Galemys 17 (nº especial): 81-102, 2005
ISSN: 1137-8700

GENOTIPAR SIN CAPTURAR

Montserrat Bosch[1,2], Josep Marmi[2], Aïnhoa Ferrando[1,2,3], Francesc López-Giráldez[1,2], Olga Andrés[1,2], Eulalia García-Franquesa[4], Montserrat Ponsà[3], Thomas Kellermann[2], Bruno Guallar[1,2], Francesc Bisbal[2] y Xavier Domingo-Roura[1,2]

1. Genètica de la Conservació, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Centre de Cabrils, Crta. Cabrils s/n, 08348 Cabrils (Barcelona)
2. Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 80, 08003 Barcelona.
3. Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona)
4. Museu de Ciències Naturals-Museu de Zoologia de Barcelona, Passeig Picasso s/n, 08003 Barcelona

Resumen

En los últimos años, los avances en técnicas moleculares han sido aplicados en taxonomía, ecología, biología evolutiva y biología de la conservación. Es preferible que los estudios genéticos de la fauna salvaje se realicen sin interferir con las poblaciones naturales y su bienestar. En este sentido, el desarrollo de técnicas para obtener ADN a partir de muestras no-invasivas, como por ejemplo pelos, heces, semen, dientes o muestras procedentes de museos, ha permitido que estos objetivos sean factibles. En el presente trabajo describimos algunos de los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación como ejemplo de técnicas de extracción de ADN a partir de muestras no-invasivas. En estos trabajos se ha obtenido ADN de semen de macacos japoneses (*Macaca fuscata* Blyth, 1875); pelos sin raíz de tejón (*Meles meles* Linnaeus, 1758); heces, secreciones anales y dientes de nutria (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) y huesos y dientes de tejón obtenidos de museos. Aplicando estas técnicas se han conseguido resultados satisfactorios en diferentes campos como por ejemplo el comportamiento social – se ha detectado promiscuidad en hembras de macaco japonés utilizando marcadores microsatélite -; en el control del tráfico de especies – se ha demostrado la venta de brochas de afeitar elaboradas con pelos de tejones de poblaciones europeas y asiáticas en países, donde esta especie está protegida o en peligro de extinción -; y en la caracterización de la variabilidad genética de especies como la nutria y el tejón.

Palabras claves: ADN mitocondrial, extracción de ADN, microsatélites, muestras no-invasivas, museos.

Abstract

Genotyping without capture

In recent years, advances in molecular techniques have been applied to taxonomy, ecology, evolution and conservation biology. It is preferable to perform genetic studies in wild fauna without interfering with wildlife populations and their welfare. In this sense, the development

of methods to obtain DNA from non-invasively collected samples, such as hairs, faeces, teeth, semen and museum specimens, has allowed these objectives to be feasible. In the present work we describe some works done by our group as example of different DNA extraction techniques from non-invasively collected samples. DNA has been obtained from semen of Japanese macaque (*Macaca fuscata* Blyth, 1875); unrooted hairs of Eurasian badger (*Meles meles* Linnaeus, 1758); faeces, anal secretions and teeth of Eurasian otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) and bones and teeth of Eurasian badger obtained from museums. Applying these methods we have obtained relevant results in different fields, such as social behaviour – we have detected promiscuity in Japanese macaque females using microsatellite markers -; in the control of the trade of species – we have demonstrate the illegal sale of shaving brushes manufactured with hair of badgers from European and Asian populations in countries where this species is protected or endangered -; and in the characterization of the genetic variability in protected or endangered species, such as otters and badgers.

Key words: DNA extraction, microsatellites, mitochondrial DNA, , museums, non-invasively collected samples.

Introducción

En las últimas décadas, los estudios moleculares basados en la obtención y el análisis de la variación de fragmentos y secuencias de ADN, han adquirido un gran protagonismo en taxonomía, ecología, biología evolutiva y biología de la conservación. La comprensión del vínculo entre variabilidad genética y eficacia biológica o supervivencia es esencial en la biología de la conservación, requiriendo esta comprensión la combinación de datos moleculares con datos no moleculares (por ejemplo fisiológicos, de comportamiento y ecológicos). La comparación de secuencias de genes mitocondriales, como los que codifican para los genes 12S y 16S rARNs y el citocromo *b*, ha sido de gran utilidad para estudiar las relaciones evolutivas y clarificar la taxonomía de diferentes grupos de organismos (Pasbøll y Arctander 1998). Por otro lado, la región control del ADN mitocondrial es uno de los marcadores genéticos utilizado más frecuentemente para realizar estudios a nivel intraespecífico (Avise 1998). Además, la información proporcionada por estas regiones mitocondriales está siendo complementada con secuencias de varias regiones nucleares como por ejemplo las regiones flanqueantes de microsatélites o genes que codifican para proteínas (Zardoya et al. 1996, DeBry y Seshadri 2001, Antunes et al. 2002). Las regiones más variables de ambos genomas (nuclear y mitocondrial) son de gran utilidad para estudiar procesos demográficos y de flujo genético entre poblaciones (Avise 1998) o incluso relaciones familiares entre individuos (Fowler et al. 1998). Igualmente, la caracterización y el genotipado de las regiones del genoma que son más informativas tienen otras aplicaciones, por ejemplo en genética forense

y en el control del tráfico de especies amenazadas o en peligro de extinción, debido a que permite distinguir entre especies filogenéticamente relacionadas o incluso entre poblaciones o individuos de una misma especie (Morley et al. 1999, Bellis et al. 2003, Hsieh et al. 2003, Greenspoon et al. 2004).

En un principio, la mayoría de estos estudios se realizaban mediante técnicas que frecuentemente implicaban la captura o incluso la muerte de animales – ya que era necesario obtener tejido fresco, para la electroforesis de proteínas, o grandes cantidades de ADN purificado, en el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Di Fiore 2003) – lo que entra en contradicción con los programas de conservación de especies amenazadas. El descubrimiento y desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Mullis y Faloona 1987), que permite obtener un elevado número de copias de una región concreta de este ácido nucleico, incluso partiendo de una mínima cantidad inicial, ha facilitado extraordinariamente el estudio con muestras que contienen poco ADN.

La obtención de muestras constituye una de las principales limitaciones de los estudios moleculares en especies salvajes. Las muestras biológicas pueden clasificarse en tres tipos según el procedimiento seguido para obtenerlas (Taberlet et al. 1999): a veces es necesario sacrificar el animal para obtener muestras del tejido que interesa (muestras destructivas); en otras ocasiones basta con la captura del animal y la realización de una extracción de sangre o una biopsia (muestra invasiva); mientras que en otros casos, se puede obtener el ADN sin capturar ni molestar al animal (muestra no-invasiva) o recolectando muestras de tejido muscular de cadáveres de animales encontrados en el campo. Como ejemplos de muestras no-invasivas cuyo ADN se ha extraído con éxito cabe destacar, por ejemplo, los pelos con o sin raíz (Higuchi et al. 1988, Vigilant et al. 1989), las células epiteliales presentes en las heces (Höss et al. 1992) o en la orina (Gasparini et al. 1989) y el semen (Li et al. 1988). En el caso de colecciones de museos, la obtención de la muestra se considera no-invasiva para la especie en su estado natural, pero puede considerarse como invasiva para la colección del museo, ya que la extracción sucesiva de pequeños fragmentos de una misma muestra para realizar análisis moleculares podría conllevar la desaparición del especimen.

