios” a la zona en la que se unen, es decir, donde hay una guanina, ellos tienen una citosina, y donde hay adenina, ellos

tienen timina, y viceversa. Por esta razón, somos capaces de elegir qué zona queremos amplificar: en función de la secuencia de primers que diseñemos, se amplificará una zona u otra.

Una vez que los primers se han unido al ADN, ya tenemos el extremo para que la ADN polimerasa empiece a copiar, añadiendo nucleótidos. Para que la polimerasa inicie la actividad es necesario volver a subir la temperatura a 72°C, que es la condición óptima para su funcionamiento. Una vez que la temperatura está a 72°C, la ADN polimerasa empieza a incorporar nucleótidos, hasta terminar de copiar la cadena. Estas tres fases térmicas conforman un ciclo de PCR: desnaturalización, anillamiento y extensión o elongación (Figura 3), y el resultado es que, a partir de cada molécula de ADN molde, obtenemos dos. Si volvemos a repetir otro ciclo de PCR con las dos moléculas, obtenemos 4, y si hacemos un tercer ciclo, entonces tenemos 8, y así sucesivamente, de forma exponencial. Al final, si nosotros partimos de una única molécula y hacemos 25 ciclos de PCR, obtendremos un billón de moléculas. Y ésta es la razón por la que la PCR tiene una gran capacidad amplificadora y por lo que ha revolucionado el campo de la biología molecular.

