

Preservación de ADN en muestras de úrsidos Pleistocenos y Holocenos del NW de la Península Ibérica

GONZÁLEZ-FORTES, G.^{1,2}, GARCÍA-VÁZQUEZ, A.¹, PINTO-LLONA, C. A.³ y GRANDAL-D'ANGLADE, A.¹

(1) Instituto Universitario de Xeoloxía Isidro Parga Pondal, ESCI, Campus de Elviña, Universidade da Coruña, 15071 A Coruña

(2) Instituto de Historia, Centro de Ciencias Humanas y Sociales, C/ Albasanz, 26-28, 28037 Madrid

(3) Molecular Ecology Group, University of York, Wentworth Way, YO10 5DD York, Reino Unido

Abstract

In this paper we present 73 short mitochondrial DNA (mtDNA) sequences obtained from 30 brown bear (*Ursus arctos*) and 56 cave bear (*Ursus spelaeus*) samples in several cave sites of Northwestern Iberian Peninsula (Galicia and Asturias), of Holocene and Pleistocene ages. The technique used was PCR amplification of small mtDNA fragments and the subsequent Sanger sequencing of PCR products. In total, 6 different haplotypes were obtained for the brown bear and two for the cave bear. The high success rate of PCR amplifications (85%, 73 positive amplifications out of a total of 86 samples) demonstrates the good conditions of the Sierra do Courel caves for the preservation of DNA in fossil bone remains, even for tens of millennia old.

Key words: mitochondrial DNA, brown bear, cave bear, Pleistocene, Holocene, Galicia, Asturias

Resumen

En este trabajo se presentan 73 secuencias cortas de ADN mitocondrial (ADN mt) obtenidas a partir de 30 muestras de oso pardo (*Ursus arctos*) y 56 de oso cavernario (*Ursus spelaeus*) procedentes

de diversos yacimientos del noroeste de la Península ibérica (Galicia y Asturias) y de edades finipleistocenas y holocenas. La técnica utilizada fue la amplificación mediante PCR de pequeños fragmentos de ADNmt y la posterior secuenciación Sanger de los productos PCR. En total se han obtenido 6 haplotipos diferentes para el oso pardo y dos para el cavernario. El elevado porcentaje de éxito de las amplificaciones PCR (85%, 73 amplificaciones positivas de un total de 86 muestras) demuestra las buenas condiciones de las cuevas de la Sierra do Courel para la preservación de ADN en restos óseos fósiles, incluso de decenas de milenios de antigüedad.

Palabras clave: ADN mitocondrial, oso pardo, oso cavernario, Pleistoceno, Holoceno, Galicia, Asturias

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas, el ADN antiguo (ADNa) se ha revelado como una potente herramienta biomolecular en estudios arqueológicos y paleontológicos (Hofreiter et al. 2014). Tradicionalmente los estudios de ADNa se han basado en la recuperación de fragmentos cortos de ADN mitocondrial (ADNmt) a partir de amplificación PCR y secuenciación Sanger. La abundancia de mitocondrias en la célula y por tanto, de copias de sus genes, hace que a lo largo del tiempo aumente la posibilidad de preservación de fragmentos de genes mitocondriales en comparación con las dos únicas copias de genes nucleares en células diploides. Sin embargo, desde el desarrollo de la tecnología de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS) la investigación en ADN antiguo ha experimentado una enorme revolución, llegando a ser posible la recuperación de genomas mitocondriales (Brand et al. 2013) y nucleares completos a partir de muestras tan antiguas como 700000 años (Orlando et al. 2013). La mayor desventaja de la aplicación de tecnología NGS es sin embargo su elevado coste, que todavía la hacen prohibitiva para pequeños y medianos laboratorios.