El uso de muestras no-invasivas es de gran utilidad sobretodo en el estudio de poblaciones salvajes amenazadas o en peligro de extinción, puesto que permite obtener muestras sin necesidad de perturbar, o incluso observar, a los individuos. Incluso pueden serlo en especies que no están amenazadas ya que los métodos de muestreo basados en capturas a gran escala suelen presentar múltiples dificultades en el ámbito logístico, además de implicar la alteración de la dinámica de

las poblaciones, así como la posibilidad de que se alteren aquellas características que el investigador desea medir. Sin embargo, al emplear muestras no-invasivas es necesario tener en cuenta una serie de inconvenientes que suelen acompañarlas como son la poca cantidad y calidad del ADN que se puede obtener, así como problemas de contaminación y de presencia de inhibidores de la PCR, que pueden limitar su aplicación en determinados estudios (Taberlet et al. 1999). No obstante, la optimización de las condiciones de preservación de las muestras, de los protocolos de extracción de ADN, de las técnicas de amplificación y secuenciación, y de los métodos de análisis de los datos obtenidos, ha permitido extender el uso de este tipo de muestras.

Seguidamente presentamos una revisión de diferentes trabajos realizados en nuestros laboratorios con muestras no-invasivas procedentes de especies protegidas.

Extracción de ADN de semen

El semen está formado por diferentes fluidos secretados por las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales y contiene espermatozoides y células epiteliales desprendidas de los conductos. En estudios realizados en humanos, se ha logrado amplificar con éxito fragmentos de ADN extraído de un único espermatozoide (Li et al. 1988). La obtención de semen de animales en cautividad puede llevarse a cabo utilizando diferentes métodos, como la vibroestimulación del pene (Kuederling et al. 2000) o el uso de vaginas artificiales (VandeVoort et al. 1993). El genotipado no-invasivo a partir de muestras de semen sólo es posible en aquellas especies (p. ej. elefantes y chimpancés) en las que los machos producen restos de eyaculados después de aparearse que pueden ser recogidos *in situ* por el investigador con facilidad.

En nuestro equipo hemos utilizado restos de eyaculaciones para estudiar una población protegida de macacos japoneses (*Macaca fuscata* Blyth, 1875) de la isla de Yakushima (Domingo-Roura et al. 2004). Para realizar este trabajo se ha partido de restos de semen recogidos de la superficie de piedras o de ramas de árboles donde diferentes macacos habían copulado o se habían masturbado. Antes de proceder a la extracción de ADN del semen, se han realizado lavados con agua y con una solución de Tris-HCl y EDTA para eliminar restos vegetales o de tierra. A continuación, para evitar contaminaciones causadas por las células del epitelio vaginal de las hembras, se ha realizado una primera digestión con una solución de lisis que contiene un detergente y proteinasa K siguiendo el protocolo descrito por VonBeroldingen et al. (1989). Seguidamente se han recuperado, mediante centrifugación, los espermatozoides y se han resuspendido en otra solución

de lisis que contiene dithiothreitol para destruir la cubierta de los espermatozoides y así poder aislar su ADN aplicando a continuación un método estándar de extracción con fenol-cloroformo (Sambrook et al. 1989). El ADN extraído según este procedimiento es apto tanto para el estudio del ADN mitocondrial – se ha secuenciado un fragmento de 390 pares de bases (pb) de la región control del ADN mitocondrial en 16 individuos pertenecientes a ocho tropas - como para el análisis de ADN nuclear – se han amplificado dos microsatélites (MFGT22 y MFGT24) en 14 muestras de semen. Todas las secuencias de la región control obtenidas son idénticas, sin embargo se ha encontrado variabilidad en los marcadores microsatélite. En este último caso, se han analizado los diferentes alelos presentes en estas muestras en ambos *loci* mediante la lectura del tamaño de los alelos amplificados en un secuenciador automático utilizando el programa bioinformático GeneScan (Applied Biosystems). En algunos casos, en una única muestra de semen aparecen genotipos distintos pertenecientes a más de un individuo (Domingo-Roura et al. 2004). Descartando la posibilidad de amplificación de alelos de la hembra, esto nos indica cierto grado de promiscuidad en el comportamiento de las hembras de macaco japonés y una fuerte competencia entre los machos para aparearse con ellas.

Extracción de ADN de pelos

La mayor parte del ADN que se puede obtener de los pelos procede de la raíz y en concreto de las células localizadas alrededor del folículo (Hukkelhoven et al. 1981) aunque también es posible obtener ADN de pelos sin raíz (Higuchi et al. 1988). Los estudios pioneros en el uso de métodos de extracción de ADN de pelos se realizaron con muestras humanas (Higuchi et al. 1988, Vigilant et al. 1989). Se han descrito distintos protocolos para la obtención de ADN a partir de pelos, por ejemplo: la extracción orgánica después de digestión con proteinasa K (Higuchi et al. 1988); la digestión con proteinasa K seguida de la purificación y aislamiento del ADN en columnas con membranas de sílice (Vigilant 1999); y el tratamiento con microesferas de resina ionizada (Chelex, Biorad) con o sin digestión con proteinasa K (Walsh et al. 1991).

La secuenciación de fragmentos de ADN es menos eficiente a medida que aumenta el tamaño del fragmento amplificado, sobretodo en pelos caídos de manera natural o sin raíz, pues además de contener poca cantidad de ADN, éste suele estar degradado (Higuchi et al. 1988, Vigilant 1999). Una alternativa a la recogida de pelos caídos puede ser la obtención de pelos frescos con raíz mediante trampas de pelos, pues así se asegura la obtención de ADN de

mayor calidad sin suponer ningún riesgo para los animales. Por ejemplo, para obtener pelos de uombats de Krefftii (*Lasiorhinus krefftii* Owen, 1873), Sloane et al. (2000) colocaron cintas adhesivas suspendidas entre 20 y 30 centímetros del suelo por medio de dos estacas a lo largo de las pistas que conducían a sus madrigueras. Cada mañana estos investigadores recogían las cintas adhesivas asegurándose que los pelos encontrados eran de uombat localizando huellas y excrementos alrededor o cerca de la trampa.