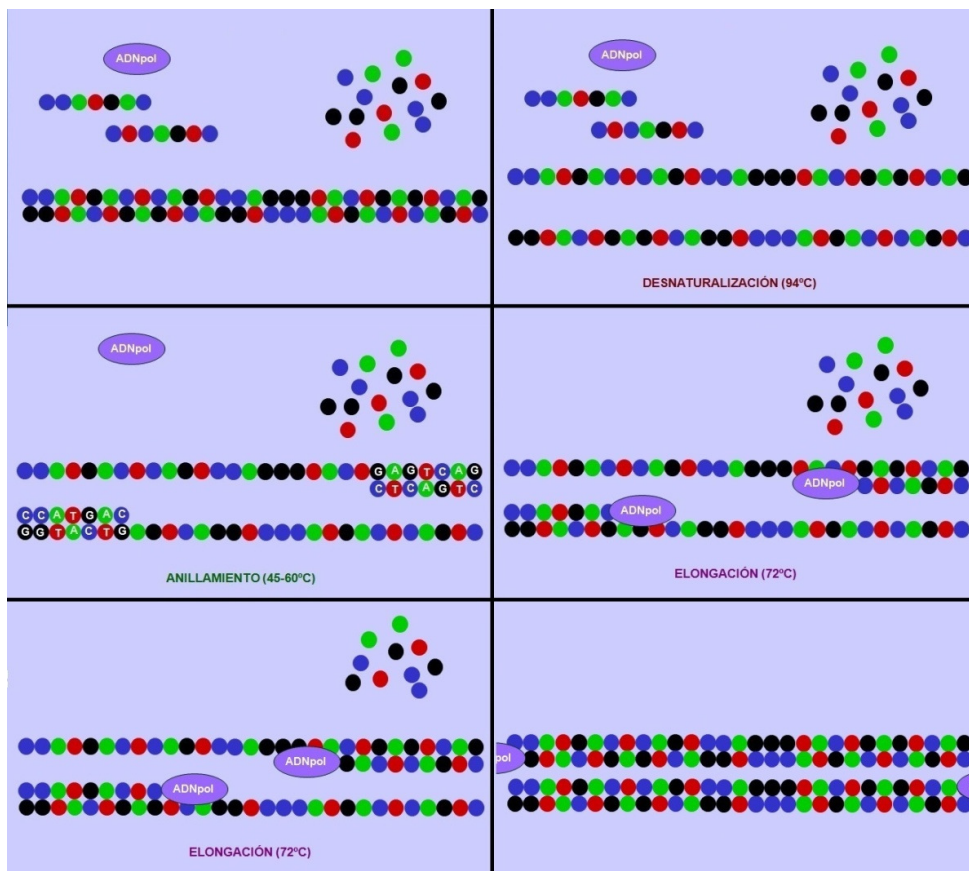


Figura 2 – Representación gráfica de la técnica de la PCR

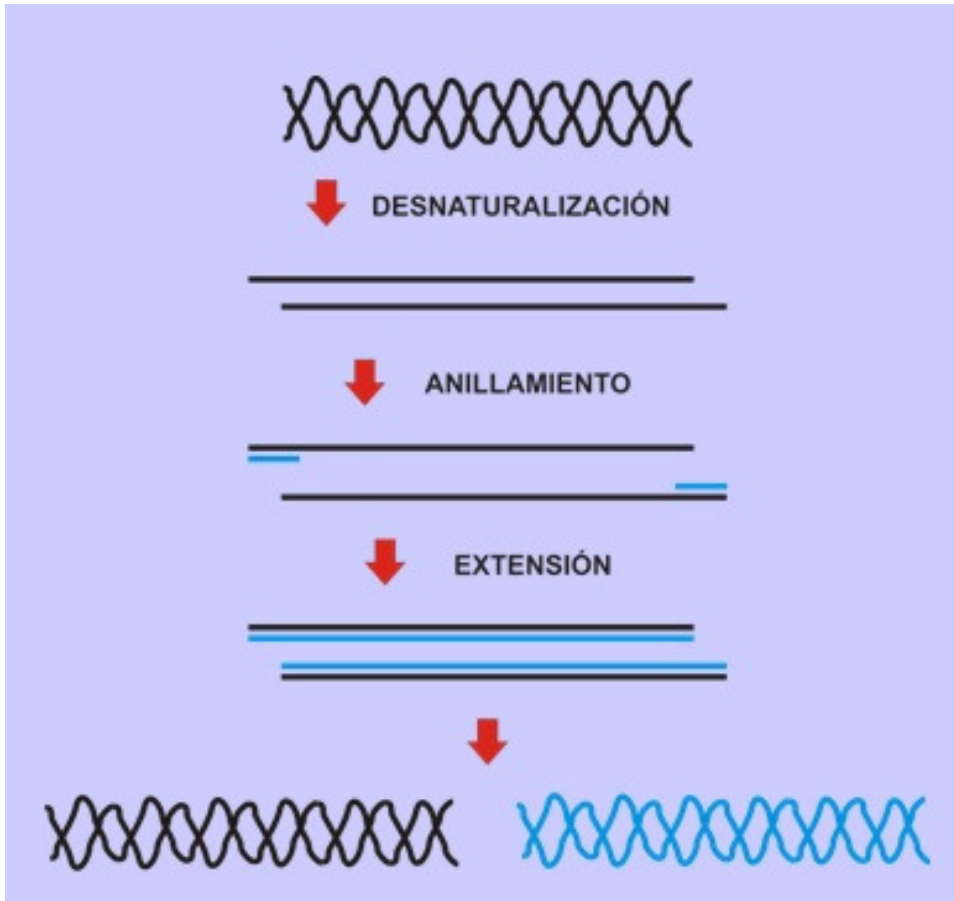


Figura 3 – Ciclos de la PCR

Sin embargo, esto sólo son cálculos matemáticos. En realidad la PCR suele saturarse y no siempre llega hasta el final de los ciclos manteniendo el crecimiento exponencial, pero aún así, el resultado final siempre es una amplificación de millones de copias de ADN.

### Historia del ADN antiguo

Con la enorme aplicabilidad de la PCR en el campo del ADN antiguo, no se hizo esperar el primer trabajo que obtenía ADN de restos fósiles. En este estudio, se extrajo el material genético de un ejemplar de quagga disecado [21]. El quagga es una especie extinta que habitó en Sudáfrica hasta el año 1870, cuando desapareció definitivamente por una caza excesiva. Gracias a este análisis del ADN antiguo se pudo saber que el quagga estaba íntimamente relacionado con la cebra actual.

A partir de este momento, los análisis de ADN antiguo empezaron a ser cada vez más una técnica rutinaria. Sus aplicaciones son innumerables. Al igual que ocurrió con el quagga, se ha usado el ADN antiguo para caracterizar numerosas especies extintas como por ejemplo la Moa [8], que se extinguió en Nueva Zelanda en el año 1500 aproximadamente, o el Lobo Marsupial [45], que se extinguió en Australia y Nueva Guinea en los años 30. Recientemente, la mejora de las técnicas usadas en ADN antiguo, ha permitido caracterizar especies

más antiguas como por ejemplo el Oso Cavernario [37,6,20,22,23] o el Mamut [19,25,44], ambos extintos en Europa hace unos 10.000 años.

Además de estas aplicaciones, muy importantes para los investigadores que trabajan en evolución o en paleontología, el ADN antiguo también ha servido para determinar la alimentación y el comportamiento, tanto de especies animales como del hombre. Entre estos trabajos se encuentra el análisis de coprolitos (heces fosilizadas) y de sedimentos.