En este estudio nos planteamos testar la preservación de ADN en la colección

de muestras de úrsidos Pleistocenos y Holocenos conservados en el Instituto Universitario de Xeoloxía (UIX) Isidro Parga Pondal (Universidade da Coruña) y en las colecciones de la Dra. A.C. Pinto en el Instituto de Historia del CSIC (Madrid). Para este estudio preliminar se decidió recurrir a tecnología tradicional basada en la amplificación PCR de pequeños fragmentos de ADNmt de oso pardo y cavernario y la posterior secuenciación Sanger de los productos PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras biológicas. Para este estudio se seleccionaron 30 muestras óseas morfológicamente identificadas como pertenecientes a 29 ejemplares distintos de oso pardo (García-Vázquez et al., 2015). En el caso de oso cavernario se seleccionaron 56 muestras óseas pertenecientes a individuos diferentes en base a análisis morfológicos (Grandal-d'Anglade y López González, 1998). En ambos casos, pardo y cavernario, los restos óseos proceden de yacimientos en cuevas del NW de la península ibérica, principalmente Galicia y Asturias (Figura 1). La Tabla 1 recoge las siglas de identificación, edad y procedencia geográfica de cada una de las muestras de oso pardo. La Tabla 2 muestra los mismos datos para el oso cavernario.

Tabla 1. Datos de las muestras de oso pardo (*ursus arctos*) estudiadas. Datos cronológicos de García Vázquez et al. (2015).

Yacimiento	Identificación	hueso	ID-DNA	edad ¹⁴ C cal BP	Haplotipo
Arcoia	ARLU-39	húmero	BB-A1	<40000	-
	ARLU-42	pelvis	BB-A2	36093 ± 1065	23
	ARLU-59	?	BB-A3	36093 ± 1065	-
	ARLU-62	?	BB-A4	>12000s	-
	ARLU-40	radio	BB-A5	-	-
Longo de Meu	LOME-1	costilla	BB-LO1	9140 ± 81	24
Pala Paleira	SIPA-190	costilla	BB-SP5	7340 ± 55	24
	SIPA-1	costilla	BB-SP3	7341 ± 55	24
	SIPA-166	fémur	BB-SP4	7468 ± 31	24
	SIPA-61	tibia	BB-SP2	8039 ± 58	24
	SIPA-2	fémur	BB-SP1	44000	23
Purruñal (mismo individuo)	PUR-LU-9	costilla	BB-P2	8641 ± 122	24
	PUR-LU-75	costilla	BB-P1	8641 ± 122	24
Sumio de Casares	CALE-1	costilla	BB-SC1	30833 ± 381	27
Tarelo	TA-176	costilla	BB-T1	8274 ± 86	24
	TA-Lu-C-60	costilla	BB-T2	8274 ± 86	24
Cuetu Blanco	CB-015	costilla	BB-CB1	9703 ± 82	24
La canal Fuerte	LCF-96-025	costilla	BB-CF1	10216 ± 28	24
	LCF-158	costilla	BB-CF2	9394 ± 58	26
Pozu la Cigacha	CGLL-051	ulna	BB-PC2	7619 ± 30	24
	CGLL-050	ulna	BB-PC1	8265 ± 52	26
Pozu la Veiga'l Retuertu	PUR-015	húmero	BB-PV1	10404 ± 81	24
Pozo Toneyo	RT-001	cráneo	BB-RT1	9831 ± 82	24
Somiedo	SH5-S29-002	costilla	BB-S6		24
	SH5-98-S28-095	húmero	BB-S2	10105 ± 110	24
	SH5-97-U29-59	costilla	BB-S4	4648 ± 134	25
	SH5-97-U28-7	costilla	BB-S5	4836 ± 15	25
	SH5-97-V29-1	costilla	BB-S3	7924 ± 41	24
	SH5-98-S28-082	costilla	BB-S1	9681 ± 74	24
Gonzalo Palomar	GP-1	maxila	BB-GP1	2442 ± 61	28

Tabla 2. Datos de las muestras de oso de las cavernas (*ursus spelaeus*) estudiadas. Datos cronológicos de Pérez Rama et al. (2011).

