

Laura Parducci^{1,2} och Keith Bennett¹

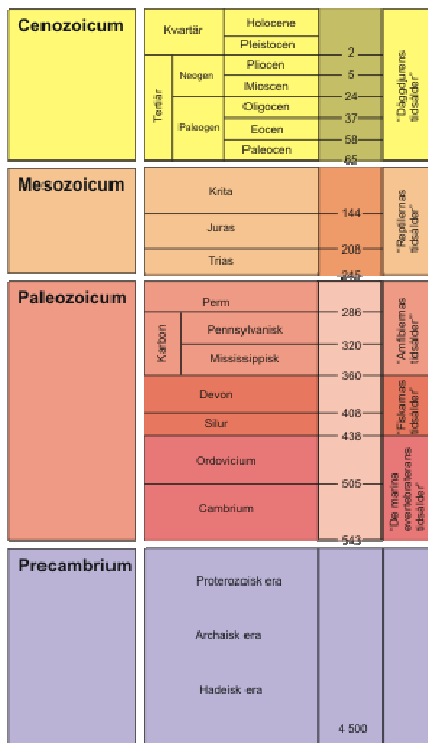
¹Palaeobiologiprogrammet, Institutionen för geovetenskaper, Uppsala Universitet

²Naturvårdsbiologi och genetik, Institution för Ekologi och Evolution, Evolutionsbiologiskt centrum (EBC), Uppsala Universitet

Fossil DNA-forskning

Fossil DNA-forskning kan brett definieras som studier av DNA extraherat från fossila lämningar av växter eller djur. Tiden som omfattas är vid och kan innefatta studier av levande populationer genom insamling av hår, exkrementer eller frön, liksom studier av museala samlingar, arkeologiska fynd och fossila lämningar från sen kvartärtid; de senaste 100 000 åren (Figur 1), men också fossil som är mer än en miljon år gamla.

Fossil DNA-forskning startade helt nyligen genom tillkomsten av nya tekniker som gjorde det möjligt att snabbt kunna masskopiera och sekvensera DNA. I dag är rapporter och analyser av exemplar från hundratals upp till tusentals år gamla DNA-prover nästan vardagliga. Som vi ska se, behöver molekylärbioologer undvika många fallgropar för att kunna gå tillbaka i tiden och vara säkra på att resultaten är riktiga.



Figur 1. Geologisk tidsskala Omritad och översatt från: <http://cronopio.geo.lsa.umich.edu/%7Ecr/b/>

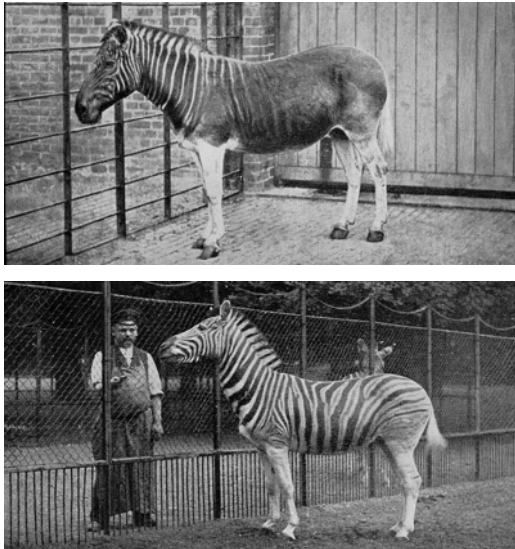
Historien om fossilt DNA började för tjugo år sedan

Den första rapporten om fossilt DNA kom 1984 när DNA extraherades för första gången från en fossilrest av en kvagga, en zebraart som varit utdöd sedan slutet av artonhundratalet [1] (Figur 2). Ett år senare, 1985, kom en andra viktig rapport. Denna gång var DNA extraherat från en egyptisk mumie som fanns i en museisamling [2]. Det som gjorde dessa DNA sekvenser speciella var att de hade erhållits från 140 och 2 400 år gamla fossil genom användning av en kloningsteknik (Figur 3), som krävde relativt stora mängder av ursprungligt DNA för sekvensering. Rapporten om den egyptiska mumien var också spektakulär, eftersom längden av det klonade DNA fragmentet var exceptionellt (3 400 nukleotider) och innebar att långa DNA molekyler kunde bevaras intakt under mer än 2 000 år.

Några år senare med tillkomsten av PCR tekniken (Polymerase Chain Reaction) var det möjligt att snabbt amplifiera (masskopiera) DNA sekvenser från endast några få molekyler utan att behöva använda kloningsteknik. Således hade behovet av stora mängder av ursprungligt DNA i fossila prov minskat betydligt.

Några av de första studierna som rapporterades om framgångsrik extraktion och amplifiering av mycket gammalt DNA, genom att använda PCR teknik, kom från fossila avlagringar i norra Idaho i Nordamerika.

