

INFORMACIÓN MOLECULAR OBTENIDA A PARTIR DE PIELES DE LA COLECCIÓN DEL MUSEO REGIONAL FAGNANO, RÍO GRANDE, TIERRA DEL FUEGO

Romina S. Petrih* y Martín H. Fugassa

CONICET-Laboratorio de Paleoparasitología. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata. Argentina

PALABRAS CLAVE ADN antiguo; pelo; arqueología ambiental

RESUMEN En el presente trabajo se aplicaron técnicas moleculares sobre muestras poco conservadas de pieles depositadas en la colección del Museo Regional Monseñor Fagnano, Tierra del Fuego, Argentina, con el objetivo de identificar la especie con la que fueron confeccionadas. Se extrajeron pelos de mantas realizadas con pieles de guanaco (*Lama guanicoe*) por Selk'nam y de una piel de puma (*Puma concolor*) procedente de la provincia de Santa Cruz. Ambas muestras se encontraban almacenadas en el Museo Regional Monseñor Fagnano y en la Misión Salesiana Candelaria en Río Grande, Tierra del Fuego, Argentina. La extracción de ADN de los fragmentos de pelos de 5mm de

longitud se realizó en un buffer de lisis PCR-compatible. Se amplificaron por PCR fragmentos específicos de ADN mitocondrial y se secuenciaron. Estas fueron comparadas con las depositadas en la base de secuencias de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de Estados Unidos. La aplicación de técnicas moleculares permitió recuperar secuencias de ADN de muestras de pieles con un estado de conservación poco óptimo para análisis genéticos, pudiendo extenderse a otras fuentes de pelos como las fibras textiles de origen arqueológico de la región. *Rev Arg Antrop Biol* 17(1):00-00, 2015.

KEY WORDS ancient DNA; hair; environmental archaeology

ABSTRACT Molecular techniques were applied to samples from poorly preserved furs deposited in the collection of Monseñor Fagnano Regional Museum in Tierra del Fuego, Argentina, in order to identify the species from which they were made. Hairs were obtained from guanaco leather blankets (*Lama guanicoe*) and a puma fur (*Puma concolor*) made by Selk'nam from Santa Cruz province. Both samples have been kept in the warehouse of Monseñor Fagnano Regional Museum at the Candelaria Salesian Mission in Río Grande, Tierra del Fuego, Argentina.

For DNA extraction, 5mm hair strands were digested in a PCR-compatible lysis buffer. Specific mitochondrial DNA fragments were amplified by PCR and sequenced. Nucleotide sequences were compared with those deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA: GenBank. The use of molecular techniques allowed us to recover sequences from poorly preserved fur samples. This can be extended to other sources of hairs and fibers of archaeological origin in the area. *Rev Arg Antrop Biol* 17(1):00-00, 2015.

Durante los últimos años se han realizado esfuerzos por aumentar la diversidad de fuentes de evidencias para los estudios paleoparasitológicos (Fugassa et al., 2007a, b, 2008). Asimismo, para incrementar la robustez de los datos obtenidos así como también el grado de resolución en la identificación de cada muestra, se estableció en el Laboratorio de Paleoparasitología de la Universidad Nacional de Mar del Plata, un área de análisis molecular de las muestras arqueológicas. Esto tuvo como objetivo, en una primera etapa, mejorar la especificidad tanto del diagnóstico paleoparasitológico como de los coprolitos de los cuales proceden los registros en los contextos arqueológicos. Como se concretó en las investigaciones con microscopía óptica (Fugassa et al., 2007a, b, 2008) se continuó el interés por aumentar el número de fuentes de

evidencias -en este caso moleculares- para las muestras de Patagonia.

En los estudios paleogenéticos tradicionalmente se han utilizado restos óseos aunque en los últimos años, los pelos han aumentado la atención como fuentes de evidencia genética por ser piezas que pueden descontaminarse

Financiamiento: PIP 090/11, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). PICT 1529, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). EXA590/12, Universidad Nacional de Mar del Plata. BR/10/09, CAPES/MINCYT.

