

Análise genética não invasiva em conservação

BENOÎT GOOSSENS E MICHAEL W. BRUFORD

INTRODUÇÃO

Um componente chave do surgimento da genética da conservação como uma subdisciplina reconhecível da biologia da conservação nos últimos dez anos tem sido o desenvolvimento de métodos para avaliar geneticamente e monitorar populações de espécies ameaçadas de forma não invasiva. O rápido desenvolvimento de metodologias para garantir a captura precisa de dados moleculares de organismos esquivos, facilmente estressados ou potencialmente perigosos (!) e preocupações com a precisão dos dados produzidos levaram a uma série de excelentes revisões sobre o assunto nos últimos anos. vezes (por exemplo, Taberlet et al. 1999; Taberlet e Luikart 1999; Piggott e Taylor 2003; Woodruff 2003; Wayne e Morin 2004). Aqui, revisaremos as questões e as amplas aplicações da análise genética não invasiva, sem nos concentrarmos detalhadamente nos aspectos técnicos moleculares.

Por que genética não invasiva?

Antes do advento da genética não invasiva e da utilização de subprodutos animais, como fezes, pêlos, penas, ossos, escamas de peixe, dentes, etc., a obtenção de material genético de populações selvagens era muitas vezes eticamente (em particular para espécies listadas como ameaçadas e criticamente ameaçadas de acordo com os regulamentos da CITES) e logisticamente extremamente difíceis. Agora, tal análise é cada vez mais possível e a amostragem de grandes populações sem contacto visual/físico é particularmente benéfica para espécies ameaçadas ou se as espécies estudadas puderem transmitir ou forem susceptíveis a doenças (por exemplo, espécies de grandes símios cujos agentes patogénicos são muitas vezes extremamente semelhantes aos do pesquisadores que os estudam). Num século em que a ligação entre comportamento, estrutura social, dispersão e estrutura genética populacional se tornou um novo desafio para os geneticistas conservacionistas, o desenvolvimento de amostragem e genotipagem não invasivas proporcionou a oportunidade de explorar estas ligações e abriu dramaticamente novas áreas de investigação.

Genética Populacional para Conservação Animal, eds. G. Bertorelle, MW Bruford, HC Hauffe, A. Rizzoli e C. Vernesi. Publicado pela Cambridge University Press. © Cambridge University Press 2009.

A caracterização de material não invasivo usando marcadores moleculares permite aos biólogos identificar e contar indivíduos em populações selvagens, identificar o sexo desses indivíduos e determinar seus padrões de movimento, inferir parentesco, parentesco e parentesco, e avaliar patógenos e dieta (ver Kohn e Wayne 1997 para uma revisão). A possibilidade desta abordagem chamou a atenção pela primeira vez quando Higuchi e colegas demonstraram que raízes individuais de cabelo humano poderiam fornecer DNA suficiente para análise genética molecular (Higuchi et al. 1988), graças à reação em cadeia da polimerase (PCR). Após esta descoberta, Morin e colegas foram os primeiros a aplicar este método a cabelos recolhidos na natureza, estudando a paternidade numa população selvagem de chimpanzés (*Pan troglodytes*) na Tanzânia (Morin e Woodruff 1992; Morin et al. 1994c) e o fluxo genético entre populações de chimpanzés na África (Morin et al. 1994b). Então, muito rapidamente, durante a década de 1990, fontes alternativas de DNA começaram a ser exploradas numa diversidade de organismos: por exemplo, fezes em mamíferos terrestres (Gerloff et al. 1995) e marinhos (por exemplo, Reed et al. 1997; Valsecchi et al. 1998).), aves (Pearce et al. 1997) e répteis (Bricker et al. 1996).

Posteriormente, vários estudos começaram a combinar e comparar os dados de diferentes tipos de amostras não invasivas: por exemplo, pêlos e fezes derramados/arrancados (Taberlet et al. 1997; Bayes et al. 2000; Smith et al. 2000; Constable et al. 2001; Surpreendentemente, no entanto, até à data, relativamente poucos estudos foram realizados utilizando amostragem populacional exaustiva apenas com material não invasivo, possivelmente devido às restrições financeiras e logísticas envolvidas na recolha e processamento de grandes números de amostras desta forma (mas ver , por exemplo, Buchan et al. No entanto, tais abordagens permanecem perfeitamente viáveis e tornar-se-ão comuns na literatura num futuro próximo.

Quais são as aplicações?

No nível populacional e abaixo dele, o uso de marcadores genéticos como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Knapp 2005), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), microssatélites, minissatélites e DNA mitocondrial com amostras não invasivas pode ser aplicado em um uma miríade de contextos (ver Tabela 8.1 para uma lista mais exaustiva de exemplos), tais como identificação individual (revisões em: Taberlet e Luikart 1999, Waits et al. 2001), identificação de espécies (Symondson 2002 para uma revisão; Teletchea et al. 2005), exclusão e atribuição de ascendência (Jones e Ardren 2003 para uma revisão), padrões de parentesco e parentesco (Ross 2001 para uma revisão), padrões de dispersão e movimentos individuais (genotipagem no espaço e no tempo; Gagneux et al. 2001), inferindo população estrutura

Tabela 8.1 Aplicações da genética não invasiva na conservação com exemplos retirados da literatura

Aplicativos	Exemplos e referências
Identificação individual	Vombate de nariz peludo (Sloane et al. 2000)
Identificação de espécies	Espécies de mustelídeos (Hansen e Jacobsen 1999; Lopez-Giraldez et al. 2005); espécies de canídeos (Paxinos et al. 1997; Davison et al. 2002; Dale'n et al. 2004; Reed et al. 2004); espécies de focas (Reed et al. 1997); espécies de cervos (Galan et al. 2005); macrópodes (Alacs et al. 2003); Tigre chinês (Wan et al. 2003)
Parentesco	Orangotango de Sumatra (Utami et al. 2002); chimpanzé (Morin et al. 1994b, c; Gagneux et al. 1997a, 1999; Constable et al. 2001; Vigilant et al. 2001); rinoceronte negro (Garnier et al. 2001); Elefante asiático (Fernando et al. 2000)
Relacionamento e parentesco	Águia imperial oriental (Rudnick et al. 2005); bonobos (Gerloff et al. 1999); chimpanzés (Mitani et al. 2000; Vigilant et al. 2001)
Sistema de dispersão	Vombate comum (Banks et al. 2002); bonobos (Gerloff et al. 1999); chimpanzés (Morin et al. 1994b; Gagneux et al. 2001)
Movimentos individuais	Urso pardo (Taberlet et al. 1997); Langur Hanuman (Launhardt et al. 2001)
Estrutura populacional	Antechinus agilis (Kraaijeveld-Smit et al. 2002)
Atribuição de população	Albatroz-de-pés-pretos (Walsh e Edwards 2005); lobos (Randi e Lucchini 2002); Íbex alpino (Maudet et al. 2002); Elefante africano (Wasser et al. 2004)
Filogeografia	Elefante africano (Eggert et al. 2002); Asiático elefante (Fernando et al. 2000); urso pardo (Taberlet e Bouvet 1994)
Tamanho efetivo da população	Urso pardo (Bellemain et al. 2005); Luisiana urso preto (Triant et al. 2004); lobo cinzento (Creel et al. 2003); salmão chinook (Shrimpton e Heath 2003)
Censo e captura/recaptura de babuíno de Savannah	Storz et al. 2002; texugo (Wilson et al. 2003); coiote (Kohn et al. 1999; Prugh et al. 2005); Vombate de nariz peludo do norte (Banks et al. 2003); rinoceronte negro (Cunningham et al. 2001)
Efeitos de hibridização e monitoramento de hibridização	Lobo vermelho e coiote (Adams et al. 2003); Lince e lince canadense (Schwartz et al. 2004)
Identificação de ESUs	Elefante de Bornéu (Fernando et al. 2003); Salamandra da montanha lariço (Wagner et al. 2005)
Reconstrução de relações filogenéticas	Urso pardo (Taberlet e Bouvet 1994)

Tabela 8.1 (cont.)