Un ejemplo de la aplicación de los coprolitos al estudio de las poblaciones humanas fue el presentado por Gilbert y colaboradores en 2008 [17]. En este trabajo analizaron coprolitos humanos encontrados en Oregón y datados con una antigüedad de 12,300 años. Ya que la aparición del complejo tecnológico Clovis se ha datado en torno a 11,000 años, estos resultados apuntan a la posibilidad de una migración humana anterior a la esta cultura. También se ha logrado obtener ADN de sedimentos de los diferentes niveles estratigráficos de una excavación., como en el caso del trabajo presentado por Willeslev en 2003 [49], donde se logró obtener ADN de plantas y animales del Holoceno y del Pleistoceno a partir de sedimentos.

Otra aplicación del ADN antiguo es el estudio del proceso de domesticación de las especies de

animales y plantas que han acompañado al hombre durante su evolución. El ejemplo más claro de este tipo de investigación es la que se ha realizado sobre la domesticación del perro. En 2002 Leonard y colaboradores [28], determinaron que perros domésticos del nuevo mundo proceden de Eurasia, por lo que tuvieron que acompañar al hombre en su migración al continente americano a través de estrecho de Bering [41]. Otras especies que se han estudiado son el maíz [26,29] o el ganado [4,46].

El ADN antiguo también se ha usado para detectar enfermedades en restos óseos. Muchas veces es difícil determinar con exactitud si un individuo estuvo afectado o no por una enfermedad tras la esqueletización del cuerpo. Las técnicas de ADN antiguo se han usado para confirmar la presencia de enfermedades mediante la recuperación de ADN de virus y bacterias. Un ejemplo sería el estudio de la presencia del agente causante de la tuberculosis en momias precolombinas [3], o del patógeno de la peste negra en restos exhumados en un cementerio francés del siglo XVIII [11].

También es importante en Arqueología y Antropología la caracterización de poblaciones humanas históricas, como el trabajo de Endicott y colaboradores, que analizaron restos fósiles de los aborígenes de las islas de Andamán [12], o el de Maca-Meyer y colaboradores con los aborígenes canarios [31]. Concretamente, en Canarias se han analizado diversas poblaciones antiguas, obteniéndose una gran cantidad de información [32,2,1,13,14,15]. Las conclusiones de estos trabajos indican que el origen de los aborígenes canarios es norteafricano, encontrándose las similitudes más importantes con la zona occidental del Magreb (Marruecos) y con el Sahara. Además se ha observado que en la población actual canaria persiste una importante influencia genética de sus ancestros norteafricanos caracterizada por una elevada asimetría sexual: mientras los linajes maternos son en su mayoría aborígenes, los paternos tienen un mayor componente europeo.

Al igual que ocurre con las especies animales y vegetales. La mejora de las técnicas ha permitido analizar restos humanos más antiguos, e incluso, fósiles de Neandertal. Los trabajos sobre neandertales han arrojado luz sobre la evolución humana. Se ha determinado que el ADN mitocondrial de los Neandertales es diferente al de los humanos modernos y se calculó que la edad del ancestro común de *Homo sapiens sapiens* y el *Homo neanderthalensis* es cuatro veces más antiguo que el ancestro común de todos los hombres modernos [27, 36]. Además, se observó que los Neandertales se extinguieron sin contribuir genéticamente al hombre moderno, es decir, que no hubo mezcla entre *Homo sapiens sapiens* y *Homo neanderthalensis* [27,36,16].

### **Limitaciones del ADN antiguo**

Poco tiempo después de que se iniciara la era del ADN antiguo, varios investigadores comenzaron a publicar trabajos en los que aseguraban haber obtenido ADN de especímenes con más de un millón de años de antigüedad [51,18]. Sin embargo, estos trabajos se tomaron con gran escepticismo, ya que ningún investigador fue capaz de duplicar sus resultados de forma independiente. Tiempo después se descubrió que lo que se había considerado ADN de plantas de Mioceno o de dinosaurios, era en realidad ADN de microbios e incluso ADN humano moderno que había contaminado la muestra [39]. Estos primeros fracasos en el campo del ADN antiguo están ocasionados por las dos limitaciones más importantes de esta técnica: la degradación del ADN antiguo y la contaminación con ADN moderno.