En nuestros laboratorios, hemos desarrollado un método para detectar el origen específico del ADN de pelos en objetos comercializados elaborados con pelos de tejón (*Meles meles* Linnaeus, 1758), una especie protegida en muchos países, como España, el Reino Unido y Holanda (Domingo-Roura et al. en prensa). Se adquirieron brochas de afeitar supuestamente fabricadas con pelo natural de tejón, en comercios españoles y holandeses. Para cada brocha se han cortado varios fragmentos de pelos de 5 a 10 mm y se han realizado incubaciones con agua bidestilada para disolver los inhibidores de PCR. Posteriormente, se ha realizado la extracción del ADN con el *Kit DNeasy Tissue Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo descrito por Iudica et al. (2001) aumentando el tiempo de digestión con proteinasa K para maximizar la digestión de los pelos. Para evitar contaminaciones con otras muestras de tejón, se han realizado controles en otros tres laboratorios donde no se trabaja con ADN de esta especie. Se han secuenciado fragmentos cortos del ADN mitocondrial - unos 200 pb de la región control y 170 pb del gen citocromo *b*- y se ha obtenido la secuencia de ADN de ocho de las trece brochas analizadas. Al comparar las secuencias obtenidas con secuencias de nuestra base de datos y de GenBank pertenecientes a 115 tejones de 21 países distintos (Marmi 2004), y al tejón porcino (*Arctonyx collaris* Cuvier, 1825) – una especie no protegida de la que también se usan los pelos para fabricar brochas de afeitar – se ha concluido que algunas de las brochas se habían elaborado con pelos de tejón euroasiático de poblaciones protegidas.

Extracción de ADN de heces

Las heces son un recurso cada vez más habitual para la identificación y el estudio de la dieta de diferentes especies de mamíferos silvestres (Putman 1984). Sin embargo, a menudo especies relacionadas presentan similitudes en cuanto a la morfología y el tamaño de sus excrementos y las heces solamente pueden asignarse correctamente a una especie determinada de forma visual entre un 50 y un 60% de los casos (Halfpenny y Biesot 1986). El análisis de ADN de las heces puede ser de gran ayuda para el estudio de mamíferos salvajes sobretodo en aquellos casos en los que la identificación de la especie de procedencia del excremento

es dudosa. Además, la información que nos puede aportar el estudio de las heces con métodos moleculares va mucho más allá de la identificación taxonómica. Los análisis genéticos de excrementos nos pueden informar también sobre aspectos relacionados con el comportamiento de una especie, sobre sus censos poblacionales y efectivos, el área de dispersión o el tamaño del territorio ocupado por los individuos, los niveles de variabilidad genética, las relaciones filogeográficas entre diferentes poblaciones e incluso la dieta o los tipos de enfermedades que padecen los animales (Kohn y Wayne 1997).

Los primeros estudios genéticos realizados empleando muestras de heces tenían aplicaciones clínicas en medicina humana (Sidransky et al. 1992) o veterinaria (Bretagne et al. 1993). Paralelamente, también se exploró su aplicación en el estudio y conservación de mamíferos salvajes (Höss et al. 1992). En las heces, el ADN del animal procede de las células epiteliales descamadas que proceden del lumen del intestino. En este tipo de muestras, estas células están acompañadas de microorganismos, restos de comida no digeridos, enzimas digestivos, moco, sales biliares y bilirubina (Sidransky et al. 1992). En el caso de los animales que ingieren vegetales, las heces contienen, además, polisacáridos de plantas (Deuter et al. 1995) que pueden actuar como inhibidores de la PCR. También existe la posibilidad de amplificar moléculas de ADN no deseadas procedentes de los restos no digeridos de las presas ingeridas por el animal. A todo esto se suma el hecho de que el ADN del animal presente en sus heces es escaso y acostumbra a estar degradado (Kohn et al. 1995). El éxito en las amplificaciones también depende del método de preservación de las muestras, del tamaño del producto de PCR y de si se pretende amplificar ADN nuclear o mitocondrial. La preservación de heces en una solución salina de DMSO/EDTA/Tris (DETs) es bastante efectiva para la conservación del ADN nuclear, mientras que el etanol al 70%, la congelación a –20ºC o la liofilización suelen ser preferibles para preservar el ADN mitocondrial (Frantzen et al. 1998).

En nuestros laboratorios estamos utilizando muestras de heces y de secreciones anales para realizar un seguimiento genético de una población de nutria (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) reintroducida en el *Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà* y en los ríos Muga y Fluvià (Provincia de Girona, Cataluña). Se han genotipado con marcadores microsatélite muestras de heces con el objetivo de realizar la identificación de individuos presentes en determinadas áreas y para hacer estimaciones de la diversidad genética así como de su evolución en función del tiempo mediante la comparación de genotipos de muestras obtenidas tras el transcurso de varios años desde su introducción con el genotipo de los animales fundadores. Se han recogido las heces y secreciones anales durante

las 18 horas siguientes a su deposición y se han conservado utilizando dos métodos distintos: la congelación a –80ºC o la conservación en etanol al 96%, hasta el momento de proceder a la extracción de su ADN. Estas extracciones se han realizado siguiendo el protocolo del *QiAamp ADN Stool Mini* kit (Qiagen), basado en la utilización de columnas de purificación con membranas de gel de sílice, diseñado específicamente para este tipo de muestras. El porcentaje de éxito en la amplificación de al menos 1 microsatélite para muestras conservadas a –80 ºC es de un 31% en el caso de muestras de heces y de un 60% para las secreciones anales. La conservación de las heces en etanol al 96% ha dado buenos resultados, la tasa global de amplificación en uno o más marcadores es del 40-50%.

Los dos errores que se producen con más frecuencia en el estudio de marcadores microsatélite con soluciones de ADN de baja concentración y/o degradado es la no-amplificación de uno de los dos alelos y la generación de falsos alelos debido a errores de la enzima polimerasa durante la replicación. Para detectar y eliminar estos errores que conducen a la generación de falsos genotipos, es necesario realizar varias réplicas de una misma muestra. Los datos obtenidos son analizados con los programas *Gimlet* (Valière 2002) -que permite, por ejemplo, crear el genotipo consenso de entre todas las réplicas de una misma muestra, agrupar las muestras que comparten el mismo genotipo y obtener información sobre los porcentajes de errores provocados por la no-amplificación de un alelo y/o la aparición de un falso alelo durante la amplificación- y *RelioType* (Miller et al. 2002) -que permite determinar la fiabilidad de los genotipos encontrados y calcular el número de réplicas suplementarias necesarias en cada marcador para obtener los genotipos reales con probabilidades de error por debajo de un umbral preestablecido. Debido a la gran expansión de estudios genéticos a partir de muestras no-invasivas, cada vez van apareciendo nuevos programas adaptados para este tipo de análisis como *Gemini* (Valière et al 2002), *Micro-Checker* (Van Oosterhout et al 2004), *Genecap* (Wilberg y Dreher 2004) o *Api-Calc* (Ayres y Overall 2004), que permiten, entre otras aplicaciones, detectar errores de genotipado, agrupar genotipos coincidentes o muy similares y calcular las probablidades de identidad de los genotipos de dos individuos en la población en función de las frecuencias alélicas en cada *loci*.

Los resultados preliminares muestran que los microsatélites utilizados son suficientemente polimórficos como para permitir la identificación de individuos. En la Figura 1 se puede observar el resultado de la lectura de los genotipos de dos muestras de heces de nutria utilizando dos marcadores microsatélite.