*Correspondencia a: Romina S. Petrih. Universidad Nacional de Mar del Plata. Deán Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Argentina. Email: rpetrih@gmail.com

Recibido 03 Marzo 2014; aceptado 16 Junio 2014

fácilmente. Los métodos moleculares utilizados resultan poco destructivos para muestras antiguas (Hofreiter, 2012) y poco invasivos para muestras modernas de especies silvestres (Foran et al., 1997; Henry et al., 2011). La historia del uso de pelos como fuente de ADN se remonta a los años 80 (Higuchi et al., 1988; Vigilant et al., 1989). Su utilización permitió conseguir información para casos forenses (Schneider et al., 1999; Pfeiffer et al., 2004; van Asch et al., 2009) y determinar el origen de fibras textiles modernas (Subramanian et al., 2005) y antiguas (Brandt et al., 2011). El interés en los pelos como elemento de estudio paleogenético tuvo su origen recientemente (Baker, 2001; Bonnichsen et al., 2001). Los estudios de Bonnichsen et al. (2001) se centraron en la utilización de herramientas moleculares sobre pelos de una piel antigua de carnero de las Rocosas (*Ovis canadensis nelsoni*) hallada en una cueva de Nevada (Estados Unidos), demostrando que era posible extraer ADN a partir de pelos antiguos para discutir enigmas evolutivos y arqueológicos. Por otro lado, Baker et al. (2001) aislaron y analizaron ADN de pelos procedentes de muestras antiguas para conocer la diversidad genética de poblaciones nativas de América del Norte, aportando información geográfica y temporal. Desde estos estudios y hasta el momento se ha aislado ADN mitocondrial de pelos de bisontes, mamuts, humanos y

ovejas (Gilbert et al., 2008a, b; Rasmussen et al., 2010).

En el presente trabajo se aplicaron técnicas moleculares sobre muestras poco conservadas de pieles, con el objetivo de identificar la especie animal con las que fueron confeccionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para los ensayos se seleccionaron pelos de mantas confeccionadas por fueguinos con pieles de guanaco (*Lama guanicoe*) que datan de antes de 1940 y que fueron obtenidos durante la campaña 2008 al Museo Regional Monseñor Fagnano de la Misión Salesiana La Candelaria, Río Grande, Tierra del Fuego, Argentina (Fig. 1). También se eligieron pelos de una piel de puma (*Puma concolor*) procedente de Santa Cruz (Ticó, comunicación personal 2008) con una antigüedad desconocida y ubicada en el mismo museo. Todas las pieles se hallaron en un estado avanzado de deterioro con pérdida de pelos y fragmentos de cuero debido a la presencia de insectos.

Debido a que el ADN antiguo suele estar en baja concentración y fragmentado (Gilbert et al., 2006) se siguieron pautas para reducir el riesgo de contaminación con ADN moderno (Cooper y Poinar, 2000; Hofreiter et al., 2001; Drancourt y Raoult, 2005; Fulton, 2012). En tal sentido, cada uno de los diferentes pasos del

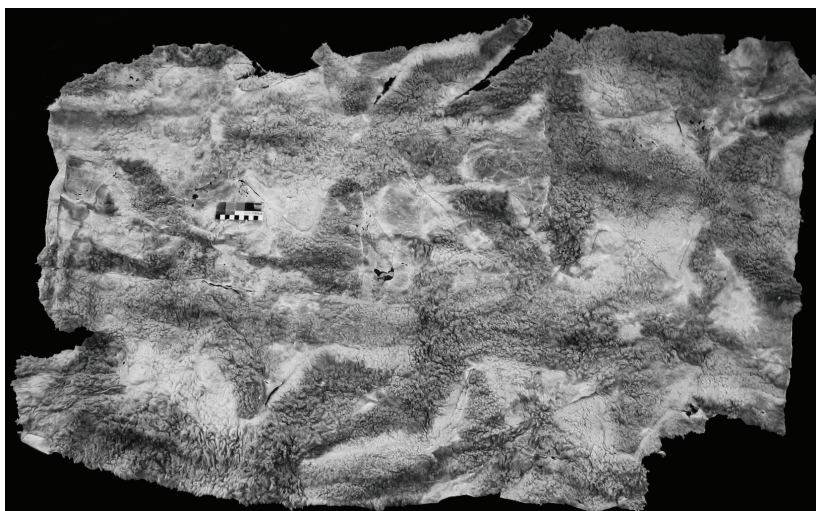


Fig. 1. Manta confeccionada con cueros de guanaco. Depósito del Museo Regional Monseñor Fagnano, Misión La Candelaria, Río Grande, Tierra del Fuego.

proceso de extracción, amplificación y visualización del ADN antiguo fue realizado en áreas aisladas utilizándose material estéril y puntas de micropipetas con filtro descartables. Además, los equipos y superficies utilizados en cada caso fueron descontaminados con lavandina al 10% y enjuagados con etanol al 70%. El área de trabajo y el equipamiento fueron irradiados con UV (265nm) durante 1 hora.

