
TÉCNICAS DE MUESTREO NO INVASIVAS APLICADAS AL ESTUDIO GENÉTICO DE MAMÍFEROS

MAXIMILIANO NARDELLI, JUAN I. TÚNEZ, DANIELA CENTRÓN
y MARCELO H. CASSINI

RESUMEN

Este estudio pretendió evaluar las ventajas y desventajas del uso de diferentes tipos de muestras biológicas, obtenidas por medio de técnicas no invasivas, en el estudio genético de poblaciones de mamíferos. Se utilizaron muestras de heces, pelos, tejidos blandos de animales muertos y cueros y huesos de especímenes de museo con el fin de evaluar distintos protocolos de extracción de ADN y amplificación por PCR de diferentes fragmentos del ADN mitocondrial en tres especies de mamíferos. Se evaluó cualitativamente la eficiencia de cada procedimiento en

términos de la facilidad en la toma de muestras, el rendimiento en las amplificaciones y el costo y tiempo empleado en el procesamiento. Los resultados indican que la obtención de datos genéticos a partir de muestreos no invasivos puede ser costosa y laboriosa, pero la facilidad del muestreo comparando con los métodos convencionales, la disminución del estrés en los animales de estudio, y la eficiencia en la obtención de los datos, validarían estas técnicas como una alternativa aceptable para la realización de estudios genéticos.

La biología molecular está generando técnicas y procedimientos de análisis genético que se han convertido en herramientas muy útiles para una gran variedad de estudios en ecología y conservación. Estas técnicas permiten analizar las relaciones filogenéticas entre especies, inferir relaciones espaciales entre poblaciones dentro de una misma especie, y/o analizar el parentesco entre individuos. Algunas de sus aplicaciones específicas son la estimación de la tasa de dispersión entre poblaciones, la evaluación del riesgo de extinción de poblaciones locales o la interpretación evolutiva del comportamiento

social (Frankham *et al.*, 2002; Goossens y Bruford, 2009).

Las herramientas con que cuenta la biología molecular para contribuir al conocimiento en estas áreas son los denominados marcadores moleculares (Awise, 2004). Un marcador molecular es un punto de referencia en el genoma, que puede corresponder o no a un gen y permite medir directa o indirectamente la variabilidad genética entre individuos, poblaciones y/o especies (Frankham *et al.*, 2002; Awise, 2004).

Aunque en muchos hábitat la fauna silvestre no puede ser observada fácilmente, todos los animales dejan sig-

nos de su presencia y actividad, lo que ha permitido desarrollar técnicas no-invasivas de muestreo genético (Waits y Paetkau, 2005; González y Barbanti Duarte, 2007; Goossens y Bruford, 2009). Mediante la utilización de estas técnicas, pelos, plumas, heces, orina, cáscaras de huevo, escamas, tejido blando y duro de animales muertos, especímenes de museo y hasta fósiles, son potenciales fuentes de ADN (Beja-Pereira *et al.*, 2009). Por ejemplo, la extracción de ADN a partir de células intestinales que se encuentran en las heces ha permitido realizar estudios de determinación de especies (Pilot *et al.*, 2007; Morán *et al.*, 2008; Haag *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010) e identifi-

PALABRAS CLAVE / ADN / Amplificación / Extracción / Fuentes Alternativas / Marcadores Moleculares /

Recibido: 21/08/2010. Aceptado: 14/05/2011.

Maximiliano Nardelli. Licenciado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Luján (UNLu), Argentina. Docente, UNLu, Argentina. Becario, Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina. e-mail: machinardelli@yahoo.com.ar

Juan I. Túnez. Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina. Profesor, UNLu, Argentina. Dirección: Grupo de Estudios en Ecología de Mamíferos, Departamento de Ciencias Básicas, UNLu. Rutas 5 y 7 (6700), Luján, Provincia de Buenos Aires, Argentina. e-mail: nacho_tunez@yahoo.com.ar

Daniela Centrón. Doctora en Ciencias Biológicas, UBA, Argentina. Profesora, UBA, Argentina. Dirección: e-mail: dcentron@gmail.com

Marcelo H. Cassini. Doctor en Ciencias Biológicas, UBA, Argentina. Profesor, UNLu, Argentina. e-mail: mhccassini@yahoo.com.ar

cación de individuos (Brøseth *et al.*, 2009; Mondol *et al.*, 2009; Stenglein *et al.*, 2010), así como análisis de parentesco, variabilidad genética y filogeografía en numerosas especies (Duriez *et al.*, 2007; Centrón *et al.*, 2008; Cossíos *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2009).

El ADN amplificado a partir de muestras de pelo ha sido utilizado para establecer relaciones de paternidad (Field *et al.*, 1998; Goossens *et al.*, 1998; Constable *et al.*, 2001), para estudios filogeográficos (Goossens *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Huck *et al.*, 2008; Clevenger y Sawaya, 2010), como fundamento para estudios de captura-recaptura a gran escala, para estimar el tamaño poblacional (Frantz *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2009; Gardner *et al.*, 2010) o establecer el rango de hábitat de los individuos (Anderson *et al.*, 2006), y para la determinación del sexo (Pilgrim *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006; Huck *et al.*, 2008).

Los huesos, cueros y pieles de ejemplares de museo son otras fuentes de ADN. A pesar de que en este tipo de muestras el ADN se encuentra generalmente dañado (Pääbo *et al.*, 1989; Wandeler *et al.*, 2007), cuando se desea detectar cambios en una población a lo largo de un tiempo prolongado (Hofreiter *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2004; Wandeler *et al.*, 2007) o establecer relaciones filogenéticas entre especies o subespecies extintas y vivientes (Pergams y Lacy, 2007; Slater *et al.*, 2009), es común que éste sea el único tipo de material disponible. Por último, las muestras de piel, cuero, pelos y/o huesos de animales encontrados atropellados en los caminos o muertos en el campo son también una buena fuente de ADN.

La utilización de técnicas de muestreo no invasivas puede conducir a errores en la genotipificación de los individuos. Estos errores son provocados por la pequeña cantidad de ADN que se obtiene, la contaminación cruzada entre individuos, la degradación de la muestra al permanecer expuesta al ambiente por un periodo prolongado, la presencia de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, en algunos casos, por la incertidumbre acerca del animal del cual proviene la muestra (Hoffman y Amos, 2005; Caudron *et al.*, 2007). Hoy en día, estos inconvenientes son comprendidos y se han desarrollado diversas estrategias para limitarlos y reducir su impacto en los análisis posteriores (McKelvey y Schwartz, 2005; Broquet *et al.*, 2007; Zhan *et al.*, 2010).