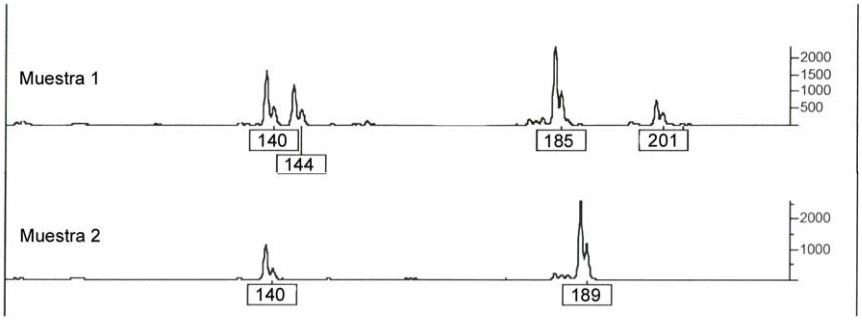

Figura 1. Genotipado de heces de nutria con dos marcadores microsatélite (Lut902 y Lut717). La primera muestra es heterocigota en ambos marcadores (alelos de 140 y 144 pares de bases para el marcador Lut902, y de 185 y 201 para el marcador Lut717). La segunda muestra es homocigota en ambos marcadores.

Genotypes obtained from otter faeces with two microsatellite markers (Lut902 and Lut717). The first sample is heterozygote for both markers (140 and 144 base pairs alleles for marker Lut902 and 185 and 201 for marker Lut717). The second sample is homozygote for both markers.

Extracción de ADN de muestras de huesos y dientes procedentes de museos

Los especímenes conservados en los museos son una fuente de gran valor para la obtención de secuencias de ADN, sobretodo de poblaciones o de especies extintas. También pueden ser de gran ayuda para detectar los efectos históricos del flujo génico, de los cambios en los tamaños poblacionales y de las hibridaciones en la composición génica de una especie determinada (Roy et al. 1994). En la mayoría de casos los especímenes de museos consisten en pieles de estudio, esqueletos y tejidos fijados en formol y/o preservados en etanol. En las muestras que no están guardadas en soluciones conservantes, la molécula de ADN se degrada por los procesos catalíticos asociados a la muerte del organismo (p. ej. hidrólisis, oxidación) y por diferentes factores ambientales (p. ej. radiaciones, temperatura) (Carter 2002). Los conservantes protegen el ADN de esta degradación. No obstante, la adición de preservativos en los tejidos también puede presentar inconvenientes; por ejemplo, en las extracciones de muestras fijadas en formol realizadas con fenol-cloroformo (Sambrook et al. 1989) se pierde una gran cantidad de ADN debido a que el formol favorece la asociación del ADN con complejos de proteínas (Shedlock et al. 1997). A pesar de esto, es posible recuperar ADN de buena calidad de tejidos que hayan sido fijados en formol y posteriormente guardados en alcohol – práctica habitual en los museos desde el último cuarto del siglo XX – incubando

los tejidos en soluciones tampón para eliminar el formol y modificando el método de extracción clásico de fenol-cloroformo. Shedlock et al. (1997) obtuvieron más de un 82% de éxito al amplificar fragmentos de ADN mitocondrial de aproximadamente 500 pares de bases a partir de este tipo de muestras.

La extracción de ADN de muestras de huesos hace posible incluso el estudio de muestras que tienen millares de años de antigüedad (Hofreiter et al. 2001). Esto ha permitido estudiar con métodos moleculares la filogenia de especies fósiles cuya morfología no esclarece su parentesco evolutivo (p. ej. Thomas et al. 1989, Lalueza-Fox et al. 2002) o el proceso de domesticación de diferentes especies de animales domésticos (p. ej. Leonard et al. 2002). Se han podido recuperar secuencias de diferentes genes mitocondriales e incluso de genes nucleares de diferentes especies de mamíferos que se extinguieron en el Pleistoceno Superior (Greenwood et al. 1999). Wanderler et al. (2003) han realizado un estudio que cuantifica, mediante PCR cuantitativa, el proceso de degradación de ADN nuclear en muestras de dientes de museos a lo largo del tiempo, han conseguido amplificar fragmentos nucleares (microsatélites) de hasta 200 pares de bases a partir de ADN extraído de muestras de hasta 30 años de antigüedad y han demostrado que tanto el porcentaje de éxito en las amplificaciones como el porcentaje de errores de genotipado dependen de la edad de la muestra y del tamaño del microsatélite amplificado.

En nuestro laboratorio hemos realizado extracciones de ADN de fragmentos de huesos y dientes de tejones asiáticos (*Meles meles canescens* Blanford, 1875 y *Meles meles leucurus* Petrov, 1953) y de dientes de nutria. Algunas de estas muestras tenían una antigüedad de más de 50 años. Antes de empezar el proceso de extracción se ha pulverizado un gramo de muestra en un molinillo de café. Seguidamente se ha extraído el ADN usando el *DNeasy Tissue* kit (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por Iudica et al. (2001). Se ha conseguido secuenciar un fragmento de 512 pb de la región control del ADN mitocondrial partiendo de amplificaciones de fragmentos de entre 221 y 252 pb ya que el ADN de estas muestras estaba bastante degradado. Al comparar estas secuencias con las obtenidas de tejones europeos (*Meles meles meles* Linnaeus, 1758) se ha podido demostrar que estas tres subespecies de tejón euroasiático están claramente diferenciadas a nivel genético y que empezaron a evolucionar separadamente en el Pleistoceno Medio, hace entre 900.000 y 500.000 años (Marmi et al. 2005).

En el caso de las nutrias, el análisis de un fragmento de ADN mitocondrial de las muestras de dientes ha permitido determinar que los animales fundadores reintroducidos en el *Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà* comparten un mismo haplotipo con poblaciones mediterráneas catalanas anteriores (Ferrando et al. 2004).

Discusión

Las técnicas de muestreo no-invasivas ofrecen una gran oportunidad para estudiar a nivel genético las especies y poblaciones salvajes sin perturbarlas, con lo que son especialmente aplicables al estudio de aquellas especies que están amenazadas de extinción, o que son difíciles de muestrear por el tipo de hábitat en el que viven o por sus costumbres. En el campo, algunas de estas muestras pueden recolectarse fácilmente sin necesidad de ningún tipo de logística sofisticada (p. ej. las heces o los restos de semen). En otros casos, si se tiene un buen conocimiento de los individuos que se desea muestrear por medio de un riguroso seguimiento en el campo, se pueden instalar trampas sencillas para recolectar muestras, como por ejemplo pelos. Uno de los principales inconvenientes de la recolección de restos en el campo es el riesgo de una identificación incorrecta de las especies, por eso es imprescindible asegurarse que la muestra recolectada en el campo pertenece a la especie que queremos estudiar. En algunos casos esto es fácil de saber (p. ej. el semen de macacos japoneses) pero en otros puede que la identificación de la muestra sea mucho más complicada y la probabilidad de error mayor (p. ej. en el caso de las heces). En estos casos, es posible secuenciar un fragmento corto, por ejemplo del ADN mitocondrial, y utilizarlo como marcador específico de especie. En otros casos, el diseño de oligonucleótidos específicos de especie (p.ej. Palomares et al. 2002), el tamaño del producto de la PCR (p. ej. Mills et al. 2000, López-Giráldez et al. 2005) o el patrón de restricción de un producto amplificado (p. ej. Paxinos et al. 1997, Hansen y Jacobsen 1999, Mills et al. 2000, Riddle et al. 2003, Gómez-Moliner et al. 2004) pueden contribuir a la identificación de la especie a la que pertenece la muestra.