KORRESPONDENS TILL
 Laura Parducci
 Uppsala Universitet
Laura.Parducci@ebc.uu.se



Figur 2. En bild av en kvagga tagen på London Zoo år 1870 (det är ett av bara fyra fotografier av en levande kvagga som finns bevarade)(överst), och en bild av en modern Burchells zebra (nederst).

Analys av mitokondrie- DNA har visat att kvaggan (*Equus burchelli quagga*) inte var en separat art av zebra, utan en underart av Burchells zebra (*Equus burchelli*).

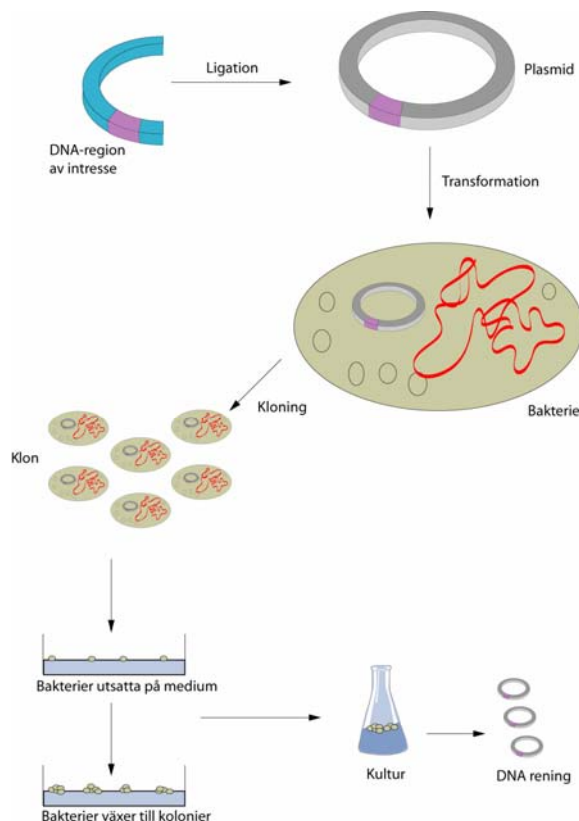
Kvaggan fanns förr i södra Afrika och, liksom andra gräsätande däggdjur, jagades den hänsynslöst för kött och läder av de sydafrikanska farmarna. De sågs som konkurrenter till tamdjuren, främst får och getter.

Foto från Brehm, A. Djurens Liv, 4:e upplagan, band 2, Stockholm 1924.

Dessa avlagringar, kända som "Clarkia bäddarna", består av en exponerad svit av sediment i en insjö daterad från tidig Miocene (mellan 17 och 20 miljoner år gamla). Bland dessa studier finns en rapport från 1990 av DNA återvunnet från bladdelar av en magnoliaart [3]. De funna bladen var synbart i utmärkt bevarat tillstånd och visade en tydlig cellstruktur. Anmärkningsvärt visade de också närvaron av intakta kloroplaster (organeller som finns i cytoplasman och ansvarar för fotosyntesen) i ett särdeles väl bevarat tillstånd. Det var från dessa organeller som det var möjligt att extrahera DNA. Två år senare lyckades en annan grupp forskare extrahera DNA från en miocen *Taxodium* (cypress), också den från Clarkia bäddarna. [4]. Uppenbarligen gav det här andra lyckosamma försöket stöd åt det resultat

som uppnått med magnolia bladen. Båda dessa pionjärstudier var genomförda utan PCR kontroller (Box 1) och senare försök att återskapa dessa resultat har misslyckats, vilket gjorde att starka tvivel restes på trovärdigheten av dessa tidigare arbeten. Trots detta, bröt magnoliastudien miljonårsbarriären och forskare vände vid denna tidpunkt sin uppmärksamhet mot mer karismatiska organismer som dinosaurier eller växter och djur bevarade i bärnsten. Dessa studier kulminerade 1994 med en rapport om en dinosauries mitokondriella DNA sekvens isolerad från delvis förkolnat material från ett fynd i ett kollager i Idaho [5].

I dag ifrågasätts dessa miljoner år gamla DNA sekvenser och det verkar nu mer troligt att de är artefakter från kontaminerat modernt DNA.



Figur 3. Kloning

- Isolering av DNA-fragment som skall klonas.
- Insättning av DNA-fragmentet i en plasmid (ligering).
- Introduktion av plasmiden i bakterie-celler (transformation).
- Replikation (kopiering) av den insatta plasmiden tillsammans med cellens egen kromosom samt överföring till avkomma (kloning).
- Selektion av de celler som tagit upp det främmande DNA:t genom att screena efter en markör-gen (vanligen antibiotika resistens).
- Upprening av plasmid DNA från bakteriecellerna.