El presente trabajo intenta ser una guía inicial para aquellos que estén interesados en incorporar, como complemento a los estudios a campo, estudios genéticos en sus líneas de investigación. El

TABLA I
MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Especie	Tipo	Fuente	Origen	n	Total fuente	Total tipo
<i>Lontra spp.</i>	Heces	Animal vivo	Bahía Lapataia	46	87	87
			Canal de Beagle	41		
	Pelo	Animal muerto	Bahía Lapataia	1	1	1
	<i>A. australis</i>	Tejido blando	Animal muerto	Cabo Polonio	36	41
Puerto Quequén				2		
Río Grande		1				
Canal de Beagle		2				
	Hueso	Museo	Tierra del Fuego	8	8	13
		Museo	Tierra del Fuego	13	13	
<i>C. lupus familiaris</i>	Pelo	Animal vivo	Doméstico	15	15	15

objetivo principal fue evaluar las ventajas y desventajas del uso de diferentes tipos de muestras biológicas, obtenidas por medio de técnicas no invasivas, en el estudio genético de poblaciones de mamíferos. Los objetivos específicos fueron: 1) aplicar distintas técnicas de extracción de ADN y amplificación por PCR a muestras de cueros, huesos, heces, pelos y tejidos blandos de animales muertos obtenidas mediante técnicas no invasivas; 2) evaluar estas técnicas en términos de la dificultad en la obtención de las muestras, el tiempo de procesamiento empleado en el laboratorio y el costo económico asociado, el rendimiento de las amplificaciones por PCR y el largo de los productos obtenidos, y 3) categorizar los distintos tipos de muestra utilizados en función de su eficiencia en la obtención de datos genéticos.

Materiales y Métodos

Muestras utilizadas

Se utilizaron 87 muestras de heces de nutrias del género *Lontra*, 46 provenientes de Bahía Lapataia (54°52'S, 68°32'O) y 41 del Canal del Beagle (68°23'-66°44'O) (Tabla I). Las heces de Bahía Lapataia fueron recolectadas por guardaparques durante los meses de octubre y noviembre de 2007, periodo durante el cual diferentes madrigueras del huillín, *Lontra provocax* (Thomas, 1908) fueron visitadas periódicamente. Las heces del Canal del Beagle fueron recolectadas por los autores entre los años 2006 y 2008. Las recolecciones fueron ocasionales, visitando posibles madrigueras y sitios aledaños, sin poderse determinar a priori si las heces recolectadas eran de huillín o de la nutria marina, *Lontra felina* (Molina, 1782). Todas las muestras fueron conservadas en etanol 70% sin poderse precisar el tiempo transcurrido desde la deposición hasta la recolección. Tres muestras de tejido provenientes de huillines hallados muertos, dos de ellos en el Parque Nacional Tierra del Fuego y el restante en

el Parque Nacional Nahuel Huapi, fueron utilizadas como controles positivos de las extracciones de ADN y reacciones de PCR.

Por otro lado, se utilizaron 62 muestras de lobo fino sudamericano, *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783); 49 de tejidos blandos (piel, músculo y/o hígado) y 13 de hueso (Tabla I). Las muestras de tejido blando provenían de 41 animales muertos encontrados en las costas de Cabo Polonio, Uruguay (34°24'S, 53°46'O), Puerto Quequén (38°32'S, 58°42'O), Río Grande (53°46'S, 67°41'O) y Canal de Beagle, y de ocho ejemplares de la colección del Museo del Fin del Mundo (Ushuaia, Tierra del Fuego). Las muestras de hueso fueron obtenidas de la colección del Museo Acatushún (Estancia Harberton, Tierra del Fuego). Sólo para las muestras recolectadas en Cabo Polonio se clasificó a los individuos según el estado de conservación del cadáver (recién muerto, con días de muerto, estado avanzado de descomposición y carcasa con cuero seco). Las muestras de tejidos blandos fueron conservadas en buffer de preservación de tejido (EDTA 0,25M pH 8, DMSO 20%, NaCl 6M). Las muestras provenientes del Museo del Fin del Mundo se conservaron a -20°C y las de huesos a 4°C.

Por último, se trabajó con 16 muestras de pelo. La primera fue tomada de uno de los huillines hallados muertos. Debido a la dificultad de obtener muestras de pelo de huillines y lobos finos mediante la utilización de trampas de pelo en el campo, y con el fin de poner a prueba si este tipo de muestras son una buena fuente de ADN, las restantes 15 muestras fueron obtenidas de perros domésticos, *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758), arrancando los pelos de raíz y simulando la utilización de una trampa de pelo (Tabla I).

Extracción de ADN

Heces. Se utilizó el protocolo descrito en Centrón *et al.* (2008) con modificaciones. En primer lugar, las heces fueron resus-

pendidas en una solución 1:2 de etanol absoluto y buffer CTAB (Tris-HCl 0,1M pH 8; NaCl 1,4M; EDTA 0,02M; CTAB 2%). El volumen resuspendido de heces fue aumentando sucesivamente hasta obtenerse una extracción exitosa del ADN. Se realizaron dos intentos con 1ml de heces resuspendidas, dos intentos con un volumen entre 1 y 3ml y por último se procedió a resuspender el resto del material disponible. En este último caso el material de partida varió entre 5 y 15ml. Las muestras resuspendidas fueron incubadas 2hs a 70°C y luego de ser enfriadas a temperatura ambiente fueron centrifugadas a 14000rpm por 10min. El sobrenadante fue sometido a extracción por el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). El pellet obtenido fue resuspendido en 180µl de buffer ATL (Qiagen), completándose la extracción utilizando el DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. El ADN obtenido fue secado a temperatura ambiente, resuspendido en 50-100µl de agua destilada y almacenado a -20°C sin cuantificar, ya que el extracto obtenido no sólo contenía ADN de nutria, sino también de las especies presa ingeridas y de los microorganismos provenientes del intestino del animal y del ambiente.

Tejidos blandos. Las muestras fueron disgregadas con la ayuda de un bisturí e incubadas durante una noche a 50°C en 1ml de buffer de extracción (TRIS-HCl 10mM pH 8; EDTA 0,1M; SDS 1%; RNasa A 10µg·ml⁻¹; Proteinasa K 100µg·ml⁻¹). Al día siguiente se completó la extracción por el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN obtenido fue secado a temperatura ambiente, resuspendido en 50-100µl de agua destilada, cuantificado por espectrofotometría y almacenado a -20°C. Las muestras se procesaron entre una y tres veces hasta utilizar todo el tejido disponible o hasta obtener un resultado positivo en la amplificación del ADN por PCR.