Se extrajo el ADN según la técnica descrita por Allen et al. (1998) realizándose algunas modificaciones (Petrih y Fugassa, 2013). Sintéticamente, conjuntos de 1, 5 y 10 fragmentos de pelos de 5mm de longitud fueron colocados en tubos de 200µl con 50µl de buffer de lisis PCR-compatible compuesto por el buffer de PCR 1x (Fermentas), 260µg/ml de proteinasa K y 0,8% de Tween20. La lisis se realizó a 56°C durante 3 horas seguida por una inactivación de la proteinasa K a 95°C durante 15 minutos. Para confirmar que el ADN aislado provenía del interior del pelo, se realizaron controles consistentes en aislar 10 fragmentos de pelo de cada individuo e incubarlos en agua ultrapura (Gibco) siguiendo el protocolo previamente descrito. Por otra parte, para corroborar que el método fuese exhaustivo se probó la lisis posterior sobre los restos de pelos con DTT (Higuchi et al., 1988) y la subsecuente purificación con QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

Se realizaron amplificaciones de ADN mitocondrial por PCR en 12,5µl de volumen final de reacción conteniendo 0,05U/µl de *taq* Fermentas, 0,8µg/ul de Seroalbumina bovina (BSA), 2mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 2µl de muestra y 0,2mM de cada oligonucleótido específico para amplificar ADN mitocondrial (Tabla 1). Las condiciones de termociclado fueron las sugeridas por la bibliografía (Tabla 1). Los productos se visualizaron por corrida electroforética en geles de agarosa 2% (Invitrogen) y la posterior tinción con el colorante SYBR Gold (Invitrogen). Luego se purificaron con un kit de purificación de productos de PCR (Qiagen). Los fragmentos génicos se secuenciaron en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA (Sequencer 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems) y las secuencias fueron comparadas con las depositadas en el banco de secuencias no redundantes del *National Center for Biotechnology Infor-*

TABLA 1. Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótidos	Secuencia nucleotídica 5'-3'	Tamaño de producto (pb)	Especificidad	Referencia
NAD5C2-F	YTAYGCCTTYACYATCAGCA	160	Felinos (<i>nadh5</i>)	Roques et al. (2011)
NAD5C2-R	AAGTGCTACRGGGAYRAAGA	160	Felinos (<i>nadh5</i>)	Roques et al. (2011)
CAR2f	AAACTGCAGCCCTCAGAATGATAITTTGTCCTCA	146	Carnívoros	Farrel et al. (2000)
CAR2r	TATTCCTTATCTGCCTATACATRCACG	146	Carnívoros	Farrel et al. (2000)
CAMCib2F	AAA TTT CGG CTC CCT GCT A	108	<i>Lama (citocromo b)</i>	Weinstock et al. (2009)
CAMCib4R	GCG ACT GAA GAG AAG GCT GT	108	<i>Lama (citocromo b)</i>	Weinstock et al. (2009)
CAMCib4L	CAA CAG CCT TCT CTT CAG TCG	150	<i>Lama (citocromo b)</i>	Weinstock et al. (2009)
CAMCib4H	GGA AGG CGT AGG AAC CGT AG	150	<i>Lama (citocromo b)</i>	Weinstock et al. (2009)
CAMCR2F	ACG CGT TGC GTG CTA TAT GT	118	<i>Lama</i> (Región control)	Weinstock et al. (2009)
CAMCR2R	GGC CTG GTG AIT AAG CTC GT	118	<i>Lama</i> (Región control)	Weinstock et al. (2009)

(pb): pares de bases

mation (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el algoritmo de búsqueda por homología BLASTN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las muestras que contenían 1, 5 y 10 fragmentos de pelo la amplificación fue efectiva para todos los pares de oligonucleótidos empleados. El método fue evaluado amplificando por PCR fragmentos pequeños de genes de alrededor de 200 pares de bases (pb), ya que en muestras antiguas no es frecuente hallar fragmentos mayores. Los controles de extracción y las pruebas de lisis de la superficie de los pelos resultaron negativos.

Se obtuvo la secuencia del fragmento de 171pb del citocromo b correspondiente a la piel de puma y se confirmó la identidad de esta muestra de pelos por su homología con un fragmento del gen citocromo b de *P. concolor* [Accession Number (AN) AY598482S06] con una identidad del 96%. El hecho de no haber encontrado el 100% de identidad con las secuencias del GenBank podría explicarse por la variabilidad genética que posee esta región del citocromo b. La secuencia nucleotídica obtenida no pudo ser publicada dado que por su tamaño no cumplió con los requerimientos del GenBank y como no conocemos su antigüedad no es posible publicarla como secuencia antigua.