Box 1

Forskning om fossilt DNA innebär extremt tekniska svårigheter, på grund av att det återstår mycket små mängder och lätt nedbrytbart DNA. Det är dessutom en mycket stor risk för kontaminering. Behovet av reproducerbara resultat framkom tydligt då i mitten på 1990-talet en serie välkända studier visade sig inte kunna återupprepas. Till exempel det DNA som ansågs komma från en dinosaurie [5] var i själva verket en förorening från en mänsklig mitokondriegen. Under följande år har nedanstående kriterier utvecklats och börjat tillämpas av de flesta forskare som arbetar med fossilt DNA.

Fysiskt isolerad arbetsplats. För att undvika kontaminering är det innan PCR processen påbörjas, väsentligt att all forskning med fossilt DNA utförs vid härför avsedd isolerad miljö.

Kontrollerat mångfaldigande. Flera extraktioner och PCR kontroller måste göras för att upptäcka sporadiskt eller i litet antal förekommande föroreningar.

Riktigt molekylärt beteende. Effektiviteten av massproduktionen av PCR produkter skall vara omvänt proportionell till produktens storlek (stora PCR produkter skall vara svårare att erhålla). Avvikelser från dessa förväntade resultat skall förklaras. Sekvenser skall vara fylogenetiskt rimliga.

Reproducerbarhet. Resultat skall kunna upprepas på samma art men med olika DNA extrakt från denna.

Kloning. PCR sekvenser måste verifieras genom kloning av mångfaldigade produkter för att bestämma förhållandet mellan endogena (härstammande från fossil) och exogena (härstammande från annat DNA – kontaminerat) sekvenser liksom fel som införts genom skada i fossilt DNA, och mångfaldigats i PCR-maskinen.

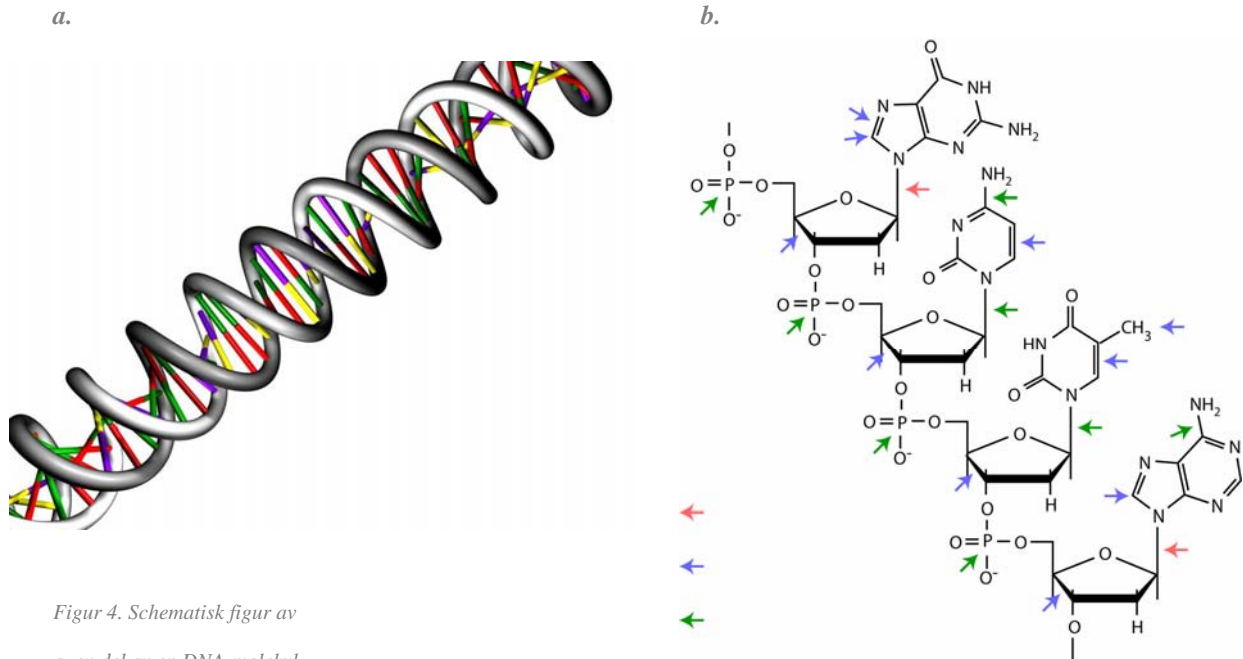
Oberoende replikation. Kontaminering i laboratoriet kan endast undanröjas om olika prover extraheras och sekvenseras i flera oberoende laboratorier. Detta är särskilt viktigt när man hanterar kvarlevor efter människor eller vid nya, oväntade resultat.