Aplicativos	Exemplos e referências
Impacto da fragmentação do habitat e redução do fluxo gênico	Carneiro selvagem do deserto (Epps et al. 2005)
Determinação do sexo	Lontra euroasiática (Dallas et al. 2000); veado-vermelho (Huber et al. 2002); espécies de canídeos (Ortega et al. 2004; Seddon 2005); espécies de felinos (Pilgrim et al. 2005); carcaju (Hedmark et al. 2004); Elefante asiático (Vidya et al. 2003); pássaros (Miyaki et al. 1998)
Rastreamento molecular ou marcação genética, monitoramento genético	Urso pardo (Taberlet et al. 1997; Lorenzini et al. 2004; Talmon et al. 2004); leão da montanha (Ernest et al. 2000); lobo cinzento (Lucchini et al. 2002); chimpanzés (Goossens et al. 2002); baleias jubarte (Palsbøll et al. 1997); ursos pretos e marrons (Woods et al. 1999), wolverine (Flagstad et al. 2004)
Estado da doença	Chimpanzés (Santiago et al. 2003); chimpanzés e gorilas (Makuwa et al. 2003); carnívoros (Steinel et al. 2000)
Perícia (códigos de barras de DNA) e ações legais	Birstein et al. 1998; Palumbi e Cipriano 1998; Pank et al. 2001; Carr et al. 2002; Fang e Wan 2002; Manel et al. 2002; Shivji et al. 2002; Chapman et al. 2003; Hebert et al. 2003, 2004; Moritz e Cícero 2004; Will e Rubinoff 2004; Barrett e Hebert 2005; Prendini 2005; Schander e Willassen 2005

(Pritchard et al. 2000), atribuição populacional (Blanchong et al. 2002 para uma revisão) e filogeografia (Avice 2000), determinação do tamanho efetivo da população (Kohn et al. 1999), censo populacional (captura/recaptura) e estimativa do tamanho da população (Schwartz et al. 1999; Mills et al. 2000 para uma revisão; McKelvey e Schwartz 2004a, b; Paetkau 2004; Lukacs e Burham 2005a, b e Miller et al. 2005 para revisões), detecção de hibridização eventos e monitoramento de hibridização (Schwartz et al. 2004; Willis et al. 2004), designação filogenética de espécies e identificação de unidades evolutivamente significativas (Moritz 1994; Li et al. 2004), avaliação do impacto da fragmentação de habitat e redução genética fluxo entre populações (por exemplo, Stow et al. 2001), rastreamento molecular (por exemplo, Taberlet et al. 1997), determinação do sexo (por exemplo, Shaw et al. 2003), estado da doença e estudo evolutivo de genomas virais de amostras fecais (por exemplo, Whittier et al. 2004), ações forenses e legais (Birstein et al. 1998; Palumbi e Cipriano 1998; Dalebout et al. 2002; Manel et al. 2002) e die

análise (Farrell et al. 2000; Fedriani e Kohn 2001; Deagle et al. 2005; Parsons et al. 2005).

MÉTODOS E FONTES DE AMOSTRA

Fontes de

amostras As fontes de amostras de DNA que têm sido usadas para estudar populações selvagens incluem pelos perdidos (coletados em ninhos noturnos) de grandes primatas (Morin et al. 1994b, c; Constable et al. 2001; Goossens et al. 2005) e pelos arrancados de wombats (Sloane et al. 2000; Banks et al. 2002b, 2003), marmotas alpinas (*Marmota marmota*) (Goossens et al. 1998a), macacos-prego (*Cebus olivaceus*) (Valderrama et al. 1999) e ursos (Taberlet et al. 1999) 1997; Outra fonte valiosa de DNA é o material epitelial do trato digestivo, que é encontrado dentro e ao redor da superfície do material fecal. Usando PCR, o DNA foi primeiro amplificado com sucesso a partir de uma amostra fecal de urso por Höss et al. (1992). Desde então, esse DNA foi analisado em vários mamíferos, incluindo morcegos (Vege e McCracken 2001); wombats comuns (*Vombatus ursinus*) (Banks et al. 2002a); mamíferos marinhos (Tikel et al. 1996), incluindo golfinhos (Parsons et al. 1999; Parsons 2001) e focas (Reed et al. 1997); ungulados (Flagstad et al. 1999; Huber et al. 2002); Elefantes africanos (*Loxodonta africana*) (Eggert et al. 2002) e asiáticos (*Elephas maximus*) (Fernando et al. 2000); rinocerontes negros (*Diceros bicornis*) (Garnier et al. 2001); martas do pinheiro (*Martes martes*) (Davison et al. 2002), texugos euro-asiáticos (*Meles meles*) (Frantz et al. 2003; Wilson et al. 2003) e lontras euro-asiáticas (*Lutra lutra*) (Dallas et al. 2003; Hung et al. 2004); kit foxes (Paxinos et al. 1997), coiotes (*Canis latrans*) (Kohn et al. 1999; Prugh et al. 2005), lobos (*Canis lupus*) (Lucchini et al. 2002; Creel et al. 2003) e carcajus (*Gulo gulo*) (Flagstad et al. 2004); leões da montanha (*Puma concolor*) (Ernest et al. 2000) e lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Palomares et al. 2002; Pires e Fernandes 2003); e primatas (Constable et al. 1995; Launhardt et al. 1998; Gerloff et al. 1999; Launhardt et al. 2001; Oka e Takenaka 2001; Vigilant et al. 2001; Utami et al. 2002; Lukas et al. 2004; Goossens et al. As fezes também têm sido utilizadas em espécies de aves (Segelbacher e Steinbrück 2001), principalmente na abetarda (*Otis tarda*) (Broderick et al. 2003; Ydaghdour et al. 2003). A amostra não invasiva mais comum usada em aves são as penas (Pearce et al. 1997; Segelbacher 2002). Taberlet (1991) mostrou pela primeira vez que uma única pena arrancada continha DNA suficiente para análise genética, depois Morin et al. (1994a) amplificaram DNA de penas de calau. Num estudo mais recente, Rudnick et al. (2005) usaram penas perdidas naturalmente para identificar

indivíduos de águia imperial (*Aquila heliaca*), geram dados de parentesco e monitoram uma população selvagem no Cazaquistão. Outras fontes de DNA para aves são cascas de ovos (Pearce et al. 1997), membranas de ovos (Nuechterlein e Buitron 2000) e urina (Nota e Takenaka 1999). A urina também tem sido usada para análises genéticas em lobo cinzento (*Canis lupus*) (Valie`re e Taberlet 2000) e carcaju (*Gulo gulo*) (Hedmark et al. 2004). Recentemente, Yasuda et al. (2003) descreveram um método simples de extração de DNA e tipagem de microssatélites a partir de amostras de urina usando um kit de extração de DNA/RNA que deve abrir caminhos para novos estudos utilizando urina. Em peixes, amostras de escamas antigas podem ser úteis como fonte de DNA (Nielsen et al. 1999). Coleções de escamas de peixes podem ser encontradas em muitas pescarias no mundo e, conseqüentemente, estudos genéticos abrangentes estão sendo realizados com uma perspectiva temporal em muitas espécies de peixes.

Fontes mais incomuns de DNA são pedaços de chimpanzé (restos de comida mastigada) contendo células bucais (Sugiyama et al. 1993; Takenaka et al. 1993), pele descamada em baleias (Valsecchi et al. 1998) e cobras (Bricker et al. 1996), esfregaços de pele em golfinhos (Harlin et al. 1999), ovos em tartarugas marinhas (Moore et al. 2003), muco de pele em peixes (Livia et al. 2006) e esfregaços bucais em anfíbios (Pidancier et al. 2003). Outros materiais biológicos, como dentes e marfim de cachalotes (*Physeter macrocephalus*)

(Pichler et al. 2001), dentes velhos em raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (Wandeler et al. 2003), marfim em elefantes (Comstock et al. 2003; Wasser et al. 2004), carne de baleia (Baker et al. 2004). 1996; Palumbi e Cipriano 1998; Baker et al. 2000), golfinhos (Baker et al. 1996), crocodilos chineses (*Alligator sinensis*)

(Yan et al. 2005), avestruzes (Abdulmawjood e Buelte 2002) e tartarugas marinhas (Moore et al. 2003), partes de corpos e restos mortais de tubarões (Hoelzel 2001; Pank et al. 2001; Shivji et al. 2002; Chapman et al. 2002; Chapman et al. 2002; al. 2003) e baleias (Carr et al. 2002; Dalebout et al. 2002), caviar de esturção (Wolf et al. 1999), carcaças de espécies de veados (Fang e Wan 2002) podem fornecer resultados fiáveis para análise de ADN e são muito úteis na monitorização do comércio e na detecção da caça furtiva de espécies ameaçadas de extinção.

Armazenamento de amostras

Amostras de cabelo

Existem dois tipos de cabelos que podem ser usados como fontes não invasivas de DNA: arrancado e derramado. Os cabelos arrancados são de longe a melhor fonte de DNA capilar para análise de DNA mitocondrial e nuclear, enquanto os cabelos soltos podem muitas vezes ser problemáticos para a análise de DNA nuclear. Os pêlos arrancados individualmente com material radicular devem fornecer DNA suficiente para análise genética, desde que sejam utilizadas condições de armazenamento adequadas (veja abaixo). No entanto, recomendamos

coletando mais de 10 fios de cabelo por indivíduo (ver Goossens et al. 1998b).

Valderrama et al. (1999) descreveram quatro métodos de coleta de amostras de cabelo fresco de mamíferos selvagens e em cativeiro: (1) disparar uma tira enrolada de fita adesiva, pressionada na ponta plana de uma seringa de plástico, a partir de uma pistola de dardos pneumática; (2) fazer um curral cercado uma pequena área com fita adesiva; (3) envolver uma isca (ou seja, em uma árvore) com fita adesiva; (4) enrolar fita invertida na ponta de um bastão e tocar o animal (somente para animais em cativeiro).