Por otra parte, para la muestra correspondiente a la manta de pelos de guanaco se obtuvieron secuencias correspondientes a dos fragmentos del gen citocromo b amplificados con los oligonucleótidos CAMCitb2F/CAMCitb4R y CAMCitb4L/CAMCitb4H y para la región control con los oligonucleótidos CAMCR2F/CAMCR2R. Se obtuvo una secuencia de 233pb por solapamiento de las dos secuencias del citocromo b (AN: JY295845.1) que presentó homología con la secuencia presente en el GenBank de un fragmento del mismo gen de *L. guanicoe guanicoe* (AN: AY535284.1) con una identidad del 99%. La secuencia obtenida de la región control de los pelos de las mantas de guanaco estudiadas fueron publicadas en el GenBank (AN: JX295844.1) y presentó homología, con una identidad del 100% con la secuencia de *Lama guanicoe* existente en el GenBank (AN: EF197447.1).

En el tallo del pelo la cantidad de ADN total es relativamente baja (Higuchi et al., 1988). Muchos de los estudios se han realizado sobre bulbos de pelo removidos aunque en contextos ambientales frecuentemente sólo se hallan fragmentos de pelos sin bulbo o en la fase telógena (las células del bulbo piloso sufren apoptosis). En la apoptosis el ADN nuclear se destruye permaneciendo intactas las mitocondrias que contienen el ADN mitocondrial, por lo cual resulta más probable hallar intacto éste ADN y no el nuclear (Gilbert et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, los tallos de pelos poseen una menor cantidad de ADN total respecto de las raíces, sobre todo cuando éstas últimas se utilizan rápidamente luego de extraerlas del bulbo. El efecto del tiempo se incrementa cuando las condiciones tafonómicas o de almacenamiento no son las ideales. De esta forma, es imprescindible contar con técnicas sensibles y que prevengan la contaminación con ADN extraño. En este trabajo la aplicación posterior de lisis con DTT no mejoró significativamente los resultados obtenidos e implicó un paso adicional para purificar la muestra.

El método utilizado en este trabajo permitió recuperar ADN de muestras antiguas con escaso material y con poca conservación. Asimismo, redujo las pérdidas de ADN ya que no hubo etapas de purificación evitando exponer la muestra a contaminación cruzada durante las distintas etapas de manipulación.

En este estudio se demostró que las pieles deterioradas, ya sea por el paso del tiempo o por la mala conservación pertenecientes a las colecciones de museos regionales pueden ofrecer información genética obtenida fácilmente y sin una destrucción apreciable del material coleccionado. La información genética obtenida ha permitido determinar la especie animal con la cual fue confeccionada la manta de piel estudiada. Ello es extensible a otras fuentes de pelos como fibras textiles o fragmentos de pelos humanos y vellones sueltos en suelos de ocupación o asociados a cueros u otros restos hallados durante las excavaciones arqueológicas. Aunque la identidad de pelos de origen arqueológico de Patagonia puede ser definida por el patrón morfológico de la cutícula y la médula (Chehébar y Martín, 1989), cuando se trata de definir entre especies próximas, puede ser complejo. Además, en muchos casos se cuen-

ta con pocos pelos o de localizaciones donde no tienen suficientes rasgos característicos.

La información genética obtenida de cada muestra tuvo una homología mayor al 95% con las secuencias disponibles en NCBI, no ofreciendo información suficiente para discutir aspectos poblacionales. Sin embargo, los resultados obtenidos de estas pieles con baja conservación permiten proyectar la amplificación de fragmentos mitocondriales que sean informativos para discutir más detalladamente el origen e historia de estas pieles y los grupos humanos que las emplearon. A medida que se cuente con más secuencias regionales para especies que han tenido una función clave para la vida humana durante el Holoceno como lo fue el guanaco, podrá tenerse mayor certeza sobre la procedencia de las muestras con escasa información contextual. Como se mencionó, estos estudios son fácilmente aplicables a otros materiales arqueológicos o bioantropológicos y también podrían contribuir al estudio de casos forenses de la región. Además, para los exámenes paleoparasitológicos este trabajo habilita su aplicación a pelos presentes en coprolitos debido a la dieta o a la autoingesta, mejorando la identificación del origen zoológico de las muestras. Asimismo, pueden vincularse a los exámenes de ectoparásitos en restos antiguos donde la información paleoparasitológica puede asociarse no sólo a una especie hospedadora determinada (Fugassa et al., 2008) sino también a una población acotada espacialmente.

