

Bioarqueología para recuperar aromas de plantas extintas - Revisión

Gabriel Dorado ¹, Fernando Luque ², Plácido Pascual ³, Inmaculada Jiménez ⁴,
Francisco Javier S. Sánchez-Cañete ⁵, Patricia Raya ⁶, Jesús Sáiz ⁷, Adela Sánchez ⁷,
Teresa E. Rosales ⁸, Víctor F. Vásquez ⁸, Pilar Hernández ⁹

¹ Autor para correspondencia, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), eMail: <bb1dopeg@uco.es>; ² Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; ³ Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; ⁴ IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; ⁵ EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); ⁶ Dep. Radiología y Medicina Física, Unidad de Física Médica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁷ Dep. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal, s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁸ Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, Apartado Postal 595, Trujillo (Peru); ⁹ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba.

Resumen

La unión de la arqueología clásica con la biología, en general, y la biología molecular, en particular, está alcanzando objetivos que eran considerados imposible hace tan solo unos años. Ello ha sido posible gracias a el desarrollo de tecnologías como la secuenciación de ácidos nucleicos de primera, segunda y tercera generación. Entre los retos de la bioarqueología se encuentra la des-extinción de especies antiguas. Ello representa grandes retos tecnológicos. Los aspectos éticos y costes excesivos también deben tenerse en cuenta. Hasta el momento, ha sido posible clonar genes antiguos, como los que codifican aromas de plantas extintas. Estas incluyen el arbusto de piña Wynberg (*Leucadendron grandiflorum*), el hibisco de montaña de Maui (*Hibiscadelphus wilderianus*) y el guisante escamoso de las Cascadas de Ohio (*Orbexilum stipulatum*). De este modo, la biología sintética ha sido explotada para clonar genes codificantes de enzimas que catalizan la biosíntesis de moléculas aromáticas, como los terpenos. Han sido expresados en levaduras, produciendo fragancias antiguas. Esto es, nada más y nada menos que un ejemplo excitante del potencial de esta tecnología.

Palabras clave: avivamiento, resurrección, ADN antiguo, ADNa, bioinformática, Parque Jurásico.

Abstract

The union of classical archaeology with biology, in general, and molecular biology, in particular, is reaching goals that were considered impossible just a few years ago. That has been possible thanks to the development of technologies like first-, second- and third-generation sequencing of nucleic acids. Among bioarchaeology challenges is de-extinction of ancient species. That represents huge technological challenges. Ethical issues and excessive costs should be also taken into consideration. So far, it has been possible to clone ancient genes, like the ones encoding scents from extinct plants. They include Wynberg conebrush (*Leucadendron grandiflorum*), Maui's mountain-hibiscus (*Hibiscadelphus wilderianus*) and Falls-of-the-Ohio scurfpea (*Orbexilum stipulatum*). Thus, synthetic biology has been exploited to clone genes encoding enzymes catalyzing biosynthesis of scent molecules, like terpenes. They have been expressed in yeasts, producing ancient fragrances. This is just an exciting example of the potential of this technology.

Key words: revivalism, resurrection, ancient DNA, aDNA, bioinformatics, Jurassic Park.