Yacimiento	Identificación	hueso	ID-DNA	edad ¹⁴ C cal BP	Haplotipo
Arcoia	Ar-US-peq	fémur	CB-A1		Us1
	Ar-US-gde	fémur	CB-A2	>40000	Us1
Eirós	E-TD-2503	costilla	CB-E1	34190 ± 695	Us2
	E-V-S-55	costilla	CB-E2	30544 ± 679	Us2
	E-V-S-162	costilla	CB-E3	34381 ± 581	Us2
	E-Ua-S-2623	costilla	CB-E4	34916 ± 576	Us2
	E-ZYX-S-963	radio	CB-E5		Us2
	E-ZYX-S-958	radio	CB-E6		Us2
	E-ZYX-S-964	radio	CB-E7		Us2
	E-ZYX-S-962	radio	CB-E8		Us2
	E-T-3010	costilla	CB-E9		Us2
	E-T-3011	costilla	CB-E10		Us2
	E-T-3012	costilla	CB-E11		Us2
	E-T-3017	costilla	CB-E12		Us2
	E-2112	fémur	CB-E13		Us2
	E-2107	fémur	CB-E14		Us2
	E-2104	radio	CB-E15		Us2
	E-2544	tibia	CB-E16		Us2
	E-2583	ulna	CB-E17		Us2
	Eusa-11	costilla	CB-E18	>38.000	-
Liñares	VL-L-410-G	costilla	CB-L1		Us1
	VL-L-406-G	costilla	CB-L2		Us1
	VL-1331-G	costilla	CB-L3		Us1
	Lin-E230	costilla	CB-L4		Us1
	Lin-E144	costilla	CB-L5		Us1
	Lin-E227	costilla	CB-L6		Us1
	VL-571-G	costilla	CB-L7		Us1
	Lin-59	costilla	CB-L8		Us1
	VL-L-411-G	costilla	CB-L9		Us1
	VL-L-417-G	costilla	CB-L10		Us1
	Lin-E-149	costilla	CB-L11		Us1
	VL-L-398-G	costilla	CB-L12		Us1
	VL-L-405-G	costilla	CB-L13		Us1
	Lin-234	costilla	CB-L14		Us1
	Lin-E229	costilla	CB-L15		Us1
	Lin-549	costilla	CB-L16		Us1
	Lin-1009	tibia	CB-L17	>40000	Us1
	Lin-E57	costilla	CB-L18		Us1
	Lin-1007	costilla	CB-L19		Us1

A Ceza	CEZ-540	costilla	CB-C1		Us2
	CEZ-535	costilla	CB-C2		Us2
	CEZ-534	costilla	CB-C3		Us2
	CEZ-276	costilla	CB-C4		Us2
	CEZ-271	costilla	CB-C5		-
	CEZ-150	costilla	CB-C6	35230 ± 1430	-
	CEZ-561	costilla	CB-C7		Us2
	CEZ-563	costilla	CB-C8		Us2
	CEZ-565	costilla	CB-C9		Us2
	CEZ-605	costilla	CB-C10		Us2
	CEZ-710	costilla	CB-C11		Us2
O Rebolal	PR-R97-1	maxila	CB-R1	13785 ± 110	-
	PR-R97-15	húmero	CB-R2	30455 ± 795	-
	PR-R97-16	fémur	CB-R3	27970 ± 600	-
	PR-R-97-5	mandíbula	CB-R4	22915 ± 445	-
	PR-R97-267	mandíbula	CB-R5	>39000	-
	PR-R99-158	costilla	CB-R6		-