Diversos estudios han determinado que el ADN sólo puede sobrevivir un tiempo determinado en los restos fósiles [30,24]. Mientras el organismo vive, su material genético está en continua reparación y en un medio celular que lo protege. Pero, una vez que el organismo muere, empiezan los procesos de degradación, que serán más o menos rápidos en función de la temperatura, la humedad y el pH, principalmente. Hoy en día se sabe que existe un límite temporal para la supervivencia del ADN. De esta forma, la amplificación por PCR de moléculas de más de un millón de años es un logro imposible.

Otro gran problema, quizás el mayor, es la contaminación con ADN moderno [5,34]. Como vimos anteriormente la PCR tiene una gran capacidad amplificadora. Por eso, es muy peligroso que el ADN antiguo se contamine con moléculas de ADN moderno, ya sea procedente de microorganismos del suelo, como de ADN humano durante su manipulación.

El problema de contaminación con ADN moderno por parte de los manipuladores es importante si tenemos en cuenta que, como valor medio, una persona pierde en un solo día unos 50 – 100 pelos y 0,3 – 0,5 mm de la capa más externa de la piel. Además, al hablar, estornudar o toser, se expulsan las células presentes en la saliva. Ya que el ADN moderno está en mejores condiciones que el antiguo, al hacer la reacción de PCR, se amplificará de forma preferente.

### **Prevención de la degradación y la contaminación en los estudios antropológicos**

Para evitar resultados fraudulentos como los obtenidos en el estudio del ADN de dinosaurios o plantas del Mioceno [51,18], se han establecido una serie de pautas o criterios que sirven para autentificar los estudios genéticos de material fósil ante la comunidad científica [8,38]. Entre estos criterios de autenticidad se exigen el uso de áreas independientes para la extracción y amplificación del ADN antiguo, el uso de guantes, bata, gorro y mascarilla para manipular las muestras, la adición

de controles que nos permitan detectar la contaminación con ADN moderno o la cuantificación del ADN para determinar el grado de degradación.

Sin embargo, si en las fases anteriores de la excavación y los análisis antropológicos no se respetan ciertos criterios, el material puede estar contaminado o dañado antes de llegar al laboratorio de Genética.

Es importante tener en cuenta que el proceso de degradación del ADN puede continuar incluso cuando el fósil ha sido excavado y almacenado [7,43]. El lavado del material arqueológico, por ejemplo, genera una disminución en el pH y en el contenido salino. Esto, unido al almacenamiento durante años a temperatura ambiente, provoca que las muestras conservadas en museos tengan una menor eficiencia de amplificación que el material recién excavado. Por ello, se recomienda realizar los análisis de ADN antiguo inmediatamente después de la excavación o conservar el material fósil en congeladores.



Figura 4 – Foto mostrando las condiciones idóneas para la manipulación de muestras antiguas

Para evitar la degradación es importante no lavar los restos óseos tras la excavación y realizar el análisis de ADN en muestras recién excavadas. Si es necesario almacenar las muestras antes de su análisis es indispensable controlar las condiciones de humedad y temperatura, porque si no se pueden acelerar los procesos de degradación. Si es posible, las muestras se conservarán congeladas o refrigeradas. En las muestras expuestas en museos, se recomienda evitar las altas temperaturas y la humedad excesiva.

Para evitar la contaminación con ADN moderno, la manipulación directa de los restos óseos durante la excavación debe realizarse con guantes. Lógicamente, el trabajo de laboratorio, sobre todo cuando la manipulación sea prolongada (medición de restos óseos o dentales, estudios de marcas de actividad, registro fotográfico de las muestras), se realizará siempre con guantes, bata, gorro y mascarilla (Figura 4).

El mejor ejemplo para documentar el problema de la contaminación en muestras arqueológicas ha sido

un estudio realizado por la Universidad de La Laguna, en el que el 36% de unas muestras dentales remitidas para análisis genético estaban contaminadas en su superficie por ADN de los manipuladores [15].

### Conclusiones

Aunque la aplicación de las técnicas de ADN antiguo puede ser de gran importancia en campos como la arqueología o la antropología, es importante conocer las limitaciones de estos estudios y sus principales problemas. Para asegurar la autenticidad y calidad de los resultados científicos es necesario modificar los protocolos de trabajo para evitar la degradación y la contaminación con ADN moderno.