Huesos. Se utilizaron fragmentos de huesos de longitud <2cm, los cuales fueron congelados en N₂ líquido y triturados en un mortero. El polvo de hueso obtenido fue sometido a dos protocolos de extracción de ADN, uno que incluía un paso inicial de descalcificación y otro en que se saltaba éste paso. De las trece muestras utilizadas, nueve fueron procesadas con descalcificación previa, dos sin descalcificación y dos con ambos métodos, a fin de comparar la eficiencia de cada protocolo. La descalcificación consistió en mantener el polvo de hueso en 1ml de EDTA 0,5M a temperatura ambiente entre 9 y 12 días, renovando la solución cada tres días. Posteriormente, las muestras fueron incubadas

24h a 55°C en 500µl de buffer de extracción (TRIS-HCl 10mM pH 8; EDTA 0,1M; SDS 1%) con el agregado de proteína K 800µg·ml⁻¹). Por último, se completó la extracción utilizando el DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. El ADN obtenido fue resuspendido en 100µl de buffer AE y almacenado a -20°C. Debido al bajo rendimiento de las extracciones el ADN no fue cuantificado.

Pelos. Se utilizó una modificación del protocolo descrito en Anderson *et al.* (2006). Aproximadamente 0,5cm del extremo proximal de unos 10 a 20 pelos fueron incubados durante una noche a 55°C en 50µl de buffer TNES (Tris-HCl 50mM pH 8; NaCl 100mM, EDTA 2mM; Nonidet P-40 1%) con el agregado de proteína K 2mg·ml⁻¹). Al día siguiente se calentó la mezcla a 94°C para desnaturar la enzima. A fin de disminuir la concentración de proteína en el medio, se agregó a los pasos propuestos en Anderson *et al.* (2006) una extracción con fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Para determinar la eficacia de este procedimiento se cuantificó la relación ADN/proteína a 260/280nm en espectrofotómetro. El ADN fue resuspendido en 50-100µl de agua destilada y almacenado a -20°C.

Amplificación por PCR

Heces - L. provocax. Se llevó a cabo una reacción de PCR con el fin de amplificar un fragmento de 671pb del gen citocromo b del ADN mitocondrial. Los cebadores utilizados fueron el Hui-L, 5'-AGTAC-CATT CAGGCTTGAT-3' y el Hui-U, 5'-CATCTCAACATGATGAACTTC-3' (Centrón *et al.*, 2008). La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50µl. Cada tubo de reacción contenía 10µl del extracto de ADN sin cuantificar, 2,5mM MgCl₂, 1X de buffer de reacción, 0,1mM dNTPs, 1,25U de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 0,4µM de cada cebador, 0,1mg·ml⁻¹ BSA y agua destilada para completar el volumen de reacción. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturación inicial a 94°C por 3min; 35 ciclos de desnaturación a 94°C por 1min, *anillamiento* a 50°C por 30seg y extensión a 72°C por 1min; y una extensión final a 72°C por 5min. Para cada extracción de ADN se realizó un máximo de tres reacciones de PCR. Se probaron distintas cantidades de ADN, variando el volumen inicial de extracto utilizado. Al obtener un bajo número de muestras amplificadas con el uso de estos cebadores (ver resultados), se procedió al diseño de dos cebadores internos con el fin de que cada

uno de ellos pueda ser utilizado junto con uno de los cebadores externos para amplificar dos regiones en los extremos del fragmento de 671pb. Las secuencias de los cebadores internos fueron Hui-3, 5'-ATAG-TAAGTTAGTGATGACGG-3' y Hui-4, 5'-CTTTCCACTTTATTCTACC-3'. Hui-3 junto con Hui-U amplifican un fragmento de 318pb, mientras que Hui-4 junto con Hui-L amplifican uno de 247pb. Las concentraciones de reactivos y el protocolo utilizados en la PCR fueron los mismos utilizados en el ensayo previo, con la única diferencia de que para el par Hui-3/Hui-U se utilizó una temperatura de *anillamiento* de 48°C.

Al no aumentar el número de muestras amplificadas en forma considerable mediante la utilización de los dos cebadores internos (ver resultados) y con el objetivo de eliminar posibles inhibidores de la PCR, se realizó un nuevo lavado del extracto de ADN utilizando el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989) o el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Luego, el ADN fue reparado por medio de una PCR sin cebadores (Stemmer, 1994; Weber *et al.*, 2004), y amplificado mediante una PCR semi-anidada. Para la reparación del ADN, la PCR se realizó en un volumen final de 50µl, conteniendo 10µl de ADN y 40µl de la mezcla de reacción descrita arriba, pero sin cebadores, los cuales fueron reemplazados por un volumen igual de agua. El programa de reparación consistió en una desnaturación inicial a 94°C por 3min; 35 ciclos de desnaturación a 92°C por 1min, *anillamiento* a 50°C por 1min y extensión a 72°C por 1min, y una extensión final de 10min a 72°C. Para llevar a cabo el primer paso de la PCR semi-anidada fueron utilizados 10µl del producto de PCR obtenido, con el agregado de 40µl de mezcla de reacción, utilizando los cebadores Hui-U y Hui-L. Por último, el segundo paso de la PCR semi-anidada se llevó a cabo utilizando 45µl de mezcla de reacción conteniendo los cebadores Hui-3/Hui-U y 5µl del producto de amplificación obtenido en el primer paso de la PCR semi-anidada. Las concentraciones de los reactivos y el protocolo de ciclado utilizado en la PCR semi-anidada fueron los mismos que los utilizados previamente. Este protocolo fue utilizado en 14 muestras provenientes de Bahía Lapataia y en 38 muestras del Canal de Beagle. El resto de las muestras provenientes de Bahía Lapataia (n= 28) no fueron incluidas en este análisis ya que provenían de las mismas madrigueras (y presumiblemente de los mismos individuos) en las cuales se habían recolectado las 14 muestras analizadas. Las tres muestras restantes del Canal de Beagle no pudieron ser incluidas ya que el ADN proveniente de las mismas fue utilizado

completamente en las reacciones de PCR anteriores. Como control positivo de los procesos de amplificación se utilizó ADN de las muestras de tejidos blandos de huillín.

Tejidos blandos y huesos - A. australis. Se amplificó por PCR un fragmento de ADN correspondiente al extremo 3' del gen mitocondrial tRNA-Pro (63pb) y al extremo 5' adyacente de la región control (445pb), utilizando los cebadores; L16274, 5'-TACACTGGTCTTGTAACC-3' y H34, 5'-CCA-AATGCATGACACCACAG-3', descritos en Lamont *et al.* (1996). La PCR se llevó a cabo con las mismas concentraciones de reactivos utilizados para la amplificación del citocromo b en *L. provocax*, pero utilizando el protocolo de ciclado descrito en Túnez *et al.* (2007). En los casos en que luego de llevar a cabo dos reacciones de PCR no se obtuvo producto de amplificación, las extracciones de ADN fueron repetidas. Sólo para el ADN extraído de huesos se llevó a cabo un proceso de reparación utilizando una PCR sin cebadores y una PCR semi-anidada con el fin de amplificar un fragmento de 216pb de la región control. Para ello se diseñó el cebador Aa01, 5'-ATGCACGAAG-TACATAAG3', que junto con L16274 amplifica dicho fragmento. Se utilizó esta metodología suponiendo que el ADN obtenido de los huesos se encontraba en poca cantidad y posiblemente degradado.