Armadilhas para cabelo baseadas em arame farpado ao redor de árvores (para ursos) e fita adesiva em tubos para roedores também podem ser úteis. Os pêlos arrancados têm sido usados para primatas de vida livre (Valderrama et al. 1999), wombats (Sloane et al. 2000; Banks et al. 2003), ursos marrons (*Ursus arctos*) (Taberlet et al. 1994, 1997; Woods et al. 1997; Woods et al. al. 1999) e marmotas alpinas (Goossens et al. 1998a).

Para cabelos soltos, as raízes geralmente sofreram apoptose antes da queda (fase telógena), e grande parte do DNA nuclear é degradado (Jeffery et al. 2007). No entanto, o tecido epitelial pode estar ligado à raiz dos cabelos recém-caídos e fornecer uma fonte de DNA nuclear não degradado (Lynch et al. 1998). Os pêlos soltos são comumente usados para estudos de grandes símios (ver Morin et al. 1994b, c; Gagneux et al. 1997a; Goossens et al. 2005), mas podem mostrar resultados não confiáveis (Gagneux et al. 1997b).

Roon et al. (2005a) avaliaram os métodos ideais de armazenamento e as taxas de degradação do DNA para amostras de cabelo. Amostras de pêlos de ursos pardos foram preservadas usando dessecação de sílica e congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante um período de 1 ano. As taxas de sucesso da amplificação diminuiram significativamente após um período de 6 meses, independentemente do método de armazenamento. Portanto, é importante minimizar os atrasos entre a coleta e a extração do cabelo se quisermos maximizar a taxa de sucesso da amplificação. No entanto, as amostras de cabelo são geralmente armazenadas em envelopes de papel limpos (Goossens et al. 1998a; Woods et al. 1999; Sloane et al. 2000), uma vez que os sacos plásticos produzem estática que dificulta a manipulação do cabelo e aumenta a contaminação.

Amostras fecais

Nos últimos 10 anos, foram testados diferentes métodos de armazenamento para amostras fecais de diferentes espécies. É vital que a degradação do DNA pelas nucleases seja minimizada tanto quanto possível. Isto pode ser feito desidratando a amostra por secagem ao ar (Flagstad et al. 1999 para ovelhas e renas (*Rangifer tarandus*); Farrell et al. 2000 para leões da montanha e onças (*Panthera onca*)), por secagem de esferas de sílica gel (Bradley e Vigilant 2002 para gorilas), por congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ernest et al. 2000 para leões da montanha), por tratamento com álcool (etanol) (Gerloff et al. 1999 para bonobos (*Pan paniscus*); Fernando et al. 2000 para Elefante asiático; Constable 2001 para chimpanzés;

para orangotangos (*Pongo pygmaeus*), ou saturando a amostra em um tampão (DETs: veja abaixo) contendo altas concentrações de sais ou outros produtos químicos que interferem nas enzimas (Frantzen et al. 1998). Frantzen et al. (1998) avaliaram a eficácia destes quatro métodos para preservar fezes frescas de babuíno: secagem, congelamento a -20°C , etanol a 70% e DMSO/EDTA/Tris/solução salina (DETs). Este último foi o mais eficaz para preservar o ADN nuclear e os outros três métodos tiveram um desempenho igualmente bom para a análise de ADN mitocondrial e para fragmentos curtos de microssatélites (menos de 200 pb), mostrando que o sucesso da amplificação depende do método de armazenamento, do tamanho do produto de PCR e do marcador molecular utilizado. . Em outro estudo, Piggott e Taylor (2003a) avaliaram os mesmos métodos de preservação (juntamente com diferentes métodos de extração), mas para amostras fecais de dois herbívoros marsupiais australianos (*Dasyurus maculatus* e *D. viverrinus*) e um carnívoro introduzido (*V. vulpes*). . Seus resultados mostraram que a maior amplificação e as menores taxas de erro de genotipagem foram obtidas com amostras fecais secas extraídas através de uma lavagem de superfície seguida de purificação em coluna giratória Qiagen.

Mais recentemente, Roeder et al. (2004) compararam o armazenamento de amostras fecais em etanol e sílica com um método de duas etapas: imersão das amostras em etanol seguida de dessecação com sílica. Embora as amostras armazenadas em sílica apresentassem a menor concentração de DNA, o método de duas etapas rendeu significativamente mais DNA em amostras de alta qualidade. O etanol e os métodos de duas etapas tiveram desempenho igual para amostras de qualidade inferior. Nsubuga et al. (2004) obtiveram quantidades significativamente maiores de DNA de amostras fecais de gorilas das montanhas selvagens (*Gorilla beringei beringei*) e de chimpanzés usando o protocolo desenvolvido por Roeder e colegas. Além disso, mostraram uma pequena correlação negativa entre a temperatura no momento da coleta e a quantidade de DNA amplificado. A solução de preservação RNAlater (ver próximo parágrafo) não produziu melhores resultados do que o armazenamento de esferas de sílica gel.

Em 2002, Murphy et al. testaram cinco métodos de preservação em fezes de urso pardo (etanol 90%, tampão DETs, secagem em sílica, secagem em estufa armazenada em temperatura ambiente e secagem em estufa armazenada a -20°C) em diferentes momentos (1 semana, 1 mês, 3 meses e 6 meses) e para dois marcadores genéticos diferentes (mtDNA e nDNA). As amostras preservadas em etanol tiveram as maiores taxas de sucesso tanto para o mtDNA quanto para o nDNA. Os autores recomendaram a preservação das amostras fecais em etanol 90% quando viável e o método de secagem quando coletadas em condições remotas de campo. Em um estudo anterior, Murphy et al. (2000) avaliaram quatro métodos de secagem para fezes de urso pardo, com a liofilização e a secagem em estufa produzindo as melhores taxas de sucesso de amplificação. Um recente reagente de armazenamento de tecidos, chamado RNAlater® (Ambion, Inc.), tem sido usado com sucesso para armazenar amostras fecais em nossos

laboratório e os de outros. É um reagente aquoso e não tóxico que permeia rapidamente a maioria dos tecidos para estabilizar e proteger o RNA em amostras frescas. O DNA (e obviamente o RNA) pode ser isolado de amostras armazenadas posteriormente com RNA com muito boa confiabilidade nos resultados de genotipagem. O único problema é que é um reagente caro. As fezes das aves podem ser armazenadas a -20 °C em etanol a 90% (Broderick et al. 2003; Idaghdour et al. 2003).

Outras amostras

Urina Amostras de urina podem ser usadas para carnívoros e podem ser facilmente coletadas na neve (ver Valie`re e Taberlet 2000; Hedmark et al. 2004). Também pode ser coletado em folhas de plástico colocadas sob ninhos de grandes primatas. Chimpanzês ou orangotangos individuais frequentemente urinam na lateral do ninho ao acordar e a urina pode ser coletada e transferida para frascos de armazenamento usando pipetas plásticas descartáveis. Infelizmente, a fermentação e a degradação do DNA nas células podem ocorrer rapidamente após a micção (Hayakawa e Takenaka 1999), portanto, recomenda-se coletar o maior volume possível e transferi-lo para dois volumes de etanol a 95%. A urina também pode ser usada para aves (Nota e Takenaka 1999), fixada com etanol 70–90% e armazenada a -20 °C.

Penas Em geral, as penas são armazenadas em envelopes ou sacos plásticos e armazenadas secas até a análise (ver Segelbacher 2002). Num estudo sobre a águia imperial oriental, Rudnick et al. (2005) utilizaram penas de adultos com muda natural coletadas em locais de nidificação. Ele também arrancou penas de sangue em desenvolvimento de pintinhos. As penas adultas foram armazenadas secas em temperatura ambiente. Penas de pintinho em desenvolvimento foram armazenadas em tampão de lise (ver Rudnick et al. 2005 para detalhes).

Wadges Células bucais de alimentos (wadges) podem ser extraídas com sucesso e o mtDNA e o nDNA podem ser amplificados a partir do DNA extraído (Hashimoto et al. 1996 em chimpanzês). As amostras Wadge devem ser transferidas para um tubo estéril de polipropileno de 50 ml preenchido com etanol 90% e Na3EDTA 1 mM, para evitar degradação bacteriana e enzimática do DNA.

Kits e métodos de extração

Cabelo O método mais popular para extrair DNA de cabelos é o método Chelex-100® e proteinase K desenvolvido por Walsh et al. (1991).

No entanto, Vigilant (1999) obteve melhores resultados usando tampão Taq polimerase PCR como tampão de extração (ver Allen et al. 1998). Em nosso laboratório, usamos este último e descobrimos que usar tampão de PCR, água e proteinase K em um pequeno volume de extração funciona muito bem para queda de cabelo (ver Goossens et al. 2005; Jeffery 2007).