Biokemisk stabilitet. Indirekta bevis för kvarvarande DNA hos en art kan man få genom uppskattning av den totala mängden, uppbyggnaden och relativa förändringen hos andra makromolekyler som finns i fossilet.

Kvantifiering. Det totala kopiaantalet av den studerade DNA sekvensen skall uppskattas genom användning av Real Time-PCR (en nyligen utvecklad variant av PCR, som används för kvantitativa ändamål, där maskinerna kan visa och följa bildandet av antal molekyler allteftersom processen framskrider). När antalet ursprungsmolekyler vid startögonblicket är lågt (<1 000), kan det vara omöjligt att utesluta kontaminering, speciellt om man sysslar med studier av DNA från människa.

Associerade lämningar. Vid studier av mänskliga kvarlevor där kontaminering är speciellt problematisk, är det ett påtagligt stöd om liknande DNA sekvenser överlever i associerat faunistiskt material.

Från Cooper och Poinar 2000 [13].



Figur 4. Schematisk figur av

a. en del av en DNA-molekyl

b. ett kort segment av ena halvan av en DNA-molekyl med de fyra baserna och vanliga angreppspplatser.

Röd pil visar den vanligaste platsen för skador (depurinerings), blå pil visar plats för oxidativ skada, grön pil visar plats för hydrolytisk attack.

Omritat efter: Hofreiter et al. 2001[14]

Hur DNA-molekyler bryts ner

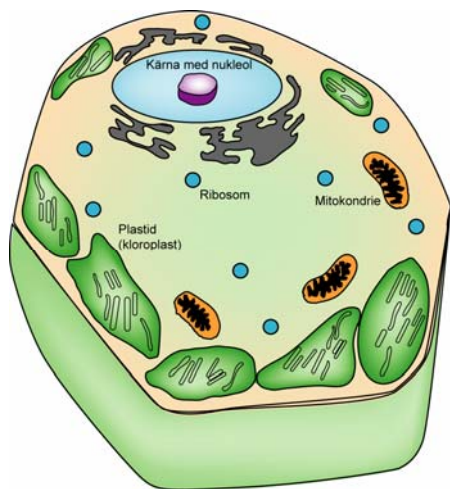
Ett av de viktigaste argumenten mot de miljongamla DNA sekvensernas riktighet, gäller tvivel över DNA molekylens förmåga att bevaras intakt under en så lång tid. Man har visat att när en organism dör, börjar endogena enzymer, *nukleaser*, som vanligen finns i en cell, att bryta ner DNA molekyler (Figur 4). Dessutom, kommer DNA molekyler att utsättas för angrepp från olika sorters svampar och bakterier som finns i omgivningen och som livnär sig på att bryta ner makromolekyler. Under gynnsamma omständigheter, som snabb uttorkning, hög saltkoncentration eller låg temperatur, kan dock *nukleaserna* själva inaktiveras innan alla DNA molekyler, som finns i den döda organismen, blir nedbrutna till mononukleotider. Även under sådana omständigheter kommer dock långsamma processer som oxidation och hydrolys att angripa DNA, vilket slutligen leder till dess försvinnande. Om, till exempel, organismer är bevarade under en lång tid i en syrerik miljö, kommer oxidationen att modifiera kvävebaser och ryggraden av socker-fosfat i DNA. Likaså kan i närvaro av vatten, deaminering, depurinering och andra hydrolytiska processer leda till att DNA molekyler bryts ned eller blir instabila. Slutresultatet blir att långa DNA sekvenser reduceras till kortare – mellan 100 och 500 nukleotider långa – och, efter ytterligare lång tid blir den samlade skadeeffekten så omfattande att inga intakta molekyler återstår i vävnaden, med en oersättlig förlust av nukleotidinformation. PCR har gjort möjligt en viss chans att rädda de sista informationsbitarna som finns kvar i prover där nedbrytningen av DNA ännu inte är fullständig, genom att mångfaldiga miljoner kopior av de korta DNA bitar som finns kvar och därefter sekvensera dem.

Man har beräknat att under normala förhållanden (fysiologisk saltkoncentration, neutralt pH och temperatur omkring 15°C) tar det omkring 100 000 år för att hydrolys skall totalförstöra alla DNA molekyler som finns i cellerna hos en fossil organism. Omgivningar med låga temperaturer och torra förhållanden kan utsträcka tiden upptill fyra eller fem gånger och t o m mer i exceptionella fall, medan omgivningar med motsatta förhållanden kommer att minska den. Man kan därför anta att möjligheten att återvinna DNA sekvenser äldre än 100 000 år är liten och i de flesta fall omöjlig.

Vad kan man åstadkomma med fossilt DNA?