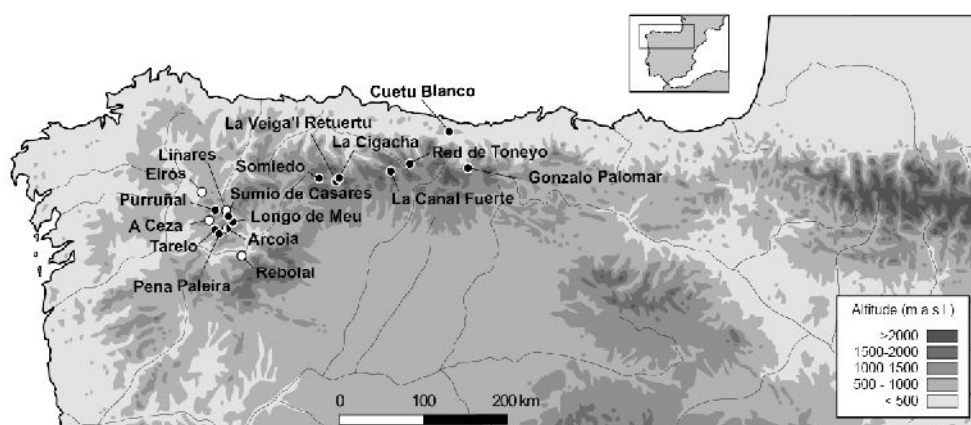


Fig. 1. Mapa de situación de las cuevas estudiadas en el Noroeste de la Península Ibérica. Con círculos blancos se destacan los yacimientos con oso cavernario; los círculos negros muestran los yacimientos con oso pardo.

Extracción de ADN. La extracción de ADN se llevó a cabo en la Universidad de York (Inglaterra), en un laboratorio especialmente dedicado a la manipulación de muestras antiguas. Cada una de las muestras fue descontaminada por erosión física de la superficie externa, seguida de la exposición durante 10 minutos de cada una de las super-

ficies a luz UV. A continuación se siguió el protocolo de extracción de ADN descrito por Rohland *et al.* 2010, especialmente diseñado para la recuperación de fragmentos cortos de ADN a partir de muestras óseas antiguas.

Amplificación PCR. La presencia de ADN se testó a partir de la amplificación de un fragmento hipervariable de la región de

control del ADN mitocondrial. En el caso de los oso cavernarios, se amplificó un fragmento de 104 pares de bases (pb) utilizando los primers descritos por Hofreiter *et al* 2004 (CBL164: GCATATAAGCATGTACA-TATTATGC y CBL221: CGGACTAAGT-GAAATACATGCT). En las muestras de oso pardo se amplificó un fragmento 126 pb utilizando el primer CBL221: CGGACTAAGT-GAAATACATGCT de Hofreiter *et al.* 2004 en combinación con un primer específico para oso pardo desarrollado en este estudio, el UaF7: TCGTGCATTAAT-GGCGTG. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando Taq gold, enzima capaz de leer residuos uracilo que podrían estar presentes debido a la desaminación de citosinas, que es uno de los daños típicos de las moléculas de ADN antiguas. En cada reacción se emplearon 5 µl de extracto y 15 µl de mezcla, completando un volumen de 20 µl. Las condiciones de reacción PCR fueron las descritas en Hofreiter *et al.* 2004.

Secuenciación: los productos PCR fueron amplificados en sentido forward y reverse en un analizador ABI3130xl en el Servicio de Biología Molecular de los SAI (Servicios de Apoyo á Investigación) de la Universidad de Coruña.

La calidad de las secuencias fue inspeccionada y visualmente usando el software BioEdit versión 7.2.0 (Hall *et al.* 1999) y ensambladas en Geneious R6 (Kearse *et al.* 2012).

Autenticación de los resultados: Todo el procesado de la muestra, desde la descontaminación a la extracción y preparación de la mezcla para la PCR, fueron llevados a cabo en laboratorios aislados, en los que nunca se llevaron a cabo extracciones a partir de muestras actuales, ni se manipularon productos PCR. Además, cada una de las

muestras se amplificó por duplicado a partir de extractos independientes de forma que la secuencia final se obtuvo como consenso de al menos cuatro lecturas (dos forward y dos reverse).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Osos pardos. En total, se obtuvieron amplificaciones positivas para 26 de las 30 muestras analizadas. Las muestras procedentes de la cueva de Arcoia fueron las que demostraron menor éxito en las amplificaciones, ya que solo se obtuvieron productos PCR a partir de una (BB-A4) de las cinco muestras analizadas. En el caso de las muestras procedentes de la cueva de Tarelo, ambas presentan idéntica datación de carbono y secuencia de ADN, lo que parece indicar que podrían pertenecer a un mismo individuo.