Fezes As células que contêm DNA não estão uniformemente espalhadas pelas fezes, e dois ou três extratos devem ser feitos por amostra (ver Goossens et al. 2000). Também é importante utilizar um método que envolva menos etapas e transferências de amostras, embora a remoção de substâncias que possam inibir a PCR geralmente exija etapas repetidas de purificação envolvendo várias etapas de centrifugação. Recomendamos o uso do mini kit QIAamp Stool (QIAGEN), que forneceu resultados confiáveis em primatas (gorilas: Bradley e Vigilant 2002; orangotangos: Utami et al. 2002; Goossens et al. 2005; babuínos: Bayes et al. 2000) e outros mamíferos (rinoceronte negro: Garnier et al. 2001; urso pardo: Bonin et al. 2004; carcaju: Hedmark et al. 2004). Outros métodos foram descritos na literatura e incluem: método à base de sílica (Boom et al. 1990), esferas magnéticas (Flagstad et al. 1999), método de terra diatomácea (Gerloff et al. 1995), Chelex-100® (Walsh et al. 1991) e lavagem de superfície seguida de purificação em coluna giratória (Piggott e Taylor 2003a). Recomenda-se um estudo piloto, pois uma técnica de extração pode funcionar para algumas espécies, mas pode não funcionar para outras. Os métodos de extração (e armazenamento) dependerão das condições de campo, localização, estação, tamanho e idade das amostras (ver Taberlet et al. 1999; Piggott 2004). Para fezes de aves, Broderick et al. (2003) usaram uma modificação do protocolo baseado em isotiocianato de sílica e guanidina de Milligan (1998) (para um protocolo detalhado, consulte Idaghdour et al. 2003).

Protocolos de urina usando o mini kit de fezes QIAamp DNA (GmbH, Hilden, Alemanha) para extrair DNA de urina coletada na neve estão bem descritos em Valie`re e Taberlet (2000) para canídeos e em Hedmark et al. (2004) para carcaju. Para aves, um protocolo detalhado é descrito em Nota e Takenaka (1999).

Penas Eguchi e Eguchi (2000) desenvolveram um método simples para extrair DNA de penas de pássaros e também de pele descartada de cobra usando colagem-nase. Jensen et al. (2003) descrevem uma técnica para extrair DNA de penas usando Chelex-100® (também usada por Morin et al. (1994a) para calaus).

Wadges Diferentes métodos podem ser usados para extrair DNA de wadges e podem ser encontrados em Takenaka et al. (1993) e em Hashimoto et al. (1996).

INOVAÇÕES RECENTES

Os sistemas de PCR multiplex (Henegariu et al. 1997) para genotipagem comparativa estão bem desenvolvidos em ciência forense humana (Wallin et al. 2002; Shewale et al. 2004) e agora são desenvolvidos para outras espécies animais, como cervídeos (cervos Eld e cervos do pântano, Cervos sika Rusa e vietnamitas: Bonnet et al.

veado: Galan et al. 2003); primatas (orangotangos: Immelet al. 1999; Roeder et al. 2006), peixes (tubarão branco (*Carcharodon carcharias*): Chapman et al. 2003). Piggott et al. (2004) desenvolveram um método de pré-amplificação multiplex para melhorar a amplificação de microssatélites e as taxas de erro ao usar DNA fecal. A Qiagen desenvolveu um kit multiplex, que é comumente usado para genotipagem de DNA extraído de amostras não invasivas, como fezes e cabelos, em nosso laboratório, com resultados confiáveis.

Além disso, o recente estabelecimento da amplificação do genoma completo, como a amplificação por deslocamento múltiplo (MDA) (Dean et al. 2002), promete revolucionar a análise genética não invasiva, uma vez que, em princípio, permite a produção de grandes quantidades de DNA genômico completo a partir de fontes minúsculas, como as produzidas rotineiramente a partir de estudos não invasivos.

O MDA permite a geração de milhares de cópias de genomas inteiros de até 10 pares de quilobases (kb) de comprimento (Dean et al. 2002). A reação isotérmica de MDA utiliza a DNA polimerase do bacteriófago phi29 altamente processável e sua atividade de deslocamento da fita de DNA. Na reação MDA, iniciadores hexâmeros aleatórios emparelhados com DNA genômico desnaturado são estendidos pela DNA polimerase phi29 para formar produtos de até 100 kb. À medida que a DNA polimerase encontra outra fita de DNA recém-sintetizada a jusante, ela a desloca e cria assim um novo modelo de DNA de fita simples para priming. O deslocamento da cadeia leva a reações de extensão de primers hiper-ramificados que podem produzir quantidades de miligramas de produto de DNA a partir de apenas alguns nanogramas de DNA genômico. Devido à sua atividade de revisão 30-50, a fidelidade da DNA polimerase phi29 é muito alta, com uma taxa de erro $<10^{-6}$ (Esteban et al. 1993), o que por sua vez requer primers protegidos por exonuclease para atingir um alto rendimento. Como a reação não envolve ciclos térmicos e são produzidas cópias de alto peso molecular do DNA genômico, a cobertura genômica dos produtos MDA é maior do que a dos métodos de amplificação do genoma completo baseados em PCR, PCR degenerado com oligonucleotídeo iniciado (DOP-PCR) e primer pré-amplificação de extensão (PEP) (Dean et al.

2002). Ronnn et al. (2006) testaram recentemente esta abordagem para avaliar a sua eficácia numa variedade de ADN de primatas, incluindo amostras recolhidas de forma não invasiva, e descobriram amplamente que o ADN modelo MDA produzia uma precisão genotípica equivalente ao ADN não amplificado.

Marcadores moleculares

A escolha de um marcador molecular dependerá da questão de interesse.

Cada marcador tem seu uso adequado e os custos e a dificuldade da tipagem genética devem ser levados em consideração. Os dois marcadores mais comumente usados na genética não invasiva hoje são o DNA mitocondrial

e microssatélites nucleares. Os atributos específicos desses marcadores não serão discutidos aqui, mas serão mencionados seu comportamento e provável conteúdo de informação em um contexto de análise genética não invasiva. No entanto, é provável que no futuro os polimorfismos de nucleótido único (SNPs) se tornem o marcador genético de escolha para estudar a ecologia e a conservação das populações selvagens, porque permitem o acesso à variabilidade em todo o genoma. Embora os exemplos permaneçam escassos até o momento, em um estudo Seddon et al. (2005) abordaram questões ecológicas e de conservação em populações recolonizadas de lobos escandinavos e finlandeses usando 24 loci SNP. Esses loci foram capazes de diferenciar lobos individuais e diferenciar populações usando testes de atribuição. Comparados aos microssatélites, os SNPs permitem a amplificação de fragmentos extremamente pequenos, o que os torna muito úteis para a genética populacional e de conservação usando amostras não invasivas, e são muito mais fáceis de automatizar, por exemplo, em microarranjos (ver capítulo de Vernesi e Bruford, este volume). Os SNPs têm a vantagem de poder escolher uma variedade de diferentes tipos de sequências, para fornecer informações sobre marcadores neutros e aqueles sob seleção (por exemplo, o complexo principal de histocompatibilidade; Smulders et al. 2003).

Cromossomos sexuais em mamíferos (Fernando e Melnick 2001; Bryja e Konecny 2003; Hellborg e Ellegren 2003; Erler et al. 2004; Hedmark et al. 2004) e outros vertebrados (aves: Griffiths et al. 1998; e peixes: Matsuda 2003) pode fornecer sequência de DNA útil para a identificação do sexo de um animal. Usar tanto o DNA cromossômico Y quanto um marcador autossômico ou ligado ao X é útil para fornecer informações sexuais (Griffiths e Tiwari 1993; Sloane et al. 2000; Huber et al. 2002). O locus da amelogenina também pode ser usado para identificar o sexo, por exemplo, em grandes símios (Bradley et al. 2001; Matsubura et al. 2005), ursos (Yamamoto et al. 2002) e felídeos (Pilgrim et al. 2005). Em aves, por exemplo, Sacchi et al. (2004) usaram o gene ligado ao sexo CHD (Chromo-Helicase-DNA-Binding) e penas para diferenciar machos e fêmeas da ameaçada águia-cobreira (*Circus gallicus*). Russello e Amato (2001) descreveram um teste baseado em PCR, utilizando DNA de penas, para identificar o sexo em uma espécie de papagaio ameaçada de extinção, *Amazona guildingii*.

Polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLPs) são marcadores dominantes que podem ser usados em parentesco, atribuição de população (Campbell et al. 2003), fluxo gênico e migração, embora sejam menos adequados para reconstruir eventos passados e padrões históricos de variação (Wayne e Morin 2004; Bensch e Åkesson 2005). No entanto, é provável que a sua utilização em análises não invasivas seja limitada devido à necessidade de grandes quantidades de ADN modelo e de grandes tamanhos de fragmentos.