Även med den begränsade tidsperioden på omkring 100 000 år, så är de evolutionära frågor som kan ställas många, och DNA informationen från prov från senkvartär har nyligen gett nya insikter om flera evolutionära processer hos många högre organismer som växter och djur men också hos virus och bakterier.

Vanligen är det karaktären på en evolutionär fråga som bestämmer vilka gener man skall inrikta sig mot i den



Figur 5. Förenklad bild av en växtcell (en djurcell saknar plastider) med några inre strukturer.

genetiska studien. Olika gener i samma organism utvecklas i olika takt. Om evolutionsstudien omfattar genetiska förändringar under tiotusentals år, så är en gen som utvecklas långsamt lämplig. Å andra sidan, om studien omfattar en kortare tidsperiod krävs gener som utvecklas snabbare.

Hos högre organismer finns det tre olika typer av genom som man kan inrikta sig mot: mitokondrie-DNA (mtDNA), plastid-DNA (cpDNA) och kärn-(nukleärt) DNA (nDNA). Mitokondrier och plastider (eller kloroplaster) är organeller som finns i cellernas cytoplasma som har eget DNA i form av många cirkulära molekyler (Figur 5). Mitokondrier är ansvariga för den aeroba respirationen och finns i både växt- och djurceller, medan plastider är specifika för växtceller och kontrollerar födotillverkningsprocesser, lagring och fotosyntes. DNA från dessa båda organeller har i stor utsträckning använts vid studier av fossilt DNA, eftersom de finns i hundratals kopior i varje cell, vilket dramatiskt ökar möjligheten att finnas kvar i fossil. Båda DNA-typerna ärvs från endast en förälder (direkt och oförändrat från förälder till avkomman), vilket medför relativt enkla tolkningar av evolutionära data. Nackdelen är att mtDNA från växter förändras mycket långsamt – i några fall kan mutationshastigheten vara 100 gånger långsammare än för djurens mtDNA. Av denna orsak visar mtDNA från relativt unga arkeologiska fynd, till exempel från frön i avlagringar som inte är mer än 2 000 år gamla, inte någon väsentlig förändring när närbesläktade organismer jämförs. Vid studier av växter föredrar man därför att undersöka cpDNA, som har en snabbare förändring än mtDNA. Slutligen har nDNA, som finns i kärnan som kromosomer, en mycket snabbare evolution än DNA från mitokondrier och plastider och är därför mycket värdefull för evolutionsstudier mellan nära besläktade arter under kortare tidsperspektiv. Tyvärr finns det en ökad risk när man använder nDNA, att man får felaktiga resultat när PCR tekniken används, eftersom nDNA endast finns i en kopia per cell. Av denna anledning används nDNA sällan vid undersökningar av fossila prov.

Djurstudier

Under den senaste tiden har många studier av äldre DNA molekyler, som är utvunna från icke-mänskliga kvarlevor, gjort det möjligt att gå tillbaka i tiden cirka 100,000 år och studera de fylogenetiska sambanden mellan utdöda djur och deras nu levande släktingar. Undersökning av mtDNA från två utdöda moaarter från Nya Zeeland har t ex visat att de var mer besläktade med icke-flygande fåglar i Australien (emuer och kasuarer) än med nu levande kiwis på Nya Zeeland [6]. Härav framgår att icke-flygande fåglar har koloniserat Nya Zeeland åtminstone två gånger.

På samma sätt har man visat genom mtDNA undersökningar att den utdöda australiska pungvargen är mer

besläktad med andra pungdjur i Australien än med köttätande pungdjur i Sydamerika [7]. En viktig slutsats av detta är att de morfologiska drag som pungvargarna delar med de sydamerikanska pungdjuren har utvecklats oberoende av varandra på två olika kontinenter (konvergent evolution).

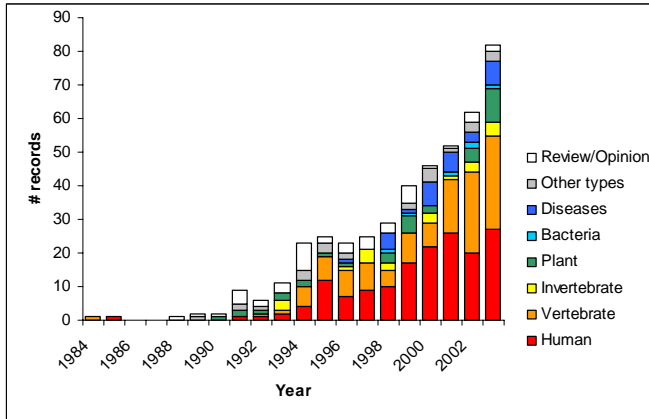
Nu är det också möjligt att ställa genetiska frågor på populationsnivå, mellan individer av samma art inom en population, med användande av fossilt DNA. Så har mtDNA-sekvenser från lämningar av grottbjörnar (en död björnart som levde i Europa och i västra Asien för 10 000 år sedan) från många grottor i Europa studerats [8]. När deras DNA jämfördes med de två huvudlinjerna av nu levande brunbjörnar i Europa, fann man att grottbjörnarnas utvecklingslinjer hade avskiljts för cirka 1.2 miljoner år sedan, långt innan brunbjörnarna hade utvecklats. Dessutom var diversiteten mellan grottbjörnar mindre än den nu är mellan brunbjörnar, vilket troligen innebär att de förra levde på mer begränsade landområden än sina nutida släktingar.