Pelos - L. provocax y C. lupus familiaris. Para *L. provocax* se intentó amplificar los segmentos de 318 y 671pb descritos previamente, utilizando las mismas concentraciones de reactivos y los mismos protocolos de PCR. Para *C. lupus familiaris* se amplificó un fragmento de ADN correspondiente al extremo 3' del gen mitocondrial tRNA-Glu (50pb) y al extremo 5' adyacente del gen citocromo b (436pb), utilizando los cebadores L14724, 5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3' (Irwin *et al.* 1991) y H15149, 5'-AAACTGCAGCCCTCAGA-ATGATATTTGCTCTCA-3' (Kocher *et al.* 1989). Cada PCR se realizó en un volumen final de 50µl conteniendo 1µg·ml⁻¹ de ADN, 1X de buffer de reacción, 0,4mM de dNTPs, 0,5mg·ml⁻¹ de BSA, 2,5U de GoTaq polimerasa (Promega), 1mM de cada cebador, y agua hasta alcanzar en volumen final de reacción. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 10min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45seg, *anillamiento* a 50°C por 45seg y extensión a 72°C por 90seg; y una extensión final a 72°C por 8min.

De los productos de PCR obtenidos para cada especie y tipo de muestra, 20µl fueron corridos en un gel de agarosa 1% y visualizados bajo luz UV. Comprobada la amplificación, el resto de cada pro-

TABLA II
RENDIMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA LAS DISTINTAS ESPECIES SEGÚN EL TIPO Y FUENTE DE ADN UTILIZADA

Especie	Tipo	Fuente	Origen	n	Positivos	Rendimiento por fuente (%)
<i>Lontra spp.</i>	Heces*	Animal vivo	Bahía Lapataia	14	10	71,43
			Canal de Beagle	38	8	21,05
	Pelo	Animal muerto	Bahía Lapataia	1	1	100
<i>A. australis</i>	Tejido blando	Animal muerto	Cabo Polonio	36	20	48,78
			Puerto Quequén	2	0	
	Hueso†	Museo	Tierra del Fuego	8	0	0
		Museo	Tierra del Fuego	11	8	72,73
<i>C. lupus familiaris</i>	Pelo	Animal vivo	Doméstico	15	15	100

* El rendimiento corresponde a las muestras en que se utilizó el protocolo que incluía la reparación previa del ADN y la PCR semi-anidada.

† El rendimiento corresponde a las muestras tratadas con el protocolo que incluía la descalcificación previa de la muestra.

ducto fue purificado utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y enviado a un laboratorio externo donde se realizó la secuenciación de una de las hebras, mediante el uso de uno de los cebadores utilizados en la PCR. En ocasiones, se llevó a cabo una reacción de PCR adicional con el fin de acumular producto de amplificación con vistas a la secuenciación.

Resultados

Lontra provocax

Heces. Se logró amplificar el fragmento del citocromo b de 671pb en sólo dos (2,30%) de las 87 muestras analizadas, ambas de Bahía Lapataia. En ambos casos la amplificación positiva se obtuvo cuando la extracción del ADN se llevó a cabo a partir del volumen de partida máximo (5-15 ml). Luego de la secuenciación, se determinó que las muestras pertenecían a la especie *L. provocax*, comparando las secuencias obtenidas con la única publicada en el GenBank para la especie (acceso DQ341273.1). Las restantes 85 muestras fueron utilizadas para amplificar los dos extremos del fragmento de 671pb, utilizando los cebadores interiores diseñados para tal fin. Sólo se logró la amplificación positiva de ambos extremos en otras dos muestras de Bahía Lapataia (2,35%). El rendimiento aumentó notablemente cuando se realizó la reparación del ADN previamente a la amplificación, aunque se observaron diferencias entre las muestras provenientes de Bahía Lapataia y el Canal del Beagle. Para Bahía Lapataia, se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (318pb) en 10 de las 14 muestras analizadas (71,43%), mientras que para las muestras del Canal de Beagle, 8 de las 38 muestras analizadas (21,05%) dieron resultados positivos (Tabla II). En conjunto, el

rendimiento de esta técnica fue del 34,62%. Los 18 productos de PCR fueron secuenciados exitosamente y todas las secuencias correspondieron a *L. provocax*. No se observó variabilidad genética; se obtuvo sólo un haplotipo que coincide con el haplotipo más común publicado en Centrón *et al.* (2008).

Pelos. Utilizando la única muestra de pelo de huillín disponible, se logró amplificar exitosamente el fragmento de 318pb del gen citocromo b. La amplificación del fragmento de 671pb no fue posible.

Arctocephalus australis

Tejidos blandos. La medición de la relación ADN/proteína presentó valores de absorbancia que revelan la presencia de ADN, indicando que la extracción del ADN fue exitosa. La amplificación por PCR del fragmento de 508pb de la región control fue exitosa en 20 de las 41 muestras obtenidas de animales muertos (48,78%; Tabla II). Por el contrario, no se obtuvo ningún resultado positivo para las ocho muestras obtenidas de cueros de museo, aún cuando para todas estas muestras se llevaron a cabo tres extracciones de ADN diferentes y al menos dos reacciones de PCR por extracción. El rendimiento en las amplificaciones fue máximo (100%) cuando se utilizó el ADN extraído de individuos muestreados poco tiempo luego de la muerte, disminuyendo al aumentar el tiempo de descomposición (Tabla III).

Huesos. Se logró amplificar el fragmento de 216pb de la región control en ocho (61,54%) de las 13 muestras analizadas. Todas ellas fueron descalcificadas previamente a la extracción, lo que aumenta el rendimiento a un 72,73% (Tabla II). Ninguna de las cuatro muestras procesadas con el protocolo de extracción que no incluía la descalcificación previa pudo ser amplificada.

El ADN obtenido a partir de las 15 muestras de pelo de perro doméstico fue procesado satisfactoriamente, obteniéndose un rendimiento del 100% en la amplificación del fragmento del gen citocromo b de 480pb (Tabla II). Cuatro de los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados, determinándose que todos correspondían a la especie *C. lupus familiaris* al comparar las secuencias obtenidas con las publicadas en el GenBank (acceso AY729880.1).