DESAFIOS TÉCNICOS

A análise genética não invasiva, apesar das suas vantagens óbvias para o estudo de populações selvagens de espécies indescritíveis e ameaçadas de extinção, tem as suas próprias limitações e armadilhas que devem ser levadas seriamente em consideração. As amostras coletadas de forma não invasiva são muito menos confiáveis do que as amostras invasivas, como biópsias de sangue e tecidos. O DNA pode ser altamente fragmentado e às vezes a PCR pode ser inibida por compostos co-extraídos presentes no material. A contaminação humana (particularmente para espécies de primatas) e a contaminação cruzada entre amostras são comuns e devem ser evitadas. Portanto, devem ser tomadas precauções, como a utilização de uma sala de laboratório dedicada ao armazenamento e manuseio não invasivo de amostras. O DNA extraído de amostras não invasivas pode ser de baixa quantidade e qualidade e, portanto, as análises precisam ser feitas e verificadas rigorosamente (Taberlet e Luikart 1999; Taberlet et al. 1999; Bonin et al. 2004; McKelvey e Schwartz 2004a). A extração de DNA deve ser altamente eficiente (rápida e evitando etapas desnecessárias) e vários métodos novos e kits de extração cada vez mais sofisticados e de alto rendimento estão agora disponíveis para agilizar a extração rápida e o manuseio mínimo de líquidos. A extração de DNA também deve ser capaz de remover material inibitório durante a purificação (Eggert et al. 2005) e, embora isso costumava ser um processo trabalhoso, os reagentes necessários estão agora incluídos em muitos dos kits disponíveis comercialmente.

O baixo número de cópias do modelo de DNA e a inibição da PCR levaram à observação de vários fenômenos na genotipagem não invasiva. Primeiro, os produtos de PCR podem ser extremamente difíceis de gerar e os fragmentos resultantes podem não ser suficientes para análise. Aconselhamos a utilização de mais ciclos de PCR (até 40–50) ou uma segunda ronda de PCR, utilizando os fragmentos gerados na primeira para 'semear' a reação. Diminuir a temperatura de recozimento também pode ajudar. O aumento do número de ciclos pode, no entanto, ter um impacto negativo se for introduzido um erro de cópia, produzindo falsos polimorfismos. Portanto, PCRs replicados são imperativos para confirmar os resultados (ver Taberlet et al. 1996; Goossens et al. 2000).

Dados falsos podem ocorrer em sequências de DNA (mutações pontuais artificiais) ou em fragmentos de microssatélites (comprimentos de alelos falsos devido ao deslizamento da DNA polimerase durante a PCR). O deslizamento da DNA polimerase é um fenômeno geral em PCRs de microssatélites, mas geralmente pode ser compensado registrando apenas um (para homocigotos) ou dois (para heterocigotos) fragmentos amplificados mais intensamente. Alelos falsos podem confundir este processo, embora tais fragmentos de artefatos sejam geralmente fracamente amplificados e devam, em qualquer caso, ser replicados (Bradley e Vigilant 2002). Além disso, o estocástico

pode ocorrer a não amplificação de um dos dois alelos potenciais em um locus de microssatélites ('abandono alélico') devido ao baixo número de cópias do modelo ou à degradação do DNA. Este último pode ser um problema especial para loci que exibem uma ampla gama de comprimentos de alelos, porque alelos mais longos podem não ser amplificáveis se o seu comprimento exceder o tamanho máximo do fragmento presente no DNA molde degradado. Amplificações repetidas usando várias extrações independentes de DNA (ver Navidi et al. 1992; Taberlet et al. 1996; Goossens et al. 1998b; Taberlet et al. 1999 para uma revisão; Goossens et al. 2000) são um requisito mínimo em tais estudos. Softwares como o GIMLET (Genetic Identification with MultiLocus Tags, <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/Gimlet/gimlet.htm>) podem auxiliar na identificação de falsos homocigotos e falsos alelos, comparando os genótipos repetidos e os associados genótipo de consenso para cada amostra (Valie`re 2002).

A NECESSIDADE DE ESTUDOS PILOTO

Defendemos fortemente a realização de protocolos experimentais preliminares e avaliação crítica de dados piloto antes de iniciar um estudo em grande escala sobre uma nova espécie ou população. Ao trabalhar com amostras fecais, um experimento de decomposição ambiental pode ser extremamente útil para estabelecer o provável sucesso da extração de DNA de fezes encontradas em condições de campo. Amostras frescas sempre produzem DNA melhor, mas às vezes pode ser impossível encontrá-las. Piggott (2004) investigou o efeito da idade da amostra (e sazonalidade) na amplificação e confiabilidade da genotipagem de locos microssatélites do DNA fecal de um herbívoro marsupial (o canguru de cauda escovada, *Petrogale penicillata*) e um carnívoro (a raposa vermelha). O autor comparou perfis de DNA de 1 dia a 6 meses para ambas as espécies e descobriu que à medida que a idade das amostras aumentava, havia DNA de qualidade progressivamente pior presente na superfície das fezes. Isto resultou em taxas de amplificação significativamente mais baixas e em erros de genotipagem mais elevados. Este problema é provavelmente mais grave em ambientes tropicais, onde as chuvas são muito frequentes e o risco de lavagem do ADN da camada exterior (muco) das fezes é elevado. Portanto, é necessário saber como o rendimento do DNA se correlaciona com a idade da sua amostra (experimento de taxa de decaimento) e com as condições climáticas, como a chuva. Também é importante considerar a dieta das espécies estudadas (Murphy et al. 2003). Os problemas são frequentemente encontrados com espécies comedoras de folhas, provavelmente devido ao material inibitório vegetal. Sugerimos também a ligação com bioquímicos para identificar, dependendo de algumas características biológicas específicas da espécie em estudo, quais compostos deverão ser co-extraídos com DNA de fontes como fezes e ca

a escolha de procedimentos mais eficientes para eliminação destas moléculas melhorando assim a qualidade do DNA extraído.

A quantificação de DNA em amostras genéticas não invasivas tem se mostrado frequentemente problemática por meios convencionais devido à natureza degradada do DNA presente, à contaminação com DNA exógeno e à presença de RNA.

Uma abordagem de quantificação confiável, descrita por Morin et al. (2001), utiliza um ensaio PCR quantitativo com padrões apropriados. Este método provou ser confiável em amostras como DNA extraído de dentes de raposa previamente autoclavados (Wandeler et al. 2003) e fornece um grande desenvolvimento positivo na área. Uma vez produzidos os dados piloto, o software GEMINI (Genotyping Erros e Abordagem Multitube para Identificação Individual, <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/gemini.html>; Valie`re et al. 2002) permite ao usuário avaliar e quantificar os efeitos dos erros de genotipagem na identificação genética dos indivíduos. Também permite a simulação da eficácia de uma abordagem específica de multitubos para corrigir esses erros.

REQUISITOS

Resumindo, antes de iniciar qualquer estudo genético não invasivo sobre uma espécie específica, e especialmente quando se utilizam amostras fecais, é necessário:

- (1) identificar os marcadores genéticos de que irá necessitar (ou seja, se utilizar microssatélites, verifique os marcadores publicados disponíveis)
- (2) realizar um estudo piloto sobre o efeito da idade e da estação do ano na fiabilidade da genotipagem de microssatélites (particularmente para espécies tropicais e se você trabalha com fezes)
- (3) selecionar o método de preservação de amostra mais apropriado (verificar a literatura ou testá-lo se necessário)
- (4) selecionar o método de extração de DNA mais apropriado (verificar a literatura ou testá-lo se necessário)
- (5) testar os efeitos dos erros de genotipagem e abordagem multitubos usando software como GEMINI (Valie`re et al. 2002)
- (6) durante a coleta, tentar coletar amostras das mesmas fezes pelo menos duas vezes, e sempre coletar amostras da camada externa das fezes (muco).

ANÁLISE

Confiabilidade

Diferentes métodos foram recentemente publicados para verificar a integridade dos genótipos produzidos durante um estudo e para garantir que os genótipos multilocus estão corretos. O método mais utilizado até agora é o

abordagem multitubos (originalmente desenvolvida por Navidi et al. 1992) formalizada por Taberlet et al. em 1996. Desde então, a maioria dos estudos utilizando DNA não invasivo realiza de três a sete replicações de PCR por amostra para cada locus. No entanto, tal número de réplicas aumenta consideravelmente o custo e o tempo de tais estudos. Portanto, os métodos de pré-triagem descritos acima (Morin et al. 2001) ou pacotes de computador (Valie`re 2002; Valie`re et al. 2002; van Oosterhout et al. 2004; Roon et al. 2005b) são altamente recomendados antes iniciar qualquer trabalho não invasivo. MICRO-CHECKER (van Oosterhout et al. 2004, <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>) é um software que testa erros de genotipagem devido a alelos nulos ou falsos e abandono alélico. Também pode ser usado para discriminar entre desvios de Hardy-Weinberg causados por alelos nulos e aqueles causados por fatores demográficos, como consanguinidade. Mais recentemente, Roon et al. (2005b) testaram a eficácia de vários métodos para verificação de erros em dados genéticos não invasivos e alertaram contra o uso de filtros de dados não abrangentes em estudos genéticos não invasivos e sugeriram a combinação de filtros de dados com técnica cuidadosa e cuidadosos métodos não invasivos. desenho do estudo. Wilberg et al. (2004) produziram software (GENECAP) para facilitar a análise de dados de genótipos multilocus em amostragem não invasiva de DNA e estudos de captura-recaptura genética. Ele usa dados genéticos multilocus para combinar amostras com genótipos idênticos, calcular a frequência de alelos, identificar genótipos de amostras que diferem em um e dois alelos, calcular probabilidades de identidade e combinar probabilidades para amostras correspondentes.