Osos cavernarios. Se analizaron 56 muestras procedentes de 5 cuevas localizadas en la Sierra del Courel: 2 muestras de la cueva de Arcoia; 18 muestras de Eirós; 19 de Liñares; 11 de A Ceza; y 6 de Rebolal (Figura 1). Todas las muestras dieron amplificaciones positivas, con la excepción de una muestra de Eirós, de gran antigüedad (>38,000 BP), dos de A Ceza (uno de ellos, datado en 35,000 BP) y los seis restos procedentes de la cueva de Rebolal, ninguno de los cuales dio lugar a producto de PCR. El yacimiento de la cueva de Rebolal presenta la característica de que los restos han sido removidos y cambiados de localización a lo largo del tiempo, como consecuencia de la dinámica natural de la cueva en primer lugar, y posteriormente por la ocupación humana en tiempos recientes (Grandal-d'Anglade *et al.* 2006). La alteración del proceso tafonómico natural podría haber llevado a una aceleración del deterioro de las moléculas orgánicas de los huesos,

lo que habría impedido la recuperación de secuencias de ADN a partir de estas muestras. En total, se obtuvieron 47 secuencias de otros tantos individuos diferentes.

Diversidad genética. Entre las 24 muestras únicas de oso pardo (ya que las dos muestras de Purruñal pertenecen al mismo individuo y consideramos ahora que las dos de Tarelo también proceden del mismo individuo), se identificaron seis haplotipos distintos definidos por un total de 13 posiciones polimórficas entre las bases 16724 y 16796 (Figura 2). El haplotipo más abundante es el 24, que aparece representado en todas las cuevas con la excepción de Sumio de Casares (SC1, Galicia) y Gonzalo Palomar (GP, Cantabria). Los haplotipos

más diferentes con respecto al 24 son los haplotipos 23 y 27, ambos identificados en las dos únicas muestras Pleistocenas entre los osos pardos, SC1 y SP1 (30833 ± 381 y 44000 yBP, respectivamente). El haplotipo 23 se diferencia en seis posiciones con respecto al 24, mientras que el 27 lo hace en 8 posiciones, en contraste con los haplotipos 25, 26 y 28 tan solo difieren en 1 o 2 posiciones entre sí y con respecto al 24. Dada la tasa de mutación estimada en ADNmt (de 0 a 10⁻⁴ mutaciones/sitio/año, Stiller *et al.* 2013), los haplotipos 24, 25, 26 y 28 no parecen haber evolucionado a partir de los 23 o 27, sino que se trataría de linajes filogenéticamente distantes dentro de los osos pardos.

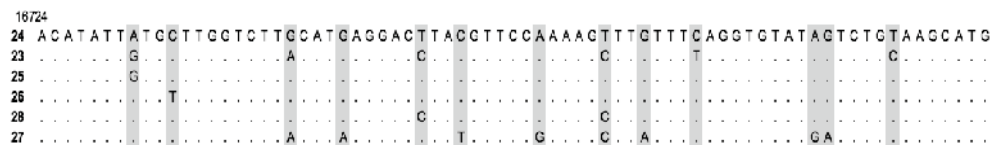


Fig. 2. Posiciones polimórficas de los haplotipos mitocondriales identificados en oso pardo.

En el caso de los osos cavernarios, las 104 bases de la región de control permitieron distinguir tan solo dos haplotipos, el Us1 y Us2 (Figura 3). Ambos haplotipos se diferencian tan solo en una posición, la

16551, donde Us1 se genotipa como C y Us2 como T. Us1 está presente en todas las muestras de las cuevas de Arcoia y Linares, mientras que Us2 aparece en A Ceza y Eirós.



Fig. 3. Posiciones polimórficas de los haplotipos mitocondriales identificados en oso cavernario. En las líneas 1-3 se incluyen las secuencias publicadas por Bon et al. (2010) para este mismo fragmento.

Los mismos haplotipos fueron identificados por Bon y colaboradores (Bon *et al.* 2010) en las cuevas de Chauvet y Deux-Ouvertures, en el sureste de Francia. Mientras que los ejemplares de Chauvet presentaban ambos haplotipos, los de Deux-Ouvertures tan solo presentaban el Us2. En el caso del Courel, cada una de las cuevas conserva individuos de un único haplotipo, siendo similares en Arcoia y Liñares por un lado, y A Ceza y Eirós por otro.