Es importante tener en cuenta que el uso de muestras no-invasivas conlleva una serie de inconvenientes, como son la baja cantidad y el alto nivel de degradación del ADN extraído, así como la presencia de inhibidores de la PCR y la contaminación con ADN exógeno durante el proceso de extracción y posterior amplificación, que limitan el uso de este tipo de muestras (Taberlet et al. 1996). Además, la poca cantidad de ADN presente en las muestras no-invasivas puede inducir a errores de genotipado ya sea por la introducción de bases erróneas durante la reacción de amplificación, en el caso de secuenciación, o por la no amplificación de uno de los alelos o la amplificación de artefactos de la PCR, en el caso de microsatélites (Taberlet et al. 1996). Sin embargo, a pesar de todos estos inconvenientes, es posible usar este tipo de muestras si se optimizan tanto las condiciones de preservación de las muestras, como los protocolos de extracción de ADN, lo que permite la obtención de ADN de buena calidad minimizando el riesgo de contaminación y la presencia de inhibidores de la PCR, y también deben analizarse los datos correctamente para detectar posibles errores de genotipado.

Es esencial asegurar la obtención de unos niveles aceptables de ADN de buena calidad a partir de muestras no-invasivas. En este sentido, hay que tener en cuenta el método de preservación de las muestras así como los métodos de extracción del ADN. Las condiciones óptimas de preservación de las muestras y los protocolos de extracción varían en función de una serie de parámetros, como por ejemplo el tipo de muestra o el taxón al que pertenece. A pesar de que se han publicado algunas revisiones extensas que recogen distintos métodos de preservación de muestras (Prendini et al. 2002, Helbig 2003) y protocolos de extracción de ADN a partir de distintos tipos de muestras (Nishiguchi et al. 2002), es necesario adaptar los protocolos a cada nuevo estudio y es preciso realizar un estudio piloto para optimizar todos estos parámetros en cada experimento que pretendamos realizar. Además, en muestras con poca cantidad y calidad de ADN, el porcentaje de éxito en las amplificaciones depende tanto del tamaño del fragmento que se pretende amplificar como del tipo de marcador genético que se use. En general, es aconsejable amplificar fragmentos pequeños (de hasta unos 200-300 pares de bases) del ADN mitocondrial, debido al mayor número de copias por célula de este genoma con respeto al genoma nuclear. No obstante, la optimización de los protocolos permite recuperar información del genoma nuclear incluso de aquellas muestras que conllevan más dificultades. En la Tabla 1 se muestran diferentes trabajos que han sido realizados con marcadores nucleares. Además, el inconveniente de la poca cantidad de ADN que presentan las muestras no-invasivas se puede superar gracias a las nuevas técnicas de amplificación de genomas completos, que llegan a amplificar todo un genoma a partir de unos pocos nanogramos de ADN (Lovmar et al. 2003).

Otro aspecto fundamental es asegurar la eliminación de los posibles inhibidores de la PCR (Schmerer et al. 1999). En algunas ocasiones, diluir el stock de ADN que usamos en la reacción de la PCR es suficiente para solucionar el problema de los inhibidores. En otros casos es necesario aplicar algunos protocolos, como los basados en la utilización de agentes quelantes (p. ej. Chelex), que eliminan iones que tienen un efecto inhibidor de la PCR (Singer-Sam et al. 1989), o los basados en la utilización de resinas que presentan una elevada afinidad por el ADN (Yang et al. 1998) y que reducen la presencia de inhibidores de la PCR en el extracto de ADN.

Para asegurar que el genotipo obtenido es el correcto se requiere un trabajo cauteloso y cuidadoso. En ocasiones, se obtiene un falso genotipo debido a contaminaciones de las muestras con ADN exógeno. El riesgo de contaminación es mucho mayor cuando se trabaja con muestras que contienen poca cantidad de ADN, como es el caso de las no-invasivas, por lo que estas muestras deben

ser manipuladas con extremo cuidado y en condiciones de máxima limpieza (Taberlet et al. 1996, Taberlet et al. 1999, Wayne et al. 1999, Hofreiter et al. 2001, Pääbo et al. 2004). Es aconsejable esterilizar todos los materiales y reactivos antes de su uso, usar material exclusivo para este tipo de muestras y trabajar en tres laboratorios diferentes y separados, uno para la extracción del ADN, otro para preparar las reacciones de PCR y el otro para manipular el ADN amplificado. Es imprescindible la incorporación de controles negativos desde la fase de extracción hasta la del genotipado. También es recomendable utilizar oligonucleótidos específicos para la especie de estudio, y es deseable confirmar los resultados a partir de diferentes réplicas de extracción realizadas por el propio investigador y por un laboratorio independiente (Li et al. 2000). Incluso en el caso de que no haya contaminación, se pueden obtener también falsos genotipos. En el ADN procedente de muestras antiguas, la desaminación de las citosinas, por ejemplo, favorece la inserción incorrecta de nucleótidos durante la reacción de la PCR (Pääbo 1989). En estos casos, la secuencia de nucleótidos más probable se deduce a partir de la secuenciación de varios clones obtenidos a partir del producto de la PCR (Hofreiter et al. 2001), o de secuencias obtenidas de diferentes réplicas de extracción (p. ej. ver Leonard et al. 2000). En el caso de trabajar con secuencias mitocondriales puede haber problemas de falsos genotipos debido a la amplificación de fragmentos mitocondriales insertados en el genoma nuclear y esta amplificación nuclear puede ser más probable en ciertas muestras no-invasivas tal y como advierten Greenwood y Pääbo (1999) y Thalmann et al. (2004). En el caso de los marcadores microsatélite, los errores de genotipado pueden ser producidos por la no detección de uno de los alelos en individuos heterocigotos, obteniéndose un falso homocigoto, o por la generación de falsos alelos durante la PCR que pueden dar lugar también a interpretaciones erróneas y así adjudicar un falso heterocigoto a un individuo que es realmente homocigoto. Estos errores son frecuentes en muestras que contienen muy poca cantidad de células, como son los pelos caídos de forma natural o las heces (Taberlet et al. 1996, Goossens et al. 1998). A pesar de estos inconvenientes, es posible genotipar con microsatélites muestras no-invasivas con fiabilidad si por cada muestra y *locus* se hacen varias réplicas de amplificación (Taberlet et al. 1996, Gagneux et al. 1997, Goossens et al. 1998) o si se cuantifica el ADN nuclear amplificable en cada muestra para determinar el número de repeticiones necesarias que deben realizarse en cada caso para que el genotipado sea fiable (Morin et al. 2001).

Todas las precauciones que se deben tomar para que los trabajos realizados con muestras no-invasivas sean efectivos y fiables requieren frecuentemente

Tabla 1
Diferentes ejemplos de estudios realizados recientemente con muestras no-invasivas y diferentes marcadores genéticos.

Different examples of recent studies perfomed with non-invasive samples and different genetic markers.