Informações demográficas

Juntamente com os softwares mencionados anteriormente, como o GIMLET (Valie`re et al. 2002), abordagens cada vez mais sofisticadas, como os métodos baseados em probabilidade implementados no API-CALC 1.0 (Ayres e Global 2004) permitem ao usuário calcular probabilidades de identidade (individualizar a partir de dados genéticos não invasivos) permitindo complicações como subestrutura genética, endogamia e presença de parentes próximos.

Um grande número de pacotes de software foram projetados nos últimos 10 anos para atribuir parentesco. Os pontos fortes e fracos destes métodos foram revistos por Jones e Ardren (2003). Recomendamos fortemente avaliar seus méritos antes de selecionar qualquer software de parentesco recente. Existem quatro abordagens para calcular a filiação: (1) exclusão (com base nas regras mendelianas de herança), que usa incompatibilidades entre descendentes e pais para rejeitar um determinado pai/filho e assume que todos os pais potenciais são amostrados e não há erros de genótipo ; (2) alocação categórica, que utiliza abordagens baseadas em probabilidade (pontuação LOD) para selecionar

o progenitor mais provável de um conjunto de progenitores não excluídos e permite ao utilizador incluir uma taxa de erro de genotipagem e uma amostragem incompleta de progenitores potenciais (Marshall et al. 1998; Slate et al. 2000); (3) alocação fracionária, que atribui alguma fração (entre 0 e 1) de cada prole a todos os pais candidatos não excluídos (ver Devlin et al. 1988); (4) reconstrução parental, que utiliza os genótipos multilocus dos pais e descendentes para reconstruir os genótipos de pais desconhecidos que contribuem com gametas para uma matriz de progénie pela qual um dos pais é conhecido a priori (Jones 2001). A Tabela 8.2 fornece uma lista dos softwares de parentesco mais recentes usados na literatura, com estudos de caso e, para a maioria dos exemplos, implicações para a conservação. O software mais comum usado para análise de parentesco é o CERVUS (Marshall et al. 1998).

Vários pacotes de software podem ser usados para estimar o parentesco em populações selvagens. Os mais comumente usados são RELACIONAMENTO (Queller e Goodnight 1989) e KINSHIP (Goodnight e Queller 1999). RELATEDNESS estima o parentesco entre indivíduos ou o parentesco médio entre grupos usando regressão, enquanto KINSHIP testa relacionamentos de linhagem usando métodos de verossimilhança. Outro pacote, DELRIOUS (Stone e Björklund 2001), analisa dados de marcadores moleculares e calcula estimativas de delta e parentesco com limites de confiança. Finalmente, IDENTIX (Belkhir et al. 2002) testa o parentesco em uma população usando métodos de permutação.

Existem vários pacotes disponíveis que permitem a identificação de uma população fonte para um indivíduo disperso específico. Eldridge et al. (2001) utilizaram testes de atribuição nos programas STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) e GENECLASS (Cornuet et al. 1999) para identificar a população fonte de indivíduos wallaby (*Petrogale lateralis*). Berry et al. (2004) examinaram a precisão de testes de atribuição para medir a dispersão no grande lagarto (*Oligosoma grande*) e sugeriram o uso de métodos de atribuição bayesianos. Hansson et al. (2003) usaram o software GENECLASS para atribuir imigrantes de coortes específicas de toutinegras (*Acrocephalus arundinaceus*) e revelaram uma dispersão tendenciosa por fêmeas naquela espécie. Möller e Beheregaray (2004) usaram GENECLASS e RELATEDNESS para identificar padrões de dispersão tendenciosos por machos em golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops aduncus*). O isolamento por distância calculado com testes de Mantel (Liedloff 1999) também pode ser usado para estimar a dispersão em populações selvagens. Existem agora muitos exemplos onde estas abordagens foram utilizadas em amostras invasivas, mas apenas alguns estudos utilizaram amostragem de ADN não invasiva para atribuir fluxo génico ou padrões de dispersão em espécies animais (Broderick et al. 2003 em abetarda; Launhardt et al. 2001 em langures (*Semnopithecus entellus*); Gerloff et al.

Tabela 8.2 Lista dos softwares de parentesco mais recentes usados na literatura

Programas	Autores	Site	Exemplos
CERVO	Marshall et al. (1998)	helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html	Baker et al. (2004) (raposas vermelhas); Garnier et al. (2001) (rinoceronte negro); Utamie et al. (2002) (orangotangos)
FAM0Z	Gerber et al. (2003)	www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/Famoz	
GERUD 1.0	Jones (2001)	www.bio.tamu.edu/USERS/ajones/JonesLab.htm	Chapman et al. (2004) (tubarão-martelo, Sphyrna tiburo)
GERUD 2.0	Jones (2005)	www.bio.tamu.edu/USERS/ajones/JonesLab.htm	
PARENTESCO	Boa noite e Queller (1999)	www.gsoftnet.us/GSoft.html	Clinchy et al. (2004) (gambás, Trichosurus vulpécula);
NEWPAT	Worthington Wilmer e outros. (1999)	www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/amos/novopat.html	Hoffman e Amos (2005) (focas antárticas, Arctocéfalo gazela)
PAPA	Duchesne et al. (2002)	www.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/	
PARENTAGEM 1.0	Emery et al. (2001)	maths.abdn.ac.uk/~ijw/downloads/baixar.htm	
PAI	Cercueil et al. (2002)	www2.ujf-grenoble.fr/leca/membres/manel.html	
PASOS	Duchesne et al. (2005)	www.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/	
PATRI	Signorovitch e Nielsen (2002)	www.biom.cornell.edu/Homepages/Rasmus_Nielsen/files.html	
PROBMAX	Danzmann (1997)	www.uoguelph.ca/~rdanzman/software/probmax/	
RELACIONAMENTO	Queller e boa noite (1989)	www.gsoftnet.us/GSoft.html	

Finalmente, e talvez o mais emocionante, nos últimos 5 a 10 anos, começou o uso de amostragem genética não invasiva para estudos de censo populacional de captura-recaptura em diversas espécies animais; por exemplo, em tartarugas pintadas (*Chrysemys picta*) (Pearse et al. 2001); baleias (Palsbøll et al. 1997); ursos (Woods et al. 1999; Dobey et al. 2005); e elefantes africanos (Eggert et al. 2003); coiotes (Kohn et al. 1999; Prugh et al. 2005), com desenvolvimento paralelo de novos métodos para estimar o tamanho das populações usando dados de marcação-recaptura molecular (Mills et al. 2000; Waits e Leberg 2000; Paetkau 2003; McKelvey e Schwartz 2004a, b; Paetkau 2004; Existem vários métodos de captura-recaptura agora disponíveis para uso com dados de captura-recaptura não invasivos baseados em DNA. Estes métodos são destacados numa revisão recente de Lukacs e Burnham (2005b). O software mais recente (CAPWIRE: Miller et al. 2005) permite a aplicação de uma série de modelos de agregação populacional e taxas de deposição fecal, e isto foi recentemente aplicado com sucesso, por exemplo, a pandas gigantes (*Ailuropoda melano-leuca*) (Zhan et al. 2006).

PERSPECTIVA

A análise não invasiva está se tornando o único método aceitável para recuperar dados genéticos de muitas espécies ameaçadas. Problemas anteriores de confiabilidade estão sendo rapidamente resolvidos e inovações técnicas, como kits de PCR multiplex e amplificação do genoma completo, poderão em breve tornar esse tipo de análise a norma. No entanto, ainda é necessário cuidado e os desenhos experimentais devem permitir a verificação completa dos dados, tanto pelos próprios investigadores como por outros que pretendam replicar o seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer à Iniciativa Darwin para a Sobrevivência das Espécies (Defra, Reino Unido) pelo financiamento e à Universiti Malaysia Sabah pelas instalações durante a redação deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Abdulmawjood, A. e Buelte, M. (2002). Identificação de carne de avestruz por Análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene do citocromo b. *Jornal de Ciência Alimentar*, 5, 1688–1691.
- Adams, JR, Kelly, BT e Waits, LP (2003). Usando amostragem de DNA fecal e GIS para monitorar a hibridização entre lobos vermelhos (*Canis rufus*) e coiotes (*Canis latrans*). *Ecologia Molecular*, 12, 2175–2186.