Si bien los resultados demuestran la posibilidad de obtener información genética de muestras muy dañadas, es necesario mejorar las estrategias de conservación de las colecciones para contemplar a los actuales y futuros estudios moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNMdP) por facilitar el acceso a los equipos y recuerdan al Padre Ticó (1919-2012) por su gran aporte a la conservación del patrimonio histórico de la Isla Grande de Tierra del Fuego.

LITERATURA CITADA

Allen M, Engstrom AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, Von Haesler A, Paabo S, Gyllesten U. 1998. Mitochondrial

- DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 43:453-464.
- Baker LE. 2001. Mitochondrial DNA haplotype and sequence analysis of historic Choctaw and Menominee hair shaft samples. Tesis Doctoral Inédita. Universidad de Tennessee. Knoxville. USA.
- Bonnichsen R, Hodges L, Ream W, Field K, Kirner DL, Selsor K, Taylor RE. 2001. Methods for the study of ancient hair: radiocarbon dates and gene sequences from individual hairs. *J Archeol Sci* 28:775-785. doi:10.1006/jasc.2000.0624
- Brandt LØ, Tranekjerv LD, Mannering U, Ringgaard M, Frei KM, Willerslev E, Gleba M, Gilbert MTP. 2011. Characterising the potential of sheep wool for ancient DNA analyses. *Archaeol Anthropol Sci* 3:209-221. doi:10.1007/s12520-011-0055-2
- Chehébar C, Martín S. 1989. Guía para el reconocimiento microscópico de los pelos de los mamíferos de la Patagonia. Doñana, *Acta Vertebr* 16:247-291.
- Cooper A, Poinar HN. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289:1139-1141. doi:10.1126/science.289.5482.1139b
- Drancourt M, Raoult D. 2005. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. *Nat Rev Microbiol* 3:23-35. doi:10.1038/nrmicro1063
- Farrell LE, Romant J, Sunquist ME. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol Ecol* 9:1583-1590. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.01037.x
- Foran DR, Minta SC, Heinemeyer KS. 1997. DNA-based analysis of hair to identify species and individuals for population research and monitoring. *Wildl Soc Bull* 25(4):840-847.
- Fugassa MH, Cicchino A, Sardella NH, Guichón RA, Denegri GM, Araujo A. 2007a. Nuevas fuentes de evidencia para la paleoparasitología y la antropología biológica en Patagonia. *Rev Arg Antrop Biol* 9(2):51-57.
- Fugassa MH, Sardella NH, Denegri GM. 2007b. Paleoparasitological analysis of a raptor pellet from Southern Patagonia. *J Parasitol* 93:421-422. doi:10.1645/GE-989R.1
- Fugassa MH, Sardella NH, Guichón RA, Denegri GM, Araujo A. 2008. Paleoparasitological analysis applied to skeletal sediments of meridional patagonian collections. *J Archaeol Sci* 35:1408-1411. doi:10.1016/j.jas.2007.10.006
- Fulton TL. 2012. Setting up and ancient DNA laboratory. En: Shapiro B, Hofreiter M, editores. *Ancient DNA. Methods and protocols*. New York: Human Press. p 1-12. doi:10.1007/978-1-61779-516-9_1
- Gilbert MTP, Menez L, Janaway RC, Tobin DJ, Cooper A, Wilson AS. 2006. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Sci Int* 156:208-212. doi:10.1016/j.forsciint.2005.02.021
- Gilbert MTP, Drautz DI, Lesk AM, Ho SYW, Qic J, Ratan A, Hsu CH, Sher A, Dalén L, Götherström A, Tomsho LP, Rendulic S, Packard M, Campos PF, Kuznetsova TV, Shidlovskiy F, Tikhonov A, Willerslev E, Iacumin P, Buigues B, Ericson PGP, Germonpré M, Kosintsev P, Nikolaev V, Nowak-Kemp M, Knight JR, Irzyk JP, Perbost CS, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan SH, Miller, Schuster SC. 2008a. Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proceed Natl Acad Sci USA* 105:8327-8332. doi: 10.1073/pnas.0802315105
- Gilbert MTP, Kivisild T, Gronnow B, Andersen PK, Metspalu E, Reidla M, Tamm E, Axelsson E, Götherström A,