Discusión

Rendimiento de las extracciones y amplificaciones

La amplificación del fragmento de 671pb del gen citocromo b en huillines dio como resultado un muy bajo rendimiento. Mediante el agregado de lavados durante la extracción del ADN y la reparación del mismo previa a la amplificación mediante una PCR semi-anidada de un segmento más corto, se logró aumentar el rendimiento desde 2,5 a 34,62%. Las heces provenientes de Bahía Lapataia arrojaron un rendimiento mayor (71,43%) que las muestras del Canal del Beagle (21,05%). Esta diferencia podría deberse al tiempo transcurrido entre la deposición y la recolección de las heces. Las heces de Bahía Lapataia eran, en general, más frescas que las recogidas en otras zonas. Distintos autores sugieren que las heces deben ser recolectadas tan pronto como sea posible luego de la deposición, ya que el rendimiento decae al aumentar el tiempo de exposición a la atmósfera y a la luz solar (Hofreiter *et al.*, 2001; Jensen-Seaman y Kidd, 2001; Piggott *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2007). La Tabla IV resume los resultados obtenidos por otros autores en estudios similares en los que se determinó o no el tiempo post-defecación. Los rendimientos son menores y mucho más variables en los estudios en los que no se determinó el tiempo post-defecación, mientras que el máximo rendimiento se alcanza cuando las heces son recolectadas dentro de las 24h post-defecación. Un segundo factor

TABLA III
RENDIMIENTO DE LA AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADNMIT EN *A. australis* SEGÚN EL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Estado	Rendimiento (%)
Recién muerto (n= 5)	100
Buen estado, con pocos días de muerto (n= 13)	83,33
Estado avanzado de descomposición (n= 10)	37,50
Carcasa con cuero seco (n= 8)	12,50

que influye en el rendimiento es el tamaño del fragmento de ADN a amplificar. El rendimiento será mayor al disminuir el tamaño del fragmento (Tabla IV). Otra posible explicación a los diferentes rendimientos obtenidos para las muestras de Bahía Lapataia y Canal de Beagle es la consistencia de las muestras. Las muestras de Bahía Lapataia eran más sólidas que las otras, por lo que producirían un mayor efecto de raspado sobre el intestino, arrastrando así un mayor número de células intestinales. Esta diferencia en la consistencia de las heces sería producto de la dieta. En la zona de Bahía

TABLA IV
RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LA AMPLIFICACIÓN POR PCR A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO POST-DEFECACIÓN

Tiempo post-defecación	Porción amplificada (pb)	Rendimiento (%)	Referencia
Inmediato	537	94,34	Gerloff <i>et al.</i> (1999)
1 hora	700	100	Wasser <i>et al.</i> (1997)
12 horas	516	91	Hung <i>et al.</i> (2004)
1 día	485	100	Jensen-Seaman y Kidd (2001)
<2 semanas	630	96	Fernando <i>et al.</i> (2000)
Sin estimar	130-161	98,67	Palomares <i>et al.</i> (2002)
Sin estimar	135-347	80	Kurose <i>et al.</i> (2005)
Sin estimar	200	78	Prugh y Ritland (2005)
Sin estimar	146	59	Farrel <i>et al.</i> (2000)
Sin estimar	520	24,9	Murakami (2002)
Sin estimar	250	24	Reed <i>et al.</i> (2004)
Sin estimar	671	22,67	Centrón <i>et al.</i> (2008)
Sin estimar	516	8,67	Centrón <i>et al.</i> (2008)

Lapataia, el huillín consume mayoritariamente peces, mientras que en la costa sur de Tierra del Fuego la dieta se basa en crustáceos (Gozzi, 2008).

En el caso de *A. australis*, el rendimiento obtenido a partir de las muestras de tejido blando de animales muertos fue medio (48,78%). Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta el estado de preservación que presentaban los cadáveres al momento del muestreo. Muestras extraídas de animales recientemente muertos presentaron un rendimiento del 100% en la extracción del ADN y la amplificación, mientras que el rendimiento decayó a un 12,5% cuando el ADN fue extraído a partir de carcasas secas, coincidiendo con lo presentado por otros autores (Hofreiter *et al.*, 2001).

Los huesos de *A. australis* arrojaron un rendimiento aceptable cuando se ensayó el protocolo con descalcificación previa (72,73%), mostrando que el ADN contenido en estos se conserva en mayor medida que en el resto de los tejidos luego de la muerte del animal (Pruvost *et al.*, 2007). Por otro lado, no se ha podido amplificar el ADN extraído a partir de cueros de la especie obtenidos de colecciones

de museos. La falla en la amplificación de este tipo de muestras podría deberse al tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la toma de la muestra o a que los cueros fueron curados en el museo para su mejor preservación, lo que no pudo ser determinado a priori, y que influye en la cantidad de ADN extraíble de la muestra (Schander y Kenneth, 2003; Wandeler *et al.*, 2007).

Los pelos de huillín y perro doméstico resultaron ser una muy buena fuente de ADN en buen estado de conservación. La extracción del ADN utilizando el protocolo propuesto por Anderson *et al.* (2006) fue efectiva, y la purificación adicional del ADN por el método de fenol-cloroformo aumentó la pureza del ADN obtenido. La cantidad de ADN extraído y su calidad fue suficiente para poder amplificar con un rendimiento del 100% dos fragmentos del gen citocromo b de 318 y 480pb en huillines y perros, respectivamente.

Así, nuestros resultados sugieren que los pelos obtenidos mediante la utilización de trampas diseñadas para tal fin podrían ser una fuente confiable de ADN para realizar estudios de determinación de especie y estructura genética.

Ventajas y desventajas del uso de los distintos tipos de muestras

Los distintos tipos de muestras utilizados en este estudio presentan ventajas y desventajas en su uso. A continuación se resumen algunas de ellas en términos de la dificultad en la adquisición de las muestras, el tiempo de procesamiento empleado en el laboratorio y el costo asociado, el rendimiento de las amplifi-

caciones y el largo de los productos de PCR obtenidos. En la Tabla V se evalúa cualitativamente la eficiencia en el uso de los distintos tipos de muestras, estimada teniendo en cuenta el resultado obtenido en cada una de las etapas de trabajo.