- Alacs, E., Alpers, D., de Tores, PJ, Dillon, M. e Spencer, PBS (2003). Identificação da presença de quokkas (*Setonix brachyurus*) e outros macrópodes usando análises de citocromo b nas fezes. *Pesquisa da Vida Selvagem*, 30, 41–47.
- Allen, M., Engstrom, AS, Meyers, S. et al. (1998). Sequenciamento de DNA mitocondrial de cabelos e saliva em bonés de roubo: sensibilidade e probabilidades de correspondência. *Jornal de Ciências Forenses*, 43, 453–464.
- Avice, JC (2000). *Filogeografia: A História e Formação das Espécies*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Ayres, KL e Global, ADJ (2004). AP I-CALC 1.0: um programa de computador para cálculo da probabilidade média de identidade para subestrutura, endogamia e presença de parentes próximos. *Notas de Ecologia Molecular*, 4, 315–318.
- Baker, CS, Cipriano, F. e Palumbi, SR (1996). Identificação genética molecular de produtos de baleias e golfinhos provenientes de mercados comerciais na Coreia e no Japão. *Ecologia Molecular*, 5, 671–685.
- Baker, CS, Lento, GM, Cipriano, F. e Palumbi, SR (2000). Declínio previsto de baleias protegidas com base no monitoramento genético molecular dos mercados japonês e coreano. *Procedimentos da Royal Society Série B*, 267, 1191–1199.
- Baker, PJ, Funk, SM, Bruford, MW e Harris, S. (2004) Poliginandria em uma população de raposa vermelha: implicações para a evolução da vida em grupo em canídeos? *Ecologia Comportamental*, 15, 766–778.
- Bancos, MA e Eichert, W. (2000). WHICHRUN (v. 3.2): um programa de computador para atribuição de população de indivíduos com base em dados de genótipos multilocus. *Jornal da Hereditariedade* 91, 87–89.
- Banks, SC, Piggott, MP, Hansen, BD, Robinson, NA e Taylor, AC (2002a). Coprogenética de wombates: enumerando uma população de wombates comum por análise de microssatélites de DNA fecal. *Australian Journal of Zoology*, 50, 193–204.
- Bancos, SC, Skerratt, LF e Taylor, AC (2002b). Dispersão feminina e estrutura de parentesco em wombats comuns (*Vombatus ursinus*). *Jornal de Zoologia*, 256, 389–399.
- Banks, SC, Hoyle, SD, Horsup, A., Sunnucks, P. e Taylor, AC (2003). Monitoramento demográfico de uma espécie inteira (o wombat de nariz peludo do norte, *Lasiornhinus krefftii*) por meio de análise genética de material coletado de forma não invasiva. *Conservação Animal*, 6, 101–107.
- Barrett, RDH e Hebert, PDN (2005). Identificando aranhas através do DNA códigos de barras. *Jornal Canadense de Zoologia*, 83, 481–491.
- Bayes, MK, Smith, KL, Alberts, SC, Altmann, J. e Bruford, MW (2000). Testando a confiabilidade da tipagem de microssatélites de DNA fecal no babuíno da savana. *Genética da Conservação*, 1, 173–176.
- Belkhir, K., Castric, V. e Bonhomme, F. (2002). IDENTIX, um software para testar parentesco em uma população usando métodos de permutação. *Notas de Ecologia Molecular*, 2, 611–614.
- Bellemain, E., Swenson, JE, Tallmon, D., Brunberg, S. e Taberlet, P. (2005). Estimando o tamanho da população de animais esquivos com DNA de fezes coletadas por caçadores: comparando quatro métodos para ursos marrons. *Biologia da Conservação*, 19, 150–161.
- Bensch, S. e Aj kesson, M. (2005). Dez anos de AFLP em ecologia e evolução: por que tão poucos animais? *Ecologia Molecular*, 14, 2899–2914.
- Berry, O., Tocher, MD e Sarre, SD (2004). Os testes de atribuição podem medir dispersão? *Ecologia Molecular*, 13, 551–561.

- Birstein, VJ, Doukakis, P., Sorkin, B. e DeSalle, R. (1998). Análise de agregação populacional de três espécies de esturjões produtores de caviar e implicações para a identificação de espécies de caviar preto. *Biologia da Conservação*, 12, 766–775.
- Blanchong, JA, Scribner, KT e Winterstein, SR (2002). Atribuição de indivíduos a populações: métodos bayesianos e genótipos multilocus. *Jornal de Gestão da Vida Selvagem*, 66, 321–329.
- Bonin, A., Bellemain, E., Eidesen, PB et al. (2004). Como rastrear e avaliar erros de genotipagem em estudos de genética populacional. *Ecologia Molecular*, 13, 3261–3273.
- Bonnet, A., Thevenon, S., Maudet, F. e Maillard, JC (2002). Eficiência de PCRs multiplex fluorescentes semiautomáticos com 11 marcadores microsatélites para estudos genéticos de populações de veados. *Genética Animal*, 33, 343–350.
- Boom, R., Sol, CJA, Salimans, MMM et al. (1990). Método rápido e simples para purificação de ácidos nucleicos. *Jornal de Microbiologia Clínica*, 28, 495–603.
- Bradley, BJ e Vigilante, L. (2002). Alelos falsos derivados de DNA microbiano representam uma fonte potencial de erro na genotipagem de microsatélites de DNA de fezes. *Notas de Ecologia Molecular*, 2, 602–605.
- Bradley, BJ, Chambers, KE e Vigilant, L. (2001). Identificação precisa do sexo de macacos baseada em DNA usando amostras não invasivas. *Genética da Conservação*, 2, 179–181.
- Bricker, J., Bushar, LM, Reinert, HK e Gelbert, L. (1996). Purificação de DNA de alta qualidade de peles descartadas. *Revisão Herpetológica*, 27, 133–134.
- Broderick, D., Idaghdour, Y., Korrida, A. e Hellmich, J. (2003). Fluxo gênico em populações de abetardas através do Estreito de Gibraltar conforme elucidado por PCR excremental e sequenciamento de mtDNA. *Genética da Conservação*, 4, 793–800.
- Bryja, J. e Konecny, A. (2003). Identificação rápida do sexo em mamíferos selvagens usando amplificação por PCR do gene Sry. *Folia Zoologica*, 52, 269–274.
- Buchan, JC, Alberts, SC, Silk, JB e Altmann, J. (2003). Verdadeiro cuidado paterno em uma sociedade multi-homem de primatas. *Natureza*, 425, 179–181.
- Campbell, D., Duchesne, P. e Bernatchez, L. (2003). Utilidade AFLP para estudos de atribuição de população: investigação analítica e comparação empírica com microsatélites. *Ecologia Molecular*, 12, 1979–1991.
- Carr, SM, Marshall, HD, Johnstone, KA, Pynn, LM e Stenson, GB (2002). Como saber um monstro marinho: discriminação molecular de grandes mamíferos marinhos do Atlântico Norte. *Boletim Biológico*, 202, 1–5.
- Cercueil, A., Bellemain, E. e Manel, S. (2002). PARENTE: programa de computador para análise de filiação. *Jornal de Hereditariedade*, 93, 458–459.
- Chapman, DD, Abercrombie, DL, Douady, CJ et al. (2003). Uma abordagem de PCR multiplex simplificada, bi-organela para identificação de espécies, aplicação à conservação global e monitoramento do comércio do grande tubarão branco, *Carcharodon carcharias*. *Genética da Conservação*, 4, 415–425.
- Chapman, DD, Prodohl, PA, Gelsleichter, J., Manire, CA e Shivji, MS (2004). Predomínio da monogamia genética por fêmeas em um tubarão-martelo, *Sphyrna tiburo*: implicações para a conservação dos tubarões. *Ecologia Molecular*, 13, 1965–1974.
- Clinchy, M., Taylor, AC, Zanette, LY, Krebs, CJ e Jarman, PJ (2004). Tamanho corporal, idade e paternidade em gambás comuns (*Trichosurus vulpecula*). *Ecologia Molecular*, 13, 195–202.