- Campos PF, Rasmussen M, Metspalu M, Higham TFG, Schwenninger J, Nathan R, De Hoog C, Koch A, Moller LN, Andreassen C, Meldgaard M, Villems R, Bendixen CH, Willerslev E. 2008b. Paleo-Eskimo mtDNA genome reveals matrilineal discontinuity in Greenland. *Science* 320:1787-1789. doi:10.1126/science.1159750
- Henry P, Henry A, Russello MA. 2011. A noninvasive hair sampling technique to obtain high quality DNA from elusive small mammals. *J Vis Exp* 49:2791. doi:10.3791/2791
- Higuchi R, Von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature* 332:543-546. doi:10.1038/332543a0
- Hofreiter M. 2012. Nondestructive DNA extraction from museum specimens. En: Shapiro B, Hofreiter M, editores. *Ancient DNA. Methods and protocols*. New York: Human Press. p 93-100.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S. 2001. Ancient DNA. *Nat Rev Genetic* 2:353-359. doi:10.1038/35072071
- Petrigh RS, Fugassa MH. 2013. Molecular identification of a Fuegian dog belonging to the Fagnano regional Museum ethnographic collection, Tierra del Fuego. *Quaternary Int* 317:14-18. doi:10.1016/j.quaint.2013.07.030
- Pfeiffer I, Volkel I, Taubert H, Brenig B. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci Int* 141:149-151. doi:10.1016/j.forsciint.2004.01.016
- Rasmussen M, Li Y, Lindgreen S, Pedersen JS, Albrechtsen A, Moltke I, Metspalu M, Metspalu E, Kivisild T, Gupta R, Bertalan M, Nielsen K, Gilbert MTP, Wang Y, Raghavan M, Campos PF, Kamp HM, Wilson AS, Gledhill A, Tridico S, Bunce M, Lorenzen ED, Binladen J, Guo X, Zhao J, Zhang X, Zhang H, Li Z, Chen M, Orlando L, Kristiansen K, Bak M, Tommerup N, Bendixen CH, Pierre TL, Gronnow B, Meldgaard M, Andreassen C, Fedrova SA, Osipova LP, Higham TFG, Ramsey CHB, Hansen TVO, Nielsen FC, Crawford MH, Brunak S, Sicheritz-Pontén T, Villems R, Nielsen R, Krogh A, Wang J, Willerslev E. 2010. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463:757-762. doi:10.1038/nature08835
- Roques BA, Chavez C, Keller C, Magnusson WE, Palomares F, Godoy JA. 2011. Identification of Neotropical felid faeces using RCP-PCRS. *Mol Ecol Resour* 11:171-175. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02878.x
- Schneider PM, Seo Y, Rittner C. 1999. Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *Int J Legal Med* 112:315-316. doi:10.1007/s004140050257
- Subramanian S, Karthik T, Vijayaraaghavan NN. 2005. Single nucleotide polymorphism for animal fibre identification. *J Biotechnol* 116:153-158. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.10.015
- van Asch B, Albarran C, Alonso A, Angulo R, Alves C, Betancor E, Catanesi CI, Corach D, Crespillo M, Doutremepuich CH, Estonba A, Fernandes AT, Fernandez E, Garcia AM, Garcia MA, Gilardi P, Gonçalves R, Hernandez A, Lima G, Nascimento E, De Pancorbo MM, Parra D, Pinheiro MF, Prat E, Puente J, Ramirez JL, Rendo F, Rey I, Di Rocco F, Rodriguez A, Sala A, Salla J, Sanchez JJ, Sola D, Silvam S, Pestano Brito JJ, Amorim A. 2009. Forensic analysis of dog (*Canis lupus familiaris*) mitochondrial DNA sequences: an inter-laboratory study of the GEP-ISFG working group. *Forensic Sci Int: Genetics* 4:49-54. doi:10.1016/j.fsigen.2009.04.008
- Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Koehler TD, Wilson AC. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(23):9350-9354. doi:10.1073/pnas.86.23.9350
- Weinstock J, Shapiro B, Prieto A, Marin JC, Gonzalez BA, Gilbert MTP, Willerslev E. 2009. The Late Pleistocene distribution of vicuñas (*Vicugna vicugna*) and the "extinction" of the gracile llama (*Lama gracilis*): new molecular data. *Quat Sci Rev* 28:1369-1373. doi:10.1016/j.quascirev.2009.03.008