En el caso de las heces, el muestreo es sencillo. Las muestras son generalmente conspicuas y, cuando se trabaja con animales territoriales, se pueden visitar periódicamente sitios claves con el fin de obtener muestras frescas, necesarias para obtener un mayor rendimiento. Sin embargo, la determinación de la especie de la cual proviene la muestra es en ocasiones dificultosa, sobre todo cuando se trabaja en áreas en las cuales conviven especies emparentadas. El análisis genético es laborioso y su costo elevado. Las extracciones de ADN requieren del uso de un kit comercial, y en muchos casos el ADN obtenido se encuentra degradado y en pequeñas cantidades. En cuanto a las ampliificaciones, la necesidad de reparar previamente el ADN y de realizar una PCR semi-anidada requiere de tres reacciones de PCR por cada muestra. Si bien las secuencias obtenidas fueron cortas y el rendimiento general no fue óptimo, el rendimiento para las muestras de Bahía Lapataia, donde las heces eran más frescas, fue aceptable y comparable a los rendimientos obtenidos por otros autores en condiciones similares (Farrrel *et al.*, 2000; Kurose *et al.*, 2005; Prugh y Ritland, 2005). A pesar de las dificultades mencionadas, las heces pueden ser consideradas una buena fuente alternativa de ADN, con una eficiencia media.

El muestreo de tejidos blandos de animales muertos puede considerarse de una dificultad media a elevada, dependiendo de las características del animal de estudio. Existen algunos ejemplos particulares. Los lobos y leones marinos, que forman colonias donde la mortalidad de crías es alta durante la temporada reproductiva, posibilitan la recolección de muestras de este tipo en las cercanías de las colonias. También existen sitios donde la muerte de mamíferos silvestres en las carreteras es un problema serio de conservación (Bennett, 1991; Trombulak y Frisell, 2000), pero que al mismo tiempo puede proveer de muestras para estudios genéticos. Una de las ventajas del uso de este tipo de muestras radica en su bajo tiempo de procesamiento y el bajo costo asociado. La extracción del ADN y la ampliificación por PCR se llevan a cabo utilizando métodos convencionales que no requieren de mucho tiempo e insumos, pu-

TABLA V
EFICIENCIA EN LA OBTENCIÓN DE DATOS GENÉTICOS UTILIZANDO
DISTINTOS TIPOS DE MUESTRAS NO-INVASIVAS

Muestra	Obtención	Tiempo empleado	Costo	Rendimiento	Producto obtenido	Eficiencia
Heces	Sencilla	Alto	Elevado	Medio	Corto	Media
Tejido blando	Media/Difícil	Bajo	Bajo	Medio	Largo	Alta
Huesos	Sencilla	Alto	Elevado	Elevado	Corto	Media
Pelo	Difícil	Bajo	Bajo	Elevado	Medio/Largo	Alta

diéndose procesar un buen número de muestras en pocos días. Este tipo de muestras es la que rinde mayor cantidad de ADN. Como los resultados sugieren, el rendimiento de la ampliificación por PCR dependerá del tiempo transcurrido entre la muerte del animal y el muestreo. Una ventaja adicional del uso de este tipo de muestras es que las secuencias obtenidas pueden ser de varios cientos de nucleótidos. En resumen, la eficiencia del método una vez conseguidas las muestras es elevada. Por otro lado, los tejidos blandos provenientes de especímenes de museo no resultaron ser una buena fuente de ADN, aunque sí lo han sido en otros estudios (Shiozawa *et al.*, 1992; Bouzat *et al.*, 1998; Greenwood *et al.*, 1999; Hofreiter *et al.*, 2003; Wandeler *et al.*, 2007).

La adquisición de muestras de huesos es sencilla, siempre y cuando existan colecciones de la especie de interés. Las colecciones son una valiosa fuente de ADN antiguo cuando se requiere realizar comparaciones temporales. Sin embargo, el tiempo de procesamiento y el costo son elevados. La extracción del ADN requiere la descalcificación previa de la muestra y la utilización de un kit comercial. El ADN obtenido se encuentra generalmente dañado y en poca cantidad, por lo que es necesario realizar la reparación del mismo previa a la ampliificación por PCR. El rendimiento de las ampliificaciones fue elevado, aunque se amplificaron fragmentos cortos.

Por último, los pelos arrancados pueden considerarse como una buena fuente de ADN, aunque el muestreo requiere de una logística mayor comparando con el muestreo de heces. Los pelos desprendidos son difíciles de ver a simple vista y, en ciertas ocasiones, es complicada la determinación de la especie de la cual provienen (Piggott y Taylor, 2003). Además, si se recolectan varios pelos en un mismo sitio es posible que se incluyan en una misma muestra pelos de distintos animales. El diseño de trampas de pelo es una opción a tener en cuenta, ya que a partir de pelos arrancados se obtiene ADN en muy buen estado (Waits y Paetkau, 2005; Anderson *et al.*, 2006). Los costos de procesamiento y económicos son bajos.

El protocolo de extracción de ADN requiere de pocos pasos, disminuyendo los riesgos de contaminación y pérdida de ADN (Piggott y Taylor, 2003). La ampli-

ficación por PCR es sencilla, obteniéndose secuencias de una longitud media a larga. El rendimiento fue máximo y la eficiencia alta, por lo que se puede considerar que las muestras de pelo serían la alternativa más recomendable al momento de plantear un estudio genético en mamíferos mediante la utilización de técnicas de muestreo no-invasivas.

En resumen, la obtención de ADN por técnicas de muestreo no-invasivas mostró ser una alternativa aceptable a la obtención por técnicas invasivas. Hoy en día se va en camino a que las técnicas de muestreo no-invasivas reemplacen a las técnicas invasivas, principalmente cuando los estudios se realizan en especies evasivas, en peligro de extinción o donde el muestreo de individuos vivos se hace imposible debido a las características adversas del hábitat. La obtención de datos genéticos a partir de muestras obtenidas por métodos no-invasivos, aunque en ocasiones más costosa y laboriosa que la obtención por métodos convencionales, disminuye el riesgo para los animales de estudio y compensa el trabajo y la inversión que requiere la logística para la obtención de muestras de animales vivos por medio de capturas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a RN Prosser de Goodall, HL Cappozzo, C Chehébar, G Porro, L Malmierca, E Gallo, C Gozzi, J Gómez, L Rigacci y Nelsy, por proporcionar la mayoría de las muestras utilizadas en este estudio; a BA Ramírez y JP Ferro, por su colaboración en el trabajo de laboratorio. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP-05489), la Darwin Initiative del Reino Unido y el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján. JIT fue financiado por una beca postdoctoral de CONICET. MHC y DC son investigadores del CONICET.

REFERENCIAS

Anderson HM, McCafferty DJ, Saccheri JJ, McCluskie AE (2006) Non-invasive genetic sampling of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) using hairs. *Hystrix It. J. Mamm.* 17: 65-77.