Introducción

La arqueología estudia restos antiguos y la bioarqueología los relacionados con entidades biológicas. Inicialmente, esos restos podrían estudiarse utilizando enfoques morfológicos y analíticos, incluidos los anatómicos, isotópicos, matemáticos y estadísticos. Afortunadamente, los avances tecnológicos en biología molecular han permitido grandes avances en este fascinante tema de investigación (Linderholm, 2016). Así, el desarrollo de la secuenciación de primera generación (FGS; del inglés, “First-Generation Sequencing”) permitió leer el ADN antiguo (ADNa) por primera vez. Eso se logró utilizando un enfoque de clonación molecular tradicional. De esta manera, se aisló un ADN y se ligó en el vector λ gt10. Dicho ADN recombinante se usó para transformar células de *Escherichia coli*, amplificándolas efectivamente in vivo (Higuchi et al, 1984). Sin embargo, esa es una metodología tediosa y lenta. Una amplificación de ADN in vitro, mucho más rápida y conveniente, se describió por primera vez con exquisito detalle más adelante (Kleppe et al, 1971; Panet and Khorana, 1974). Sin embargo, lo consideraron no viable, debido a las limitaciones metodológicas de la época. Afortunadamente, la misma metodología se reinventó y popularizó 14 años después, con el nombre de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, “Polymerase Chain-Reaction”). Fue erróneamente considerado como un artículo metodológico de baja relevancia y rechazado por la revista *Nature*, siendo finalmente aceptado y publicado en la revista *Science* (Saiki et al, 1985). Dicha tecnología permitió amplificar y secuenciar el ADNa de manera rápida y conveniente, sin requerir métodos previos de clonación molecular in vivo. Además, la secuenciación de segunda generación (SGS; del inglés, “Second-Generation Sequencing”) aumentó el rendimiento y redujo los precios finales, permitiendo la secuenciación de genomas antiguos por primera vez. Eso incluyó el de neandertal (Green et al, 2010). La secuenciación de tercera generación (TGS; del inglés, “Third-Generation Sequencing”) permite secuenciar moléculas individuales, sin necesidad de amplificación previa. Dicha revolución se ha aplicado para estudiar el ADN antiguo, como el aislado de un hueso de caballo del Pleistoceno (Orlando et al, 2011), y podría usarse potencialmente para secuenciar incluso el ARN antiguo (ARNa) (Dorado et al, 2007-2018).

Uno de los desafíos en bioarqueología es la llamada des-extinción (a veces llamada “avivamiento” o resurrección) de especies extintas. Esa es una tarea muy compleja, que implica enormes desafíos tecnológicos (O’Connor, 2015; Campagna et al, 2017; Corlett, 2017; Dorado et al, 2017; Iacona et al, 2017; McCauley et al, 2017; Robert et al, 2017; Shapiro, 2017; Steeves et al, 2017). También tiene implicaciones legales y éticas en algunos casos, incluidos riesgos ambientales como la pérdida de biodiversidad y problemas de bienestar animal, además de costes excesivos (IUCN/SSC, 2013; Seddon et al, 2014; Bennett et al, 2017; Wagner et al, 2017; Tanentzap y Smith, 2018). Hay diferentes pasos y enfoques en este tema general de traer algo del pasado a la vida. Eso incluye la clonación y expresión de genes antiguos (Thornton, 2004; Garcia and Kacar, 2019), como los que codifican aromas o fragancias de plantas extintas (Jacobsen, 2019).

Estrategias de clonación

Los equipos de laboratorio tradicionales requieren muchas moléculas para poder analizarlas. Hay varios métodos de clonación para alcanzar el objetivo de producción de moléculas. El primero se conoce como clonación molecular, como se describió anteriormente. Típicamente, involucra la generación de células procarióticas competentes, como las de *Escherichia coli* o *Lactobacillus* spp. Las

células eucarióticas también pueden transformarse, como *Pichia pastoris* y levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*). Además, las plantas pueden regenerarse a partir de una sola célula transformada utilizando *Agrobacterium* spp. Cuando las especies de plantas no pueden transformarse de esa manera, se pueden usar otras metodologías que involucran métodos de electroporación y biobalísticos o biolísticos (“pistola de genes”). En el caso de los animales, los fragmentos de ADN se pueden inyectar en las células para transformarlos. Las células somáticas pueden inmortalizarse y las células madre somáticas pueden diferenciarse. Las células germinales, como los óvulos, pueden producir un organismo completo. Estas estrategias de clonación in vivo tienen la ventaja adicional de permitir la caracterización de la expresión génica. Curiosamente, se mejoraron en gran medida y, a veces, incluso se reemplazaron con metodologías in vitro, como la PCR y la amplificación isotérmica. Redujeron el esfuerzo, tiempo y coste para producir una gran cantidad de las moléculas requeridas. De esta manera, ahora es posible amplificar fácilmente los fragmentos de ADN, incluidos los genes deseados de restos antiguos, siempre que se aislen de ellos ácidos nucleicos con suficiente calidad. De hecho, el umbral de detección para las metodologías de amplificación in vitro es de una molécula.