Ett annat exempel på denna typ av studier kommer från en grupp forskare, som nyligen undersökt 6 000 år gammalt DNA från Adelie pingviner på Antarktis, och kunnat visa hur fort evolutionsförändringar uppträdde i mtDNA hos dessa fåglar [9]. De stora kolonier i vilka dessa pingviner lever har funnits under tusentals år med samma fågelart som med sin avkomma återvänder till samma plats år efter år. Som ett resultat av denna livsstil, finns det i kolonierna lager av ben som har varit frysta i tusentals år. Fossila benrester från olika lager daterades och blodprover togs från levande fåglar på samma plats. Ur dessa prov analyserade forskarna en kort mtDNA sekvens och räknade skillnaderna mellan de äldre och de nya proven. Från detta beräknades hastigheten av evolutionsförändringar som fanns i specifika mtDNA regioner av pingvinernas mtDNA.

Neanderthalstudier

Neanderthalare var hominider som befolkade Europa och västra Asien från cirka 300 000 år sedan fram tills de försvann för cirka 30 000 år sedan. Genom att undersöka fossil och kulturlämningar har paleontologer länge argumenterat för att neanderthalaren väsentligt bidragit med genetisk information till den moderna människan, som anlände senare, och som alltså då skulle varit en förfader till moderna europeer. När man idag uttolkar tidigare fossila data visar det sig att den moderna människan i stället ersatte neanderthalaren när hon kom till Europa för ungefär 40 000 år sedan. Analyser från gammalt DNA bekräftar denna hypotes. En mtDNA sekvens som bestämdes från en neanderthalare som man hittat 1856 i Neanderdalen i Västtyskland visade att hon inte var direkt besläktad med den moderna människan [10]. Istället har släktgrenen som ledde till neanderthalaren divergerat från stamträdet för

cirka 500 000 år sedan, medan den gemensamma stamfadern till alla moderna människor levde för 170 000 år sedan. Resultaten från denna DNA undersökning visade att neanderthalarna dog ut utan att överföra något av sitt DNA till den moderna människan. Hypotesen att den moderna människans ursprung var i Afrika och att det var mycket lite genetisk inflöde från arkaiska människor ("out of Africa" teorin) är troligen korrekt åtminstone om man tittar på de uppgifter som framkommit genom undersökningar av mtDNA.



Tyvärr är studier av DNA från gamla människokvarlevor ytterst svåra att utföra, eftersom kontamination av DNA från den moderna människan är svår att undvika. Om några neanderthalare bar på mtDNA sekvenser som mycket liknade den moderna människans skulle man kanske felaktigt betrakta dessa sekvenser som kontamination från den moderna människan.

Figur 6. Antal publikationer mellan 1983 och 2004. Informationen hämtad från en allmän databank (Institute for Scientific Information (ISI) Web of Science) och med "ancient DNA" som sökord och kategoriserat efter organismer. Från Gugerli et al. [15]

Växtstudier

Det finns endast få exempel på studier av fossilt DNA från växter i publicerad litteratur (Figur 6). Till viss del är detta orsakat av att det fordras mycket speciella förhållanden för att bevara DNA i växtvävnader, men också beroende på att väl bevarade hårda fossila vävnader som trä är ovanliga i jämförelse med djurben. Det kan också helt enkelt bero på att utdöda djur som dinosaurier, mammutar och även neanderthalare är mer karismatiska än växter. Inte desto mindre har under de senaste tjugo åren ett flertal fossila växtlämningar med DNA erhållits från herbarier, arkeologiska fynd, sjösediment, torv, grottor, fossila avlagringar, koproliter och bärnsten.