CONCLUSIONES

El elevado porcentaje de éxito de las amplificaciones PCR (85%, 73 amplificaciones positivas de un total de 86 muestras) demuestra las buenas condiciones de las cuevas de la Sierra do Courel para la preservación de ADN en restos óseos fósiles, tanto del Holoceno como del Pleistoceno. Las únicas muestras de oso cavernario a partir de las que no se pudieron obtener secuencias de ADN fueron una de Eirós, dos de A Ceza, y todas las muestras de Rebolal. La cronología de estas muestras fallidas es variable, desde >38,000 BP hasta las más recientes datadas hasta el momento en la región (Grandal & Vidal Romaní, 1997; Grandal *et al.* 2006). Este dato parece indicar que no es sólo la antigüedad de la muestra el factor más determinante para la preservación del ADN, sino las condiciones de conservación de las mismas, ya sea en el yacimiento o en el almacenaje posterior tras la excavación.

Entre las muestras analizadas a nivel de ADN, se observa una mayor diversidad genética entre las muestras de oso pardo (6 haplotipos identificados en un rango temporal de >40000 a 2000 años) en comparación con las de cavernario (2 haplotipos en un rango temporal de >40000 a 25000 años). La me-

nor diversidad genética en los cavernarios podría estar asociada con el declive de la especie hacia el momento de su extinción en torno a los 24000 años, lo que ya ha sido observado en otros estudios genéticos de esta especie (Stiller *et al.* 2010).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es una contribución al Proyecto de Investigación BIOGEOS (MINECO CGL2014-57209-P) y no sería posible sin el apoyo del Instituto de Xeoloxía Isidro Parga Pondal y el Molecular Ecology Group de la University of York, liderado por el Dr. Michael Hofreiter. Las muestras procedentes de Galicia fueron recogidas gracias a la inestimable ayuda de los grupos de espeleología G.E.S. Ártabros y G.E.S. Brigantium (A Coruña), G.E. Arcoia (Quiroga), G.E. Mauxo y C.E. A Trapa (Vigo), Federación Galega de Espeleoloxía y a D. Victorino Marzábal y D. Orlando Álvarez. Las de Asturias gracias a Grupu d'Espeleoloxía Gorfolí (Avilés), Grupo de Espeleología Esperteyu Cavernícola (Xixón), Spéléo-club Rouler-Bouler d'Yverdon (Jura-Nord, Suiza), Federación Asturiana de Espeleología y a D. Germán Rodríguez Calvo.

BIBLIOGRAFÍA

- BON, C., BERTHONAUD, V., FOSSE, P., GÉLY, B., MAKSUD, F., VITALIS., R., PHILIPPE, M., 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* 38 (3), 1886-1895.
- BRANDT, G., HAAK2, W., ADLER, C.J., ROTH, C., SZÉCSÉNYI-NAGY, A.,