- Avise JC (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2^a ed. Sinauer. Sunderland, MA, EEUU. 541 pp.
- Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G (2009) Advancing ecological understandings through technological transformations in non-invasive genetics. *Mol. Ecol. Resour.* 9: 1279-1301.
- Bennett AF (1991) Roads, roadsides and wildlife conservation: a review. En Saunders DA, Hobbs RJ (Eds.) *Nature Conservation 2: the Role of Corridors*. Surrey Beatty. Chipping Norton, Australia. pp 99-117.
- Bouzat JL, Lewin HA, Paige KN (1998) The ghost of genetic diversity past: historical DNA analysis of the greater prairie chicken. *Am. Nat.* 152: 1-6.
- Broquet T, Ménard N, Petit E (2007) Non-invasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Cons. Genet.* 8: 249-260.
- Brøseth H, Flagstad Ø, Wårdig C, Johansson M, Ellegren H (2009) Large-scale non-invasive genetic monitoring of wolverines using scats reveals density dependent adult survival. *Biol. Cons.* 143: 113-120.
- Caudron AK, Negro SS, Müller CG, Boren LJ, Gemmell NJ (2007) Hair sampling and genotyping from hair follicles: a minimally-invasive alternative for genetics studies in small, mobile pinnipeds and other mammals. *Mar. Mamm. Sci.* 23: 184-192.
- Centrón D, Ramírez B, Fasola L, MacDonald DW, Chéhébar C, Schiavini A, Cassini MH (2008) Diversity of mtDNA in southern river otter (*Lontra provocax*) from Argentinean Patagonia. *J. Hered.* 99: 198-201.
- Clevenger AP, Sawaya MA (2010) Piloting a non-invasive genetic sampling method for evaluating population-level benefits of wildlife crossing structures. *Ecol. Soc.* 15: 7-30.
- Constable JJ, Ashley MV, Goodall J, Pusey AE (2001) Non-invasive paternity assignment in Gombe chimpanzees. *Mol. Ecol.* 10: 1279-1300.
- Cossios D, Lucherini M, Ruiz-García M, Angers B (2009) Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). *Evol. Biol.* 9: 68-81.
- Duriez O, Sacht JM, Ménoni E, Pidancier N, Miquel C, Taberlet P (2007) Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mountains? *Cons. Genet.* 8: 513-526.
- Farrel LE, Roman J, Sunquist ME (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol. Ecol.* 9: 1583-1590.
- Fernando P, Pfrender ME, Encalada SE, Lande R (2000) Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. *Heredity* 84: 362-372.
- Field D, Chemnick L, Robbins M, Garner K, Ryder O (1998) Paternity determination in captive lowland gorillas and orangutans and wild mountain gorillas by microsatellite analysis. *Primates* 39: 199-209.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, RU. 617 pp.
- Frantz AC, Schaul M, Pope LC, Fack F, Schley L, Müller CP, Roper TJ (2004) Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. *J. Appl. Ecol.* 41: 985-995.
- Gardner B, Royle JA, Wegan MT, Rainbolt RE, Curtis PD (2010) Estimating black bear density using DNA data from hair snares. *J. Wildl. Manag.* 74: 318-325.
- Gerloff U, Hartung B, Fruth B, Omán G, Tautz D (1999) Intracommunity relationships, dispersal pattern and paternity success in a wild living community of Bonobos (*Pan paniscus*) determined from DNA analysis of faecal samples. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1189-1195.
- González S, Barbanti Duarte JM (2007) Non-invasive methods for genetic analysis applied to ecological and behavioural studies in Latino-America. *Rev. Bras. Zootec.* 36: 89-92.
- Goossens B, Bruford MW (2009) Non-invasive genetic analyses in conservation. En Bertorelle G, Bruford MW, Hauffe HC, Rizzoli A, Vernesi C (Eds.) *Population Genetics for Animal Conservation*. Cambridge University Press. Cambridge, RU. pp 167-201.
- Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D (1998) Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43: 281-288.
- Goossens B, Chikhi L, Jalil MF, Ancrenaz M, Lackman-Ancrenaz I, Mohamed M, Andau P, Bruford MW (2005) Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orangutan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. *Mol. Ecol.* 14: 441-456.
- Gozzi AC (2008) *Composición de la Alimentación del Huillín, Lontra provocax, en Bahía Lapataia, Tierra del Fuego*. Tesis. Universidad Nacional de Luján. Argentina. 63 pp.
- Greenwood AD, Capelli C, Possnert G, Pääbo S (1999) Nuclear DNA sequences from late pleistocene megafauna. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1466-1473.
- Haag T, Santos AS, DeAngelo C, Srbeak-Araujo AC, Sana DA, Morato RG, Salzano FM, Eizirik E (2009) Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. *Genetica* 136: 505-512.
- Hoffman JI, Amos W (2005) Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol. Ecol.* 14: 599-612.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S (2001) Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2: 353-359.
- Hofreiter M, Siedel H, Van Neer W, Vigilant L (2003) Mitochondrial DNA sequence from an enigmatic gorilla population (*Gorilla gorilla uellensis*). *Am. J. Phys. Anthropol.* 121: 361-368.
- Huck M, Frantz AC, Dawson DA, Burke T, Roper TJ (2008) Low genetic variability, female-biased dispersal and high movement rates in an urban population of Eurasian badgers *Meles meles*. *J. Anim. Ecol.* 77: 905-915.
- Hung CM, Li SH, Lee LL (2004) Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two streams systems in Kinmen. *Anim. Cons.* 7: 301-311.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.
- Jensen-Seaman MI, Kidd KK (2001) Mitochondrial DNA variation and biogeography of eastern gorillas. *Mol. Ecol.* 10: 2241-2247.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards S, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.
- Kurose N, Masuda R, Tataru M (2005) Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: A non-invasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan. *J. Hered.* 96: 688-697.
- Lamont MM, Vida JT, Harvey JT, Jeffries S, Brown R, Huber HH, DeLong R, Thomas WK (1996) Genetic substructure of the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) off Washington, Oregon and California. *Mar. Mamm. Sci.* 12: 402-413.
- McCarthy TM, Waits LP, Mijidodj B (2009) Status of the Gobi bear in Mongolia as determined by non-invasive genetic methods. *Ursus* 20: 30-38.
- McKelvey KS, Schwartz MS (2005) DROPOUT: a program to identify problem loci and samples for non-invasive genetic samples in a capture-mark-recapture framework. *Mol. Ecol. Notes* 5: 716-718.
- Mondol S, Karanth KU, Kumar NS, Gopalaswamy AM, Andheira A, Ramakrishnan U (2009) Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biol. Cons.* 142: 2350-2360.
- Morán S, Turner PD, O'Reilly C (2008) Non-invasive genetic identification of small mammal species using real-time polymerase chain reaction. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 1267-1269.
- Murakami T (2002) Species Identification of Mustelids by Comparing Partial Sequences on Mitochondrial DNA from fecal samples. *J. Hered.* 96: 688-697.
- Murphy MA, Kendall KC, Robinson A, Waits LP (2007) The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Cons. Genet.* 8: 1219-1224.
- Oliveira R, Castro D, Godinho R, Luikart G, Alves PC (2010) Species identification using a small nuclear gene fragment: application to sympatric wild carnivores from South-western Europe. *Cons. Genet.* 11: 1023-1032.
- Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC (1989) Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction: The emerging field of molecular archaeology. *J. Biol. Chem.* 264: 9709-9712.
- Palomares F, Godoy JA, Piriz A, O'Brien SJ, Johnson WE (2002) Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Mol. Ecol.* 11: 2171-2182.
- Pergams ORW, Lacy RC (2007) Rapid morphological and genetic change in Chicago-area *Peromyscus*. *Mol. Ecol.* 17: 450-463.
- Pichler FB, Dalebout ML, Baker CS (2001) Non-destructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw. *Mol. Ecol. Notes* 1: 000-000.
- Piggott M, Taylor AC (2003) Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. *Wildl. Res.* 30: 1-13.
- Piggott M, Bellemain E, Taberlet P, Taylor A (2004) A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite am-