Especie	Tipo de muestra	Regiones analizadas	Objetivos	Conclusión	Referencia
Uombat (*Lasiorhinus krefftii* Owen, 1873)	Pelos	12 *loci* microsatélite 175pb del *locus* G6PD 115 pb del gen *Ube*1Y	Identificación individual de animales para realizar censos poblacionales.	El genotipado con muestras no-invasivas es un método efectivo para realizar censos poblacionales en animales esquivos o en especies en grave peligro de extinción.	Sloane et al. 2000
Gorila (*Gorilla gorilla grauieri* Matschie, 1914; *G. g. beringei* Matschie, 1903)	Pelos y heces	485 pb de la región control del ADN mitocondrial	Inferir estructuras poblacionales y si ha habido fluctuaciones poblacionales en el pasado.	Los resultados apoyan la designación de estas dos subespecies. En ambas subespecies hay evidencias de cuellos de botella posiblemente producidos por la fragmentación de los bosques durante el último máximo glacial.	Jensen-Seaman y Kidd 2001
Dingo (*Canis familiaris dingo*, Linnaeus, 1758) Perro (*C. f. familiaris* Linnaeus, 1758)	Heces	8 *loci* microsatélite	Identificar al depredador de siete uombats cuyos restos fueron encontrados en el Parque Nacional de Epping Forest (Queensland, Australia).	Los genotipos de cuatro heces de cánidos encontradas cerca de los restos de uombat revelaron que estos probablemente fueron devorados por dingos.	Banks et al. 2003
Elefante africano de bosque (*Loxodonta cyclotis* Matschie, 1900)	Heces	11 *loci* microsatélite 165 pb del *locus* SRY	Estimar el tamaño, la proporción de sexos y la variabilidad genética de una población del Parque Nacional de Kakum (Ghana).	Esta población probablemente sea viable a corto plazo y posiblemente formó parte de una población mayor y más continua localizada en las zonas boscosas del norte de Guinea.	Eggert et al. 2003

Continuación Tabla 1

Especie	Tipo de muestra	Regiones analizadas	Objetivos	Conclusión	Referencia
Marta pescadora (*Martes pennanti* Erxleben, 1777)	Pieles de museos	300 pb de la región control del ADN mitocondrial	Evaluar las consecuencias a nivel genético de las repoblaciones realizadas en el pasado y previstas para el futuro.	Se detectó flujo génico histórico entre las poblaciones de la Columbia Británica y Washington y las de Oregon y California que actualmente están aisladas a causa de las actividades humanas.	Drew et al. 2003
Elefante africano (*Loxodonta africana* Blumenbach, 1797)	Pieles de museos	10 *loci* microsatélite	Determinar los efectos genéticos provocados por la caza intensiva sufrida a principios de siglo en las poblaciones surafricanas de elefantes de los Parques Nacionales de Addo y Kruger (Sudáfrica).	Las poblaciones de los Parques Nacionales de Addo y Kruger tienen una baja diversidad genética. La población de Addo es la más depauperada de ambas, como consecuencia de una rápida deriva genética.	Whitehouse y Harley 2001
Oso grizzly (*Ursus arctos horribilis* Ord, 1815)	Huesos de museos	8 *loci* microsatélite	Determinar si la baja diversidad genética de la población del Parque Nacional de Yellowstone es debida a la consanguinidad producida por su aislamiento y reducción de efectivos a causa de las actividades humanas.	Aunque la diversidad genética es baja, no es tan severa como se creía. El flujo génico entre ésta y otras poblaciones puede ser muy beneficioso para evitar la consanguinidad y la erosión de la diversidad genética en el futuro.	Miller y Waits 2003
Nutria común (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758)	Huesos de museos	11 *loci* microsatélite	Evaluar si un descenso del tamaño poblacional reciente ha causado pérdidas de diversidad genética en las poblaciones de Dinamarca.	Se encontraron pocas evidencias de que la población actual sea genéticamente menos diversa que la población anterior al descenso poblacional.	Pertoldi et al. 2001

protocolos más lentos, tediosos y caros que los utilizados en muestras de mayor calidad. Así pues, en el momento de plantearse una investigación basada en muestras no-invasivas, será necesario valorar en cada caso el balance entre ventajas e inconvenientes.

En el caso de la recolección de muestras de tejido muscular de cadáveres de animales encontrados en el campo, la identificación del espécimen suele ser frecuentemente más fácil y se obtiene un ADN de mayor calidad. Por esto, puede ser de gran importancia la colaboración de los gestores de fauna, biólogos de campo, guardas forestales y naturalistas con las universidades, centros de investigación y museos para que este tipo de muestras puedan aprovecharse para estudios moleculares.

A medida que los procesos se van automatizando, se van acumulando secuencias de ADN de una amplia variedad de especies en las bases de datos moleculares – como por ejemplo la existente en el European Molecular Biology Laboratory (EMBL; http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html) – y se van optimizando los protocolos para trabajar con muestras no-invasivas, el análisis de la variación en los genomas gana protagonismo en el estudio de los animales salvajes y en la gestión de la biodiversidad. Sin embargo, esto no quiere decir que en un futuro la biología de la conservación se vaya a dirigir desde un laboratorio. Los estudios basados en la variación de los genomas son una pieza más en un engranaje que tiene como objetivo estudiar el origen y la evolución de los seres vivos, darles nombre y buscar medios para evitar con la mayor eficiencia posible que el impacto de las actividades humanas perjudique gravemente a las poblaciones naturales.

Agradecimientos

Agradecemos a las siguientes personas su inestimable ayuda para el desarrollo de nuestro banco de tejidos de animales ibéricos: Idoia Álvarez de Arkaia, Enrique Arberas, Antoni Arrizabalaga, Elena Ballesteros, José María Barea, Miguel Ángel Campos, Felipe Canales, Salvador Filella, Imma Freiría, Santiago Lavín, Jose Vicente López, Marta Miralles, Marcos Moleón, Gonzalo Munientes, José Carlos Pérez, Salvador Pérez, Miquel Ponce, Iván Ponce, Javier Prieta, Eloy Revilla, José Luis Sánchez, Jesús López, Xon Vilahur, entre otros colaboradores nacionales e internacionales, así como a las siguientes instituciones *Siberian Zoological Museum* (Novosibirsk, Rusia) y *Museu de Ciències Naturals de la Ciutadella* de Barcelona (España), por la cesión de muestras de huesos y dientes de tejón y dientes de nutria, respectivamente. Agradecemos también a las siguientes instituciones por su contribución en el desarrollo de estos trabajos: Comisión Europea (Proyecto INPRIMAT, QLRI-CT-2002-01325), Fundació Territori i Paisatge (Caixa Catalunya) y Generalitat de Catalunya (becas pre-doctorales concedidas a J. Marmi, J. F. López-Giráldez, A. Ferrando y O. Andrés, Ref. 2000FI-698, Ref. 2001FI-00625, Ref. 2002FI-00280 y Ref. 2003FI-00787).

Referencias

Antunes, A., A. R. Templeton, R. Guyomard y P. Alexandrino (2002). The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1272-1287.

Avise, J. C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.