### Bibliografía

1. Arnay-de-la-Rosa M, Gamez-Mendoza A, Navarro-Mederos JF, Hernandez-Marrero JC, Fregel R, Yanes Y, Galindo-Martin L, Romanek CS, Gonzalez-Reimers E: Dietary patterns during the early prehispanic settlement in La Gomera (Canary Islands). *Journal of Archaeological Science* 2009, 36(9):1972-1981.
2. Arnay-De-La-Rosa M, Gonzalez-Reimers E, Fregel R, Velasco-Vazquez J, Delgado-Darias T, Gonzalez AM, Larruga JM: Canary islands aborigin sex determination based on mandible parameters contrasted by amelogenin analysis. *Journal of Archaeological Science* 2007, 34(9):1515-1522.
3. Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA: Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol* 1995, 98(1):37-45.
4. Bailey JF, Richards MB, Macaulay VA, Colson IB, James IT, Bradley DG, Hedges RE, Sykes BC: Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc Biol Sci* 1996, 263(1376):1467-1473.
5. Bandelt HJ: Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity. *Eur J Hum Genet* 2005, 13(10):1106-1112.
6. Bon C, Caudy N, de Dieuleveult M, Fosse P, Philippe M, Maksud F, Beraud-Colomb E, Bouzaid E, Kefi R, Laugier C et al: Deciphering the complete mitochondrial genome and phylogeny of the extinct cave bear in the Paleolithic painted cave of Chauvet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(45):17447-17452.
7. Burger J, Hummel S, Hermann B, Henke W: DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 1999, 20(8):1722-1728.
8. Cooper A, Mourer-Chauvire C, Chambers GK, von Haeseler A, Wilson AC, Paabo S:

- Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(18):8741-8744.
9. Cooper A, Poinar HN: Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 2000, 289(5482):1139.
  10. Curry GB: Amino acids and proteins from fossils. In: *Molecular evolution and the fossil record Short courses in Paleontology*. Edited by Runnegard B, Schopf JW. Knoxville, USA: Paleontological Society; 1988.
  11. Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D: Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(21):12637-12640.
  12. Endicott P, Gilbert MT, Stringer C, Lalueza-Fox C, Willerslev E, Hansen AJ, Cooper A: The genetic origins of the Andaman Islanders. *Am J Hum Genet* 2003, 72(1):178-184.
  13. Fregel R, Betancor E, Suarez NM, Cabrera VM, Pestano J, Larruga JM, Gonzalez AM: Temporal evolution of the ABO allele frequencies in the Canary Islands: the impact of the European colonization. *Immunogenetics* 2009, 61(9):603-610.
  14. Fregel R, Gomes V, Gusmao L, Gonzalez AM, Cabrera VM, Amorim A, Larruga JM: Demographic history of Canary Islands male gene-pool: replacement of native lineages by European. *BMC Evol Biol* 2009, 9:181.
  15. Fregel R, Pestano J, Arnay M, Cabrera VM, Larruga JM, Gonzalez AM: The maternal aborigine colonization of La Palma (Canary Islands). *Eur J Hum Genet* 2009, 17(10):1314-1324.
  16. Ghirotto S, Tassi F, Benazzo A, Barbujani G: No evidence of Neandertal admixture in the mitochondrial genomes of early European modern humans and contemporary Europeans. *Am J Phys Anthropol* 2011, 146(2):242-252.
  17. Gilbert MT, Jenkins DL, Gotherstrom A, Naveran N, Sanchez JJ, Hofreiter M, Thomsen PF, Binladen J, Higham TF, Yohe RM, 2nd et al: DNA from pre-Clovis human coprolites in Oregon, North America. *Science* 2008, 320(5877):786-789.
  18. Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G: Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature* 1990, 344(6267):656-658.
  19. Hagelberg E, Thomas MG, Cook CE, Jr., Sher AV, Baryshnikov GF, Lister AM: DNA from ancient mammoth bones. *Nature* 1994, 370(6488):333-334.
  20. Hanni C, Laudet V, Stehelin D, Taberlet P: Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(25):12336-12340.
  21. Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC: DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 1984, 312(5991):282-284.
  22. Hofreiter M, Munzel S, Conard NJ, Pollack J, Slatkin M, Weiss G, Paabo S: Sudden replacement of cave bear mitochondrial DNA in the late Pleistocene. *Curr Biol* 2007, 17(4):R122-123.
  23. Hofreiter M, Rabeder G, Jaenicke-Despres V, Withalm G, Nagel D, Paunovic M, Jambresic G, Paabo S: Evidence for reproductive isolation between cave bear populations. *Curr Biol* 2004, 14(1):40-43.
  24. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S: Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 2001, 2(5):353-359.
  25. Hoss M, Paabo S, Vereshchagin NK: Mammoth DNA sequences. *Nature* 1994, 370(6488):333.
  26. Jaenicke-Despres V, Buckler ES, Smith BD, Gilbert MT, Cooper A, Doebley J, Paabo S: Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 2003, 302(5648):1206-1208.
  27. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S: Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997, 90(1):19-30.
  28. Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillen S, Vila C: Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science* 2002, 298(5598):1613-1616.
  29. Lia VV, Confalonieri VA, Ratto N, Hernandez JA, Alzogaray AM, Poggio L, Brown TA: Microsatellite typing of ancient maize: insights into the history of agriculture in southern South America. *Proc Biol Sci* 2007, 274(1609):545-554.
  30. Lindahl T: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993, 362(6422):709-715.
  31. Maca-Meyer N, Arnay M, Rando JC, Flores C, Gonzalez AM, Cabrera VM, Larruga JM: Ancient mtDNA analysis and the origin of the Guanches. *Eur J Hum Genet* 2004, 12(2):155-162.
  32. Maca-Meyer N, Cabrera VM, Arnay M, Flores C, Fregel R, Gonzalez AM, Larruga JM: Mitochondrial DNA diversity in 17th-18th century remains from Tenerife (Canary Islands). *Am J Phys Anthropol* 2005, 127(4):418-426.
  33. Maca-Meyer N, Gonzalez AM, Larruga JM, Flores C, Cabrera VM: Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genet* 2001, 2:13.
  34. Malmstrom H, Svensson EM, Gilbert MT, Willerslev E, Gotherstrom A, Holmlund G: More on contamination: the use of asymmetric