Especies de plantas extintas con aromas de interés potencial

Entre las especies de plantas extintas con fragancias de potencial interés se incluyen el arbusto de piña Wynberg (del inglés, “Wynberg conebush”; *Leucadendron grandiflorum*) de Sudáfrica, así como dos de los Estados Unidos de América (EUA): el hibisco de montaña de Maui (del inglés, “Maui’s mountain-hibiscus”; *Hibiscadelphus wilderianus*) de Hawái, y el guisante escamoso de las Cascadas de Ohio o raíz de cuero con estípula larga (del inglés, “Falls-of-the-Ohio scurfpea” o “largestipule leather-root”; *Orbexilum stipulatum*) de Indiana. El arbusto de piña Wynberg se extinguió en 1806 (figura 1).



Figura 1. **Arbusto de piña Wynberg.** © 2019 tonyrebelo, iNaturalist Network <<https://www.inaturalist.org>>, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

Por otro lado, el hibisco de montaña de Maui se extinguió más tarde, en 1912 (figura 2).



Figura 2. Hibisco de montaña de Maui. © 2019 Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany <<https://collections.nmnh.si.edu/search/botany/>>, iNaturalist Network <<https://www.inaturalist.org/>>, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org/>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org/>>.

Finalmente, el guisante escamoso de las Cascadas de Ohio era una leguminosa endémica de unos pocos islotes rocosos del río Ohio, que fueron anegados por presas en la década de 1920 (figura 3).



Figura 3. Guisante escamoso de las Cascadas de Ohio. © 2019 Charles Wilkins Short (The Philadelphia Herbarium at the Academy of Natural Sciences <<http://ph.ansp.org>>), Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

Clonación, expresión y caracterización de aromas de plantas extintas

La biología sintética puede ser explotada para traer del pasado fragancias de plantas extintas. Los especímenes antiguos suelen ser preciosos y escasos. Por lo tanto, generalmente suele disponerse de cantidades pequeñas para el proceso destructivo del aislamiento del ADN. Afortunadamente, las metodologías actuales permiten secuenciar cantidades pequeñas de ADN. De esta manera, es posible identificar genes que codifican enzimas que catalizan la biosíntesis de moléculas aromáticas, incluidos los terpenos (Priya et al, 2018), como las sintasas de sesquiterpenos (SQS; del inglés, "SesQuiterpene Synthases"). Sin embargo, el ADN antiguo suele estar degradado, por lo que puede que solo se generen secuencias cortas de ADN. Afortunadamente, algunos de estos genes de algunas especies vivas ya han sido secuenciados. De este modo, se pueden usar como referencia para

ensamblar las lecturas de secuencias de ADN en una secuencia continua no fragmentada (del inglés, “contig”, que es una contracción de “contiguous”), mediante flujos de trabajo bioinformáticos.

Eso debe permitir generar secuencias genéticas completas, sin huecos ni ambigüedades (en el mejor escenario). Desafortunadamente, esto no se esperará generalmente cuando se secuencia ADN. Ello es debido a la degradación física y química de los ácidos nucleicos (Allentoft et al, 2012; Dorado et al, 2013; Linderholm, 2016). Por lo tanto, los genes de referencia deben usarse para superar estos obstáculos. Posteriormente, los genes antiguos reconstruidos se generan químicamente con sintetizadores de ADN tradicionales (basados en reacciones químicas), o las nuevas y revolucionarias impresoras de ADN [como las basadas en reacciones bioquímicas, que utilizan enzimas transferasa terminal de desoxinucleótidos (TdT; del inglés, “Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase”), y se ligan a vectores de expresión. Los últimos pueden ser plásmidos, que se utilizan para transformar células procarióticas o eucariotas competentes, como se muestra arriba. Las células transformadas pueden multiplicarse y expresar genes clonados, biosintetizando moléculas de aromas. Estos pueden identificarse con diferentes métodos analíticos, como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) (Begnaud y Chaintreau, 2016) (figura 4).