- plification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Cons. Genet.* 5: 417-420.
- Pilgrim KL, McKelvey KS, Riddle AE, Schwartz MK (2005) Felid sex identification based on non-invasive genetic samples. *Mol. Ecol. Notes* 5: 60-61.
- Pilot M, Gralak B, Goszczyński J, Postuszny M (2007) A method of genetic identification of pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) and its application to faecal samples. *J. Zool.* 271: 140-147.
- Prugh LR, Ritland CE (2005) Molecular testing of observer identification of carnivore feces in the field. *Wildl. Soc. Bull.* 33: 189-194.
- Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, Champlot S, Braguier S (2007) Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 104: 739-744.
- Reed JE, Baker RJ, Ballard WB, Kelly BT (2004) Differentiating Mexican gray wolf and coyote scats using DNA analysis. *Wildl. Soc. Bull.* 32: 685-692.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor Press. New York, EEUU. 1659 pp.
- Schander C, Kenneth HM (2003) DNA, PCR and formalinized animal tissue - a short review and protocols. *Org. Div. Evol.* 3: 195-205.
- Shiozawa DK, Kudo J, Evans RP, Woodward SR, Williams SR (1992) DNA extraction from preserved trout tissues. *Gt. Basin Nat.* 52: 29-34.
- Slater GJ, Thalmann O, Leonard JA, Schweizer RM, Koepfli KP, Pollinger JP, Rawlence NJ, Austin JJ, Cooper A, Wayne RK (2009) Evolutionary history of the Falklands wolf. *Curr. Biol.* 19: 937-938.
- Stemmer WPC (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751.
- Stenglein JL, Waits LP, Ausband DE, Zager P, Mack CM (2010) Efficient, non-invasive genetic sampling for monitoring reintroduced wolves. *J. Wildl. Manag.* 74: 1050-1058.
- Trombulak SC, Frissell CA (2000) Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. *Cons. Biol.* 14: 18-30.
- Túnez JI, Centrón D, Cappozzo HL, Cassini MH (2007) Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). *Mamm. Biol.* 4: 193-203.
- Waits LP, Paetkau D (2005) Non-invasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *J. Wildl. Manag.* 69: 1419-1433.
- Wandeler P, Hoeck PA, Keller LF (2007) Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 22: 634-642.
- Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd GG, Fain SR (1997) Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol. Ecol.* 6: 1091-1097.
- Weber DS, Stewart BS, Lehman N (2004) Genetic consequences of a severe population bottleneck in the Guadalupe fur seal (*Arctocephalus townsendi*). *J. Hered.* 95: 144-153.
- Williams BW, Etter DR, Linden DW, Millenbah KF, Winterstein SR, Scribner KT (2009) Non-invasive hair sampling and genetic tagging of co-distributed fishers and american martens. *J. Wildl. Manag.* 73: 26-34.
- Zhan X, Zheng X, Bruford MW, Wei F, Tao Y (2010) A new method for quantifying genotyping errors for non-invasive genetic studies. *Cons. Genet.* 11: 1567-1571.
- Zhang B, Li M, Zhang Z, Goossens B, Zhu L, Zhang S, Hu J, Bruford MW, Wei F (2007) Genetic viability and population history of the giant panda, putting an end to the "evolutionary dead end"? *Mol. Biol. Evol.* 24: 1801-1810.

NON-INVASIVE SAMPLING TECHNIQUES APPLIED TO THE GENETIC STUDY OF MAMMALS

Maximiliano Nardelli, Juan I. Túnez, Daniela Centrón and Marcelo H. Cassini

SUMMARY

This study aimed to evaluate the advantages and disadvantages of the use of different types of biological samples obtained by non-invasive sampling techniques, in the genetic study of mammal populations. Samples of scats, hair, soft tissues of dead animals and furs and bones from museum specimens were used to evaluate different protocols of DNA extraction and PCR amplification of several mitochondrial DNA fragments in three species of mammals. The efficiency of each procedure was

evaluated qualitatively in terms of sampling simplicity, the yield of the amplifications, and costs and time employed in the processing of samples. Results indicate that obtaining genetic data from non-invasive sampling techniques can be economically costly and laborious, but the sampling simplicity compared with conventional methods, the diminution of the animals' stress, and the efficiency in obtaining data, would validate these techniques as an acceptable alternative for genetic studies.

TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM NÃO INVASIVAS APLICADAS AO ESTUDO GENÉTICO DE MAMÍFEROS

Maximiliano Nardelli, Juan I. Túnez, Daniela Centrón e Marcelo H. Cassini

RESUMO

Este estudo procurou avaliar as vantagens e desvantagens do uso de diferentes tipos de amostras biológicas, obtidas por meio de técnicas não invasivas, no estudo genético de populações de mamíferos. Utilizaram-se amostras de fezes, pêlos, tecidos brandos de animais mortos e couros e ossos de espécimes de museu com o fim de avaliar distintos protocolos de extração de ADN e amplificação por PCR de diferentes fragmentos do ADN mitocondrial em três espécies de mamíferos. Avaliou-se qualitativamente a eficiência de cada procedimento em termos

da facilidade na toma de amostras, o rendimento nas amplificações e o custo e tempo empregado no processamento. Os resultados indicam que a obtenção de dados genéticos a partir de amostragens não invasivas pode ser custosa e laboriosa, mas a facilidade da amostragem comparando com os métodos convencionais, a diminuição do estresse nos animais de estudo, e a eficiência na obtenção dos dados, validariam estas técnicas como uma alternativa aceitável para a realização de estudos genéticos.