De första rapporterna kom på 1990-talet när DNA sekvenser från magnoliablåd, som nämnts ovan, daterade miljoner år bakåt i tiden, publicerades. Under följande år följdes dessa tidiga rapporter av ett flertal studier om DNA som extraherats ur växtvävnader inneslutna i bärnsten. Bärnsten är fossiliserad kåda producerad i huvudsak från barrträd och utgör ett hållbart och viktigt medium för bevarande av växt och djurfossil (Figur 7). När kådan bildas är den klabbig och varje djur eller växtfragment - mindre blommor, blad, frön och små insekter - som faller ner i det fastnar. Processen är snabb och effektiv och partiklar som fastnat blir bevarade i torkat tillstånd. Vanligast är inneslutna insekter (86,7 %) och spindeldjur (11,6 %), medan andra djur endast förekommer i 1,7 % och växter i 0,6 % av fallen. Fossila blad inneslutna i kåda som daterats från Oligocene – mellan 24 och 34 miljoner år gamla - har hittats på ett flertal lokaler i Europa och i ett fall lyckades forskare att extrahera DNA från växtrester i fossil

kåda funna i en gruva i La Toca i Dominikanska Republiken. Tyvärr, eftersom man inte tror att DNA kan bevaras i miljontals år, vilket förklarats tidigare, har majoriteten av dessa resultat ifrågasatts och man tror nu att det handlar om artefakter, DNA som kontaminerats av modernt DNA.



Figur 7. Organismer inneslutna i bärnsten.
Foto Elisabeth Strömberg.

Andra ovanliga fynd från yngre växt fossil – upptill 40 000 år gamla – är fynd som gjorts i gödselhögar i torra områden i sydvästra Nordamerika, i Mellanöstern och i Sydafrika. Dessa gödselhögar som ger skydd åt djur, består av växtmaterial som de samlat ihop och som inneslöt i kristalliserat urin. Denna kristalliserade urin i kombination med extrem torka har resulterat i exceptionellt hållbart material. Extraktion ur detta växtmaterial är enkelt att utföra och forskare har nu försökt isolera DNA och andra makromolekyler med uppmuntrande resultat.

Permafrost är också en god bevarande miljö för DNA, eftersom kemiska reaktioner sker långsamt i kyla. Nyligen har ett forskarteam extraherat DNA ur organiskt material från sibiriskt permafrost sediment och identifierat 19 olika angiospermer, gymnospermer och mossor, liksom DNA från åtta olika djurarter, några av dem utdöda [11]. Inledningsvis letade forskarna endast efter bakteriellt DNA, men de blev snart överraskade av att finna DNA fragment från växt- och djurorganismer i torvprover, som inte visade några tecken på att de innehöll makrofossiler. Det viktiga resultatet av denna studie var att sibirisk torv innehöll det man nu tror är den äldsta tillförlitliga fossila DNA från växter – cirka 400 000 år gamla. Växt DNA från dessa permafrostområden visade att trakten som kallas Beringia och sträcker sig mellan östra Sibirien och västra Alaska, en gång var en vegetationsrik stäpp snarare än en tunn-sådd polartundra. Resultaten visade också att gräset minskade från 36 % till 3 % efter cirka 11 000 år, vilket stämmer med hypotesen att det var klimatförändringar som spelade en viktig roll vid massdöden av mammutar, marklevande sengångare och andra stora nordamerikanska däggdjur, som fanns vid denna period. Det finns dock andra förklaringar till samma data.

Slutligen, ett nyckelområde för forskning där studier av fossila växters DNA visat sig särskilt löftesrika, är studier av odlade växter. Det finns många rapporter om framgångsrikt isolerat fossilt DNA ur arkeologiska rester av odlade växter. Arkeologiska utgrävningar är i själva verket rika källor av relativt välbehållet och väldaterat fossilt material, vanligen inte mer än några tusen år

gammalt. Dessa studier har lämnat viktiga bidrag till förståelsen av den ursprungliga jordbrukskulturen och dess spridning och hur växter har domesticerats och utvecklats. Man har fått vissa tecken som tyder på att fossila arter av majs (*Zea mays*) cirka 4 500 år gamla, var lika diversa som den nutida majsen, och att det var ett antal genetiska linjer från åtskilliga vilda populationer av *Zea mays* som bidrog till att bilda vår tids majs. Resultatet av den här studien tillbakavisar den tidigare uppfattningen, grundad enbart på arkeologiska fynd, att utvecklingen of vårt modernt odlade majs var en enstaka isolerad händelse [12].

Hur tillförlitliga är fossila DNA sekvenser?

Som beskrivits ovan, är amplifiering av fossilt DNA förknäat med problem med PCR tekniken. Risken att förörena provet med annat DNA, när man arbetar med korta fragment av DNA är stor. Med frågor som härrör från oförmågan att reproducera resultaten från tidigt 1990-tal från miljontals år gamla DNA sekvenser och med tveksamheter angående DNA molekylen's hållbarhet, är det inte förvånande att mycket av den forskarpotential som finns rörande fossilt DNA ännu inte utnyttjats, och att relativt få studier kommit till stånd.