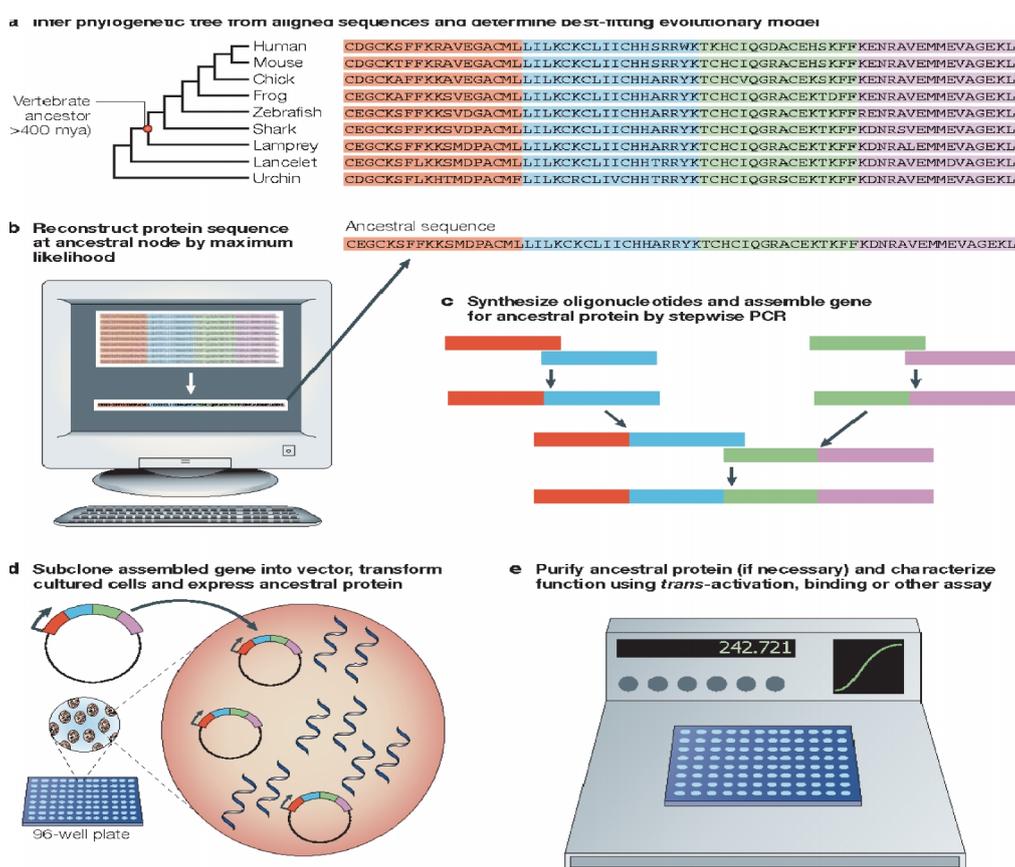


Figura 4. Clonación de genes antiguos. Si es posible, el ADN antiguo es secuenciado. Si se requiere, los genes antiguos son reconstruidos usando los de referencia de especies vivas. Los genes elegidos son sintetizados y clonados en microorganismos, que los expresan, produciendo proteínas antiguas. © 2019 Springer Nature Publishing (Thornton, 2004). Ver también ejemplo específico de clonación de genes de aromas en <https://static.scientificamerican.com/sciam/assets/Image/2019/saw0219Jaco31_d.png> (Jacobsen, 2019).