Ayres, K. L. y A. D. J. Overall (2004). API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. *Molecular Ecology Notes*, 4: 315-318.

Banks, S. C., A. Horsup, A. N. Wilton y A. C. Taylor (2003). Genetic marker investigation of the source and impact of predation on a highly endangered species. *Molecular Ecology*, 12: 1663-1667.

Bellis, C., K. J. Ashton, L. Freney, B. Blair y L. R. Griffiths (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International*, 134: 99-108.

Bretagne, S., J. P. Guillou, M. Morand y R. Houin (1993). Detection of *Echinococcus multiocularis* DNA in fox feces. *Parasitology*, 106: 193-199.

Carter, J. (2002). DNA preservation in fluid preserved collections. *SPNHC Newsletter*, 16: 14-15.

DeBry, R. W. y S. Seshadri (2001). Nuclear intron sequences for phylogenetics of closely related mammals: an example using the phylogeny of *Mus*. *Journal of Mammalogy*, 82: 280-288.

Deuter, R., S. Pietsch, S. Hertel y O. Muller (1995). A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. *Nucleic Acids Research*, 23: 3800-3801.

Di Fiore, A. (2003). Molecular genetic approaches to the study of primate behaviour, social organization, and reproduction. *Yearbook of Physical Anthropology*, 46: 62-99.

Domingo-Roura, X., J. Marmi, O. Andres, J. Yamagiwa y J. Terradas (2004). Genotyping from semen of wild Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *American Journal of Primatology*, 62: 31-42.

Domingo-roura, X., J. Marmi, A. Ferrando, F. López-giráldez, D. W. Macdonald y H. A. H. Jansman (en prensa). Badger hair in shaving brushes comes from protected Eurasian badgers. *Biological Conservation*.

Drew, R. E., J. G. Hallett, K. B. Aubry, K. W. Cullings, S. M. Koepf y J. Zielinski (2003). Conservation genetics of the fisher (*Martes pennanti*) based on mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 12: 51-62.

Eggert, L. S., J. A. Eggert y D. S. Woodruff (2003). Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology*, 12: 1389-1402.

Ferrando, A., M. Ponsà, J. Marmi y X. Domingo-Roura (2004). Eurasian otters, *Lutra lutra*, have a dominant mtDNA haplotype from the Iberian Peninsula to Scandinavia. *Journal of Heredity*, 95: 430-435.

Fowler, E. V., B. A. Houlden, W. B. Sherwin, P. Hoeben y P. Timms (1998). Genetic variation in captive koalas (*Phascolarctos cinereus*): parentage determination and individual identification. *Biochemical Genetics*, 36: 193-206.

Frantzen, M. A. J., J. B. Silk, J. W. H. Ferguson, R. W. Wayne y M. H. Kohn (1998). Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7: 1423-1428.

Gagneux, P., C. Boesch y D. S. Woodruff (1997). Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 6: 861-868.

Gasparini, P., A. Savoia, P. F. Pignatti, B. Dallapiccola y G. Novelli (1989). Amplification of DNA from epithelial cells in urine. *New England Journal of Medicine*, 320: 809.

Gómez-Moliner B. J., M. T. Cabria, J. Rubines, I. Garin, M. J. Madeira, A. Elejalde, J. Aihartza, P. Fournier y S. Palazón (2004). PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*M. vison*) and polecat (*M. putorius*) by analysis of excremental DNA. *Journal of Zoology*, 262: 311-316.

Goossens, B., L. P. Waits y P. Taberlet (1998). Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. *Molecular Ecology*, 7: 1237-1241.

Greenspoon, S. A., J. D. Ban, L. Pablo, C. A. Crouse, F. G. Kist, C. S. Tomsey, A. L. Glessner, L. R. Mihalacki, T. M. Long, B. J. Heidebrecht, C. A. Braunstein, D. A. Freeman, C. Soberalski, N. Bruesehoff, A. S. Amin, E. K. Douglas y J. W. Schumm (2004). Validation and implementation of PowerPlex (R) 16 BIO system STR multiplex for forensic casework. *Journal of Forensic Science Society*, 49: 71-80.

Greenwood, A. C. y S. Pääbo (1999). Nuclear insertion sequences of mitochondrial DNA predominate in hair but not in blood of elephants. *Molecular Ecology*, 8: 133-137.

Greenwood, A. D., C. Capelli, G. Possnert y S. Pääbo (1999). Nuclear DNA sequences from Late Pleistocene megafauna. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1466-1473.

Hansen, M. M. y L. Jacobsen (1999). Identification of mustelid species: otter (*Lutra lutra*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*), by analysis of DNA from faecal samples. *Journal of Zoology*, 247, 177-181.

Halfpenny, J. y E. Biesot (1986). *A Field Guide to Mammal Tracking in North America.* Johnson Books, Nueva York.

Helbig, A. J. (2003) Molecular phylogenetics – What can museums contribute? *Bonner Zoologische Beiträge*, 51: 105-108.

Higuchi, R., C. H. von Beroldingen, G. F. Sensabaugh y H. A. Erlich (1988). DNA typing from single hairs. *Nature*, 332: 543-546.

Hofreiter, M., D. Serre, H. N. Poinar, M. Kuch y S. Pääbo (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2: 353-359.

Höss, M., M. Kohn, S. Pääbo, F. Knauer y W. Schroder (1992). Excrement analysis by PCR. *Nature*, 359: 199.

Hsieh, H. M., L. H. Huang, L. C. Tsai, Y. C. Kuo, H. H. Meng, A. Linacre y J. C. I. Lee (2003). Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *Forensic Science International*, 136: 1-11.

Hukkelhoven, M. W. A. C., E. Vromans, A. M. G. Markslag y A. J. M. Vermorken (1981). A simple fluorimetric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles. *Anticancer Research*, 1: 341-344.

Iudica, C. A., W. M. Whitten y N. H. Williams (2001). Small bones from dried mammal museum specimens as a reliable source of DNA. *BioThecniques*, 30: 732-736.

Jensen-Seaman, M. I. y K. K. Kidd (2001). Mitochondrial DNA variation and biogeography of eastern gorillas. *Molecular Ecology*, 10: 2241-2247.

Kohn, M. H., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schröder y S. Pääbo (1995.) Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology*, 4: 95-103.

Kohn, M. H. y R. K. Wayne (1997). Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 12: 223-227.

Kuederling, I., A. Schneiders, J. Sonksen, P. L. Nayudu y J. K. Hodges (2000). Non-invasive collection of ejaculates from common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. *American Journal of Primatology*, 52: 149-154.

Lalueza-Fox, C., B. Shapiro, P. Bover, J. A. Alcover y J. Bertranpetit (2002). Molecular phylogeny and evolution of the extinct bovid *Myotragus balearicus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 501-510.

Leonard, J. A., R. K. Wayne y A. Cooper (2000). Population genetics of ice age brown bears. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 1651-1654.

Leonard, J. A., R. K. Wayne, J. Wheeler, R. Valadez, S. Guillén y C. Vilà (2002). Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science*, 298: 1613-1616.

Li, H. H., U. B. Gyllensten, X. F. Cui, R. K. Saiki, H. A. Erlich y N. Arnheim (1988). Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, 335: 414-417.