Trots detta har genom studier av yngre fossilt DNA, som vi sett, forskningen visat sig oerhört värdefull. Studier av fossilt DNA från museers samlingar, arkeologiska fynd och senkvartära fynd har gett nya vinklingar till många organismers evolution och dragit till sig uppmärksamhet. Många outnyttjade tillfällen till studier av fossilt DNA inte bara från växter och djur utan också från bakterier och virus bör kunna locka till sig många forskare.

Just nu kan fossila DNA sekvenser extraheras relativt lätt från växt- och djurdelar som samlats och är väl bevarade och lagrade under kontrollerade former i museer under de senaste 200 åren. Men för äldre arkeologiska och paleontologiska lämningar – upp till 100 000 år – är dessa studier långt ifrån lätta. Om strikta kriterier för äkthet och kontroll av experiment inte är uppfyllda, väntar många tekniska fallgropar och i detta spännande område för forskning kan då dess resultat ifrågasättas redan på förhand. Masskopieringen av DNA med hjälp av PCR metoden är oerhört effektiv, så även om all tänkbar försiktighet vidtas, kan det lätt bli felaktiga resultat. Detta är i synnerhet påtagligt vid studier av t.ex. mänskligt DNA.

Några få och mycket nedbrutna DNA molekyler finns kvar i fossil vävnad medan däremot DNA från nu levande organismer finns överallt i omgivningen, både inom och utanför laboratoriernas väggar. Därför måste man vara mycket uppmärksam så att man undviker främmande DNA i PCR preparationer. Extraktioner och preparationer för PCR måste utföras i särskilda lokaler avsedda för studier av fossilt DNA och fysiskt skilda från

byggnader i vilka man arbetar med nutida DNA. Dessutom måste ett antal försiktighetsåtgärder följas och ingå i rutinerna, som behandling av utrustning med blekmedel, UV-strålning och användning av skyddskläder och ansiktsmask - särskilt när man arbetar med mänskliga kvarlevor. Ett antal kriterier för hur äktheten skall kunna garanteras vid forskning med fossilt DNA har nyligen publicerats [13] (Box 1).

Referenser

1. Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A., and Wilson, A. C. (1984) DNA sequences from the Quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312 282-284.
2. Paabo, S. (1985). Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314 644-645.
3. Golenberg, E.M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D. and Zurawski, G. (1990) Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. *Nature* 344 656-658.
4. Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Smiley, C.J. (1992) A rbcL sequence from a Miocene Taxodium (bald cypress) *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA.* 89 449-451.
5. Woodward S.R., Weyand N.J. and Bunnell M. (1994) DNA-sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* 266 1229-1232.
6. Cooper A., Lalueza-Fox C., Anderson S., Rambaut, A., Austin, J, and Ward, R. (2001) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409 704-707.
7. Thomas, R. H., Schaffner, W., Wilson, A. C. and Pääbo, S. (1989). DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340 465-467.
8. Loreille, O., Orlando, L., Patou-Mathis, M., Philippe, M., Taberlet, P. and Hänni, C. (2001) Ancient DNA analysis reveals divergence of the cave bear, *Ursus spelaeus*, and brown bear, *Ursus arctos*, lineages. *Current Biology* 11 200-203.
9. Lambert D.M., Ritchie P.A., Millar C.D, Holland, B., Drummond, A.J. and Baroni, C. (2002) Rates of evolution in ancient DNA from Adélie penguins. *Science* 295 2270-2273.
10. Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M. and Pääbo, S. (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90 19-30.
11. Willerslev E., Hansen A.J., Binladen J., Brand, T.B., Gilbert, M.T., Shapiro, B., Bunce, M., Wiuf, C., Gilichinsky, D.A. and Cooper, A. (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300 791-795.
12. Goloubinoff P., Pääbo S. and Wilson A.C. (1993) Evolution of maize inferred from sequence diversity of an ADH2 gene segment from archeological specimens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90 1997-2001.
13. Cooper A. and Poinar H.N. (2000) Ancient DNA: Do it right or not at ALL. *Science* 289 1139-1139.
14. Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M. and Pääbo, S. (2001) Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2 353-359.
15. Gugerli, F., Parducci, L. and Petit, R. J. Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytologist*. In press.
16. A paleobotanists dream in amber
<http://www.ambergallery.com/>

Andra intressanta länkar för lärare

Animering av PCR

<http://www.dnalc.org/Shockwave/pcranwhole.html>

Förståelse för evolutionen

<http://evolution.berkeley.edu/>

The Talk. Origin archive – Exploring the creation/evolution controversy

<http://www.talkorigins.org/>

Evolution – A journey into where we're from and where we are going

<http://www.pbs.org/wgbh/evolution/index.html>

Paleontologi

<http://www.ucmp.berkeley.edu/>

Översättning från den engelska artikeln

Tore Fredriksson