Consideraciones finales y perspectivas futuras

Recuperar las fragancias de plantas extintas es solo un ejemplo del poder de la bioarqueología, vinculando la arqueología con la biología, en general, y la biología molecular, en particular. Otros ejemplos pueden involucrar diversos genes de interés. Además, la posibilidad de secuenciar el ARNa (incluidos los transcriptomas antiguos) utilizando TGS es provocativa y emocionante. Lo más desafiante será dar vida a especies extintas. Actualmente se está trabajando para lograr tal objetivo con algunas especies (Dorado et al, 2017). Estas incluyen la paloma migratoria (*Ectopistes migratorius*) y el mamut lanudo (*Mammuthus primigenius*). Sin embargo, tal posibilidad ha generado inquietudes y preguntas, como se señala en las "Directrices para Reintroducciones y Otras Translocaciones para Fines de Conservación" (del inglés, "Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations", publicadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) <<https://www.iucn.org>> y Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) <<https://iucn-ctsg.org>>. Por ejemplo, la des-extinción puede considerarse un enriquecimiento ecológico que involucra la translocación para conservación. Por lo tanto, los riesgos asociados con la reintroducción de especies deben tenerse en cuenta, a fin de evitar candidatos reintroducidos inadecuados (IUCN/SSC, 2013; Seddon et al, 2014; Adams, 2017; Sandler, 2017a, b; Wagner et al, 2017; Browning, 2018; Novak, 2018; Tanentzap y Smith, 2018). De hecho, el ecosistema en el que tales especies se extinguieron (por ejemplo, Siberia con mamuts lanudos, hace miles de años) puede ser muy diferente del actual, con condiciones ambientales y especies distintas. Los posibles peligros de las des-extinciones se popularizaron con la novela de ciencia ficción *Parque Jurásico* (Crichton, 1990), adaptada por una franquicia de películas (Spielberg, 1993-2021), en relación a los dinosaurios y otros reptiles. Hoy sabemos que tal objetivo es ciencia ficción, ya que los ácidos nucleicos tan antiguos se degradan completamente más allá de la recuperación (Allentoft et al, 2012; Dorado et al, 2013; Linderholm, 2016). Pero se destaca este asunto de una manera entretenida, y así ha cautivado la imaginación de la gente durante décadas.

Agradecimientos. Financiado por Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto MINECO BIO2015-64737-R) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); Consejería de Agricultura y Pesca (041/C/2007, 75/C/2009 y 56/C/2010), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P11-AGR-7322 y P12-AGR-0482) y Grupo PAI (AGR-248) de Junta de Andalucía; y Universidad de Córdoba (Ayuda a Grupos), Spain.

Referencias Bibliográficas

- Adams WM (2017): Geographies of conservation I: De-extinction and precision conservation. *Progress Human Geography* 41: 534-545.
- Allentoft ME, Collins M, Harker D, Haile J, Oskam CL, Hale ML, Campos PF, Samaniego JA, Gilbert MT, Willerslev E, Zhang G, Scofield RP, Holdaway RN, Bunce M (2012): The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proc Biol Sci* 279:4724-4733.
- Begnaud F, Chaintreau A (2016): Good quantification practices of flavours and fragrances by mass spectrometry. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 374: 20150365 (14 pp).

- Bennett JR, Maloney RF, Steeves TE, Brazill-Boast J, Possingham HP, Seddon PJ (2017): Spending limited resources on de-extinction could lead to net biodiversity loss. *Nat Ecol Evol* 1:53 (4 pp).
- Browning H (2018): Won't somebody please think of the mammoths? De-extinction and animal welfare. *J Agr Environ Ethics* 31: 785-803.
- Campagna C, Guevara D, LeBoeuf B (2017): De-scenting extinction: the promise of de-extinction may hasten continuing extinctions. *Hastings Cent Rep* 47 Suppl 2: S48-S53.
- Corlett RT (2017): A bigger toolbox: Biotechnology in biodiversity conservation. *Trends Biotechnol* 35: 55-65.
- Crichton M (1990): "Jurassic Park". Alfred A. Knopf (New York, NY, USA).
- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2015): Second-generation nucleic-acid sequencing and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 9: 216-230.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Martín J, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2016): Sequencing ancient RNA in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 10: 103-111.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF (2017): Clustered Regularly-Interspaced Short-Palindromic Repeats (CRISPR) in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 11: 179-188.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2018): Evolution from first hominids to modern humans: philosophy, bioarchaeology and biology - Review. *Archaeobios* 12: 69-82.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog (REVIEW). *Archaeobios* 3: 127-132.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth (REVIEW). *Archaeobios* 4: 53-64.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - A review. *Archaeobios* 5: 21-28.

- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2012): Isotopes in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 6: 79-91
- Dorado G, Sánchez-Cañete FJS, Pascual P, Jiménez I, Luque F, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2014): Starch genomics and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 8: 41-50.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes (REVIEW). *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology (REVIEW). *Archaeobios* 1: 1-2.
- Garcia AK, Kacar B (2019): How to resurrect ancestral proteins as proxies for ancient biogeochemistry. *Free Radic Biol Med* (en prensa).
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MH, Hansen NF, Durand EY, Malaspinas AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prufer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Hober B, Hoffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PL, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Pääbo S (2010): A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328: 710-722.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC (1984): DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284.
- Iacona G, Maloney RF, Chades I, Bennett JR, Seddon PJ, Possingham HP (2017): Prioritizing revived species: what are the conservation management implications of de-extinction? *Funct Ecol* 31: 1041-1048.
- IUCN/SSC (2013): "Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations". Version 1.0. International Union for the Conservation of Nature (IUCN) and Species Survival Commission (SSC); Gland (Switzerland).
- Jacobsen R (2019): Ghost flowers. *Scientific American* 320: 30-39.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56: 341-61.
- Linderholm A (2016): Ancient DNA: the next generation – chapter and verse. *Biol J Linnean Soc* 117: 150–160.
- McCauley DJ, Hardesty-Moore M, Halpern BS, Young HS (2017): A mammoth undertaking: harnessing insight from functional ecology to shape de-extinction priority setting. *Funct Ecol* 31: 1003-1011.

- Novak BJ (2018): De-extinction. *Genes* 9: E548 (33 pp).
- O'Connor MR (2015): "Resurrection Science: Conservation, De-Extinction and the Precarious Future of Wild Things". St. Martin's Press (New York, MY, USA).
- Orlando L, Ginolhac A, Raghavan M, Vilstrup J, Rasmussen M, Magnussen K, Steinmann KE, Kapranov P, Thompson JF, Zazula G, Froese D, Moltke I, Shapiro B, Hofreiter M, Al-Rasheid KA, Gilbert MT, Willerslev E (2011): True single-molecule DNA sequencing of a Pleistocene horse bone. *Genome Res* 21: 1705-1719.
- Panet A, Khorana HG (1974): Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *J Biol Chem* 249: 5213-5221.
- Priya P, Yadav A, Chand J, Yadav G (2018): Terzyme: A tool for identification and analysis of the plant terpenome. *Plant Methods* 14:4 (18 pp).
- Robert A, Thevenin C, Prince K, Sarrazin F, Clavel J (2017): De-extinction and evolution. *Funct Ecol* 31: 1021-1031.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sandler R (2017a): De-extinction and conservation genetics in the Anthropocene. *Hastings Cent Rep* 47 Suppl 2: S43-S47.
- Sandler R (2017b): De-extinction: Costs, benefits and ethics. *Nat Ecol Evol* 1: 105 (2 pp).
- Seddon PJ, Moehrensclager A, Ewen J (2014): Reintroducing resurrected species: selecting De Extinction candidates. *Trends Ecol Evol* 29:140-147.
- Shapiro B (2017): Pathways to de-extinction: how close can we get to resurrection of an extinct species? *Funct Ecol* 31: 996-1002.
- Spielberg S (1993-2021): Film franchise of Universal Pictures, based on Jurassic Park science-fiction novel by Michael Crichton.
- Steeves TE, Johnson JA, Hale ML (2017): Maximising evolutionary potential in functional proxies for extinct species: a conservation genetic perspective on de-extinction. *Funct Ecol* 31: 1032-1040.
- Tanentzap AJ, Smith BR (2018): Unintentional rewilding: lessons for trophic rewilding from other forms of species introductions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373: 20170445 (9 pp).
- Thornton JW (2004): Resurrecting ancient genes: experimental analysis of extinct molecules. *Nat Rev Genet* 5: 366-375.

Wagner N, Hochkirch A, Martin H, Matenaar D, Rohde K, Wacht F, Wesch C, Wirtz S, Klein R, Lotters S, Proelss A, Veith M (2017): De-extinction, nomenclature, and the law. *Science* 356:1016-1017.