Li, J., X. Liao y H. Yang (2000). Molecular characterization of a parasitic tapeworm (*Ligula*) based on DNA sequences from formalin-fixed specimens. *Biochemical Genetics*, 38: 309-322.

López-Giráldez J. F., B. J. Gómez-Moliner, J. Marmi y X. Domingo-Roura (2005). Genetic distinction of American and European mink (*Mustela vison* and *M. lutreola*) and European polecat (*M. putorius*) hair samples by detection of a species-specific SINE and a RFLP assay. *Journal of Zoology,* 265: 1-6.

Lovmar, L., M. Fredriksson, U. Liljedahl, S. Sigurdsson y A. C. Syvänen (2003). Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Research*, 31: e129.

Marmi, J. (2004). *Sistemàtica molecular, filogeografia i genètica de la conservació de mustèlids i de macacs.* Tesis Doctoral. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

Marmi, J., F. López-Giráldez, D. W. Macdonald, F. Calafell, E. Zholnerovskaya y X. Domingo-roura (2005). Mitochondrial DNA reveals a strong phylogeographic structure in the badger across Eurasia. *Molecular Ecology*.

Miller, C. R., P. Joyce y L. P. Waits (2002). Assessing dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160: 357-366.

Miller, C. R. y L. P. Waits (2003). The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 4334-4339.

Mills, L. S., K. L. Pilgrim, M. K. Schwartz y K. McKelvey (2000). Identifying lynx and other North American felids on mtDNA analysis. *Conservation Genetic*, 1: 285-288.

Morin, P. A., K. E. Chambers, C. Boesch y L. Vigilant (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from non-invasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzee (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10: 1835-1844.

Morley, J. M., J. E. Bark, C. E. Evans, J. G. Perry, C. A. Hewitt y G. Tully (1999). Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *International Journal of Legal Medicine*, 112: 241-248.

Mullis, K. y F. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.

Nishiguchi, M. K., P. Doukakis, M. Egan, D. Kizirian, A. Phillips, L. Prendini, H. C. Rosenbaum, E. Torres, Y. Wyner, R. DeSalle y G. Giribet (2002). DNA isolation procedures. Pp. 249-287. En: R. DeSalle, G. Giribet, W. Wheeler (eds.). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution.* American Museum of Natural History. Nueva York.

Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 1939-1943.

Pääbo, S., H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant y M. Hofreiter (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38: 645-679.

Palomares, F., J. A. Godoy, A. Piriz, S. J. O'Brien y W. E. Johnson (2002). Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11: 2171-2182.

Pasbøll, J y P. Arctander (1998). Primers for animal mitochondrial DNA: the importance of species-specific primers. Pp. 248-255. En: A. Karp, P. G. Isaac y D. S. Ingram (eds.). *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals.* Chapman and Hall, Londres.

Paxinos, E., C. McIntosh, K. Ralls y R. Fleischer (1997). A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology*, 6, 483-486.

Pertoldi, C., M. Moller-Hansen, V. Loeschcke, A. B. Madsen, L. Jacobsen y H. Baagoe (2001). Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assessment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993. *Proceedings of the Royal Society of London Series B,* 268: 1775-1781.

Prendini, L., R. Hanner y R. DeSalle (2002). Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. Pp. 176-248. En: R. DeSalle, G. Giribet, W. Wheeler (eds.). *Techniques in Molecular Systematics and Evolution.* American Museum of Natural History. Nueva York.

Putman, R. J. (1984). Facts from faeces. *Mammal Review*, 14: 79-97.

Riddle A. E., K. L. Pilgrim, L. S. Mills, K. S. McKelvey y L. F. Ruggiero (2003). Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conservation Genetic*, 4, 241-243.

Roy, M. S., D. J. Girman, A. C. Taylor y R. K. Wayne (1994). The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct taxa. *Experientia*, 50: 551-557.

Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Schmerer, W. M., S. Hummel y B. Herrmann (1999). Optimised DNA extraction to improve reproductibility of short tandem repeat genotyping with highly degrated DNA as target. *Electrophoresis*, 20: 1712-1716.

Shedlock, A. M., M. G. Margo, T. W. Pietsch y P. Bentzen (1997). Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *BioThecniques*, 22: 394-400.

Sidransky, D., T. Tokino, S. R. Hamilton, K. W. Kinzler, B. Levin, P. Frost y B. Vogelstein (1992). Identification of ras mutations in the stool of patients with curable colorectable tumors. *Science*, 256: 102-105.

Singer-Sam, J. R., C. Tanguay y A. D. Rigs (1989). Use of Chelex to improve PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, 3: 11.

Sloane, M. A., P. Sunnucks, D. Alpers, L. B. Beheregaray y A. C. Taylor (2000). Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censuring method. *Molecular Ecology*, 9: 1233-1240.

Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits y J. Bouvet (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24: 3189-3194.

Taberlet, P., L. P. Waits y G. Luikart (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 323-327.

Thalmann, O., J. Hebler, H. N. Poinar, S. Pääbo y L. Viligant (2004). Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Molecular Ecology*, 13: 321-335.

Thomas, R. H., W. Schaffner, A. C. Wilson y S. Pääbo (1989). DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, 340: 465-467.

Valière, N. (2002). GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2: 377-379.

Valière, N., P. Berthier, D. Mouchiroud y D. Pontier (2002). GEMINI: software for testing the effects of genotyping errors and multitube approach for individual identification. *Molecular Ecology Notes*, 2: 83-86.

VandeVoort, A., L. E. Neville, T. L. Tollner y L. P. Field (1993). Noninvasive semen collection from an adult orangutan. *Zoo Biology*, 12: 257-265.

Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills y P. Shipley (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.

Vigilant, L. (1999). An evaluation of techniques for the extraction and amplification of DNA from naturally shed hairs. *Biological Chemistry*, 380: 1329-1331.

Vigilant, L., R. Pennington, H. Harpending, T. D. Kocher y A. C. Wilson (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from southern African populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 9359-9354.

VonBeroldingen, C. H., E. T. Blake, R. Higuchi, G. F. Sensabaugh y H. Erlich (1989). Applications of PCR to the analysis of biological evidence. Pp. 209-223. En: H. A. Erlich (ed.). *PCR Technolgy. Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, Nueva York.

Walsh, P. S., D. A. Metzger y R. Higuchi (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10: 506-513.

Wanderler, P., S. Smith, P. A. Morin, R. A. Pettifor y M. Funk (2003). Patterns of nuclear DNA degeneration over time – a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology*, 12: 1087-1093.

Wayne, R. K., J. A. Leonard y A. Cooper (1999). Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30: 457-477.

Whitehouse, A. M. y H. Harley (2001). Post-bottleneck genetic diversity of elephant population in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10: 2139-2149.

Wilber, J. M. y B. P. Dreher (2004). GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes*, 4: 783-785.

Yang, D. Y, B. Eng, J. S. Waye, J. C. Dudar y S. R. Saunders (1998) Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 105: 539-543.

Zardoya, R., D. M. Vollmer, C. Craddock, J. T. Streelman, S. Karl y A. Meyer (1996). Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 263: 1589-1598.