- molecular behavior to identify authentic ancient human DNA. *Mol Biol Evol* 2007, 24(4):998-1004.
35. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, 51 Pt 1:263-273.
  36. Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, Smith D, Krause J, Alessi J, Chen F, Platt D, Paabo S, Pritchard JK et al: Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 2006, 314(5802):1113-1118.
  37. Noonan JP, Hofreiter M, Smith D, Priest JR, Rohland N, Rabeder G, Krause J, Detter JC, Paabo S, Rubin EM: Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* 2005, 309(5734):597-599.
  38. Paabo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M: Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 2004, 38:645-679.
  39. Paabo S, Wilson AC: Miocene DNA sequences - a dream come true? *Curr Biol* 1991, 1(1):45-46.
  40. Paabo S: Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 1985, 314(6012):644-645.
  41. Pang JF, Kluetsch C, Zou XJ, Zhang AB, Luo LY, Angleby H, Ardalan A, Ekstrom C, Skollermo A, Lundeberg J et al: mtDNA Data Indicate a Single Origin for Dogs South of Yangtze River, Less Than 16,300 Years Ago, from Numerous Wolves. *Molecular Biology and Evolution* 2009, 26(12):2849-2864.
  42. Poinar GO, Jr., Hess R: Ultrastructure of 40-Million-Year-Old Insect Tissue. *Science* 1982, 215(4537):1241-1242.
  43. Pruvost M, Geigl EM: Real-time quantitative PCR to assess the authenticity of ancient DNA amplification. *Journal of Archaeological Science* 2004, 31(9):1191-1197.
  44. Rohland N, Reich D, Mallick S, Meyer M, Green RE, Georgiadis NJ, Roca AL, Hofreiter M: Genomic DNA sequences from mastodon and woolly mammoth reveal deep speciation of forest and savanna elephants. *PLoS Biol* 2011, 8(12):e1000564.
  45. Thomas RH, Schaffner W, Wilson AC, Paabo S: DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 1989, 340(6233):465-467.
  46. Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, Chamberlain AT, Sykes BC, Bradley DG: Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 2001, 410(6832):1088-1091.
  47. Wang GH, Lu CL: Isolation and identification of nucleic acids of the liver from a corpse from the Changssha tomb. *Shen Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Chin Chan* 1981, 17:70-75.
  48. Weiner S, Lowenstam HA, Hood L: Characterization of 80-million-year-old mollusk shell proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, 73(8):2541-2545.
  49. Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brand TB, Gilbert MT, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA, Cooper A: Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 2003, 300(5620):791-795.
  50. Wyckoff RWG: *The biochemistry of animal fossils*. Bristol, United Kingdom: Scientechnica; 1972
  51. Zischler H, Hoss M, Handt O, von Haeseler A, van der Kuyl AC, Goudsmit J: Detecting dinosaur DNA. *Science* 1995, 268(5214):1192-1193; author reply 1194.