- KARIMNIA, S., MÖLLER-RIEKER, S., MELLER, H., GANSLMEIER, R., FRIEDERICH, S., DRESELY, V., NICKLISCH, N., PICKRELL, J.K., SIROCKO, F., REICH, D., COOPER, A., ALT, K.W. & THE GENOGRAPHIC CONSORTIUM 2013. Ancient DNA Reveals Key Stages in the Formation of Central European Mitochondrial Genetic Diversity. *Science* 342, 257-261.
- GARCÍA-VÁZQUEZ, A., PINTO LLONA, A.C., GONZÁLEZ-FORTES, G.M. & GRANDAL-D'ANGLADE, A. 2015. Distribución y cronología del oso pardo (*Ursus arctos* L.) en la Península Ibérica durante el Pleistoceno superior y Holoceno. *Spanish Journal of Palaeontology* 30 (1), 161-184.
- GRANDAL-D'ANGLADE, A. Y LÓPEZ GONZÁLEZ, F. 1998. A population study on the Cave Bears (*Ursus spelaeus* ROSENMÜLLER-HEINROTH) from Galician caves, NW of Iberian Peninsula. *Cadernos do Laboratorio Xeolóxico de Laxe* 23, 215-224.
- GRANDAL-D'ANGLADE, A., VIDAL ROMANÍ, J.R., VAQUEIRO, M. & MÉNDEZ, E. 2006. O Rebolal. A new cave in Galicia (NW Spain) with recent cave bear remains: preliminary report. *Scientific Annals of the School of Geology* Special vol. 98, 173-177.
- HALL, T.A. 1999. *BioEdit*: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* No. 41, 95-98.
- HOFREITER, M., RABEDER, G., JAE-NICKE-DESPRÉS, V., WITHALM, G., NAGEL, D., PAUNOVIC, M., JAMBRĚSIĆ, G. & PÄÄBO, S. 2004. Evidence for reproductive isolation between cave bear populations. *Current Biology* 14, 40-43.
- HOFREITER, M., PAIJMANS, J.L., GOODCHILD, H., SPELLER, C.F., BARLOW, A., FORTES, G.G., THOMAS, J.A., LUDWIG, A. & COLLINS M.J. 2015. The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *Bioessays* 37 (3), 284-93.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P. & DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12), 1647-1649.
- ORLANDO, L., GINOLHAC, A., ZHANG, G., FROESE, D., ALBRECHTSEN, A., STILLER, M., SCHUBERT, M., CAPPELLINI, E., PETERSEN, B., MOLTKE, I., JOHNSON, P.L., FUMAGALLI, M., VILSTRUP, J.T., RAGHAVAN, M., KORNELIUSSEN, T., MALASPINAS, A.S., VOGT, J., SZKLARCZYK, D., KELSTRUP, C.D., VINTHER, J., DOLOCAN, A., STENDERUP, J., VELAZQUEZ, A.M., CAHILL, J., RASMUSSEN, M., WANG, X., MIN, J., ZAZULA, G.D., SEGUIN-ORLANDO, A., MORTENSEN, C., MAGNUSSEN, K., THOMPSON, J.F., WEINSTOCK, J., GREGERSEN, K., RØED, K.H., EISENMANN, V., RUBIN, C.J., MILLER, D.C., ANTCZAK, D.F., BERTELSEN, M.F., BRUNAK, S., AL-RASHEID, K.A., RYDER, O., ANDERSSON, L., MUNDY, J., KROGH, A., GIL-

- BERT, M.T., KJÆR, K., SICHERITZ-PONTEN, T., JENSEN, L.J., OLSEN, J.V., HOFREITER, M., NIELSEN, R., SHAPIRO, B., WANG, J. & WILLER-SLEV, E. 2013. Recalibrating *Equus* evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499 (7456), 74-78.
- PÉREZ-RAMA, M., FERNÁNDEZ-MOSQUERA, D. & GRANDAL-D'ANGLADE, A. 2011. Effects of hibernation on the stable isotope signatures of adult and neonate cave bears. *Quaternaire Hors Série* 4, 79-88.
- ROHLAND, N., SIEDEL, H. & HOFREITER, M. 2010. A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Molecular Ecology Resources* 10(4), 677-683.
- STILLER, M., BARYSHNIKOV, G., BOCHERENS, H., GRANDAL-D'ANGLADE, A., HILPERT, B., MUNZEL, S.C., PINHASI, R., RABEDER, G., ROSENDAHL, W., TRINKAUS, E., HOFREITER, M. & KNAPP, M. 2010. Withering Away—25,000 Years of Genetic Decline Preceded Cave Bear Extinction. *Molecular Biology and Evolution* 27 (5), 975-978.
- STILLER, M., MOLAK, M., PROST, S., RABEDER, G., BARYSHNIKOV, G., ROSENDAHL, W., MÜNDEL, S., BOCHERENS, H., GRANDAL-D'ANGLADE, A., HILPERT, B., GERMONPRÉ, M., STASYK, O., PINHASI, R., TINTORI, A., ROHLAND, N., MOHANDASAN, E., HO, S.Y.W., HOFREITER, M. & KNAPP, M. 2014. Mitochondrial DNA diversity and evolution of the Pleistocene cave bear complex. *Quaternary International* 339, 224-231.