- Comstock, KE, Ostrander, EA e Wasser, SK (2003). Amplificação do ADN nuclear e mitocondrial do marfim de elefante africano: uma ferramenta para monitorizar o comércio de marfim. *Biologia da Conservação*, 17, 1–4.
- Constable, JL, Packer, C., Collins, DA e Pusey, AE (1995). DNA nuclear de esterco de primata. *Natureza*, 373, 393.
- Constable, JL, Ashley, MV, Goodall J. e Pusey, AE (2001). Atribuição de paternidade não invasiva em chimpanzés de Gombe. *Ecologia Molecular*, 10, 1279–1300.
- Cornuet, JM, Piry, S., Luikart, G., Estoup, A. e Solignac, M. (1999). Novos métodos empregando genótipos multilocus para selecionar ou excluir populações como origens de indivíduos. *Genética*, 153, 1989–2000.
- Creel, S., Spong, G., Sands, JL et al. (2003). Estimativa do tamanho da população em Lobos de Yellowstone com genótipos de microssatélites não invasivos propensos a erros. *Ecologia Molecular*, 12, 2003–2009.
- Cunningham, J., Morgan-Davies, AM e O’Ryan, C. (2001). Contando rinocerontes de esterco: estimando o número de animais em uma reserva usando DNA microssatélite. *Jornal Sul-Africano de Ciência*, 97, 293–294.
- Currat, M., Ray, N. e Excoffier, L. (2004). SPLATCHE: um programa para simular diversidade genética tendo em conta a heterogeneidade ambiental. *Notas de Ecologia Molecular* 4, 139–142.
- Dalebout, ML, Lento, GM, Cipriano, F., Funahashi, N. e Baker, CS (2002). Quantas baleias minke protegidas são vendidas no Japão e na Coreia? Um censo por perfil de microssatélites. *Conservação Animal*, 5, 143–152.
- Dale’n L., Go’therstro’m, A. e Angerbjorn, A. (2004). Identificando espécies a partir de peças de fezes. *Genética da Conservação*, 5, 109–111.
- Dallas, JF, Carss, DN, Marshall, F. et al. (2000). Identificação sexual da lontra euro-asiática *Lutra lutra* por tipagem PCR de entorses. *Genética da Conservação*, 1, 181–183.
- Dallas, JF, Coxon, KE, Sykes, T. et al. (2003). Estimativas semelhantes de população composição genética e proporção sexual derivadas de carcaças e fezes da lontra euro-asiática *Lutra lutra*. *Ecologia Molecular*, 12, 275–282.
- Danzmann, RG (1997). PROBMAX: um programa de computador para atribuir ascendência desconhecida na análise de pedigree de conjuntos genotípicos conhecidos de pais e descendentes. *Jornal da Hereditariedade*, 88, 333.
- Davison, A., Birks, JDS, Brookes, RC, Braithwaite, TC e Mensageiro, JE (2002). Sobre a origem das fezes: métodos morfológicos versus moleculares para pesquisar carnívoros raros a partir de suas fezes. *Jornal de Zoologia* 257, 141–143.
- Deagle, B., Tollit, DJ, Jarman, SN et al. (2005). Escatologia molecular como ferramenta para estudar dieta: análise de presas em fezes de leões marinhos de Steller em cativeiro. *Ecologia Molecular*, 14, 1831–1842.
- Dean, FB, Hosono, S., Fang, L. et al. (2002). Amplificação abrangente do genoma humano usando amplificação de deslocamento múltiplo. *Anais da Academia Nacional de Ciências dos EUA*, 99, 5261–5266.
- Devlin, B., Roeder, K. e Ellstrand, NC (1988). Atribuição fracionária de paternidade: desenvolvimento teórico e comparação com outros métodos. *Genética Teórica e Aplicada*, 76, 369–380.
- Dobey, S., Masters, DV, Scheick, BK et al. (2005). Ecologia dos ursos negros da Flórida no ecossistema Okefenokee – Osceola. *Monografias da Vida Selvagem*, 158, 1–41.

- Duchesne, P., Godbout, M.-H. e Bernatchez, L. (2002). PAPA (pacote de análise de atribuição parental): programa informático de atribuição parental simulada e real. *Notas de Ecologia Molecular*, 2, 191–193.
- Duchesne, P., Castric, T. e Bernatchez, L. (2005). PASOS (atribuição parental de solteiros em sistemas abertos): programa informático para atribuição parental individual com pais desaparecidos. *Notas de Ecologia Molecular*, 5, 701–704.
- Eggert, LS, Rasner, CA e Woodruff, DS (2002). A evolução e filogeografia do elefante africano (*Loxodonta africana*) inferida a partir da sequência de DNA mitocondrial e de marcadores microssatélites nucleares. *Procedimentos da Royal Society Série B*, 269, 1993–2006.
- Eggert, LS, Eggert, JA e Woodruff, DS (2003). Estimando o tamanho da população de animais esquivos: os elefantes da floresta do Parque Nacional Kakum, Gana. *Ecologia Molecular*, 12, 1389–1402.
- Eggert, LS, Maldonado, JE e Fleischer, RC (2005). Isolamento de ácido nucleico a partir de amostras ecológicas: fezes de animais e outros materiais associados. *Evolução Molecular: Produzindo os Dados Bioquímicos, Parte B, Métodos em Enzimologia*, 395, 73–87.
- Eguchi, T. e Eguchi, Y. (2000). Extração de DNA de alto rendimento de pele descartada de cobra ou penas de pássaros usando colagenase. *Cartas de Biotecnologia*, 22, 1097–1100.
- Eldridge, MDB, Kinnear, JE e Onus, ML (2001). População fonte de cangurus de rocha dispersantes (*Petrogale lateralis*) identificados por testes de atribuição em dados genotípicos multilocus. *Ecologia Molecular*, 10, 2867–2876.
- Emery, AM, Wilson, IJ, Craig, S., Boyle, PR e Noble, LR (2001). Atribuição de grupos de paternidade sem acesso a genótipos parentais: acasalamento múltiplo e plasticidade de desenvolvimento em lulas. *Ecologia Molecular*, 10, 1265–1278.
- Epps, CW, Pasbøll, PJ, Wehausen, JD et al. (2005). As rodovias bloqueiam o fluxo gênico e causam um rápido declínio na diversidade genética dos carneiros selvagens do deserto. *Cartas de Ecologia*, 8, 1029–1038.
- Erler, A., Stoneking, M. e Kayser, M. (2004). Desenvolvimento do cromossomo Y marcadores microssatélites para primatas não humanos. *Ecologia Molecular*, 13, 2921–2930.
- Ernest, HB, Penedo, MCT, May, BP, Syvanen, M. e Boyce, W. M (2000). Rastreamento molecular de leões da montanha na região do Vale de Yosemite, na Califórnia: análise genética usando microssatélites e DNA fecal. *Ecologia Molecular*, 9, 433–441.
- Esteban, JA, Salas, M. e Blanco, L. (1993). Fidelidade da DNA polimerase phi29: comparação entre iniciação com proteína e polimerização de DNA. *Jornal de Química Biológica*, 268, 2719–2726.
- Fang, SG e Wan, QH (2002). Um teste de impressão digital genética para identificar carcaças de espécies de cervos protegidas na China. *Conservação Biológica*, 103, 371–373.
- Farrell, LE, Roman, J. e Sunquist, ME (2000). Separação dietética de carnívoros simpátricos identificados por análise molecular de fezes. *Ecologia Molecular*, 9, 1583–1590.
- Fedriani, JM e Kohn, MH (2001). A genotipagem das fezes vincula os indivíduos à sua dieta. *Cartas de Ecologia*, 4, 477–483.
- Fernando, P. e Lande, R. (2000). Análise genética molecular e comportamental de organização social no elefante asiático (*Elephas maximus*). *Ecologia Comportamental Sociobiologia*, 48, 84–91.
- Fernando, P. e Melnick, DJ (2001). Sexagem molecular de mamíferos eutérios. *Notas de Ecologia Molecular*, 1, 350–353.

- Fernando, P., Pfrender, ME, Encalada, SE e Lande, R. (2000). Variação do DNA mitocondrial, filogeografia e estrutura populacional do elefante asiático. *Hereditariade*, 84, 362–372.
- Fernando, P., Vidya, TNC, Rajapakse, C., Dangolla, A. e Melnick, DJ (2003). Genotipagem não invasiva confiável: fantasia ou realidade? *Jornal de Hereditariade*, 94, 115–123.
- Flagstad, Ø., Roed, K., Stacy, JE e Jakobsen, KS (1999). Genotipagem não invasiva confiável baseada em PCR excremental de DNA nuclear purificado com protocolo de esfera magnética. *Ecologia Molecular*, 8, 879–883.
- Flagstad, Ø., Hedmark, E. e Landa, A. et al. (2004). História da colonização e monitoramento não invasivo de uma população restabelecida de wolverine. *Biologia da Conservação*, 18, 676–688.
- Frantz, AC, Pope, LC, Carpenter, PJ et al. (2003). Microsatélite confiável genotipagem do texugo euroasiático (Meles meles). usando DNA fecal. *Ecologia Molecular*, 12, 1649–1661.
- Frantzen, MAJ, Silk, JB, Ferguson, JWH, Wayne, RK e Kohn, MH (1998). Avaliação empírica de métodos de preservação de DNA fecal. *Ecologia Molecular*, 7, 1423–1428.
- Gagneux, P., Boesch, C. e Woodruff, DS (1997a). Acasalamento furtivo em fêmeas de chimpanzés. *Natureza*, 387, 358–359.
- Gagneux, P., Boesch, C. e Woodruff, DS (1997b). Erros de pontuação de microssatélites associados à genotipagem não invasiva baseada em DNA nuclear amplificado a partir de queda de cabelo. *Ecologia Molecular*, 6, 861–868.
- Gagneux, P., Boesch, C. e Woodruff, DS (1999). Estratégias reprodutivas femininas, paternidade e estrutura comunitária em chimpanzés selvagens da África Ocidental. *Comportamento Animal*, 57, 19–32.
- Gagneux, P., Gonder, MK, Goldberg, TL e Morin, PA (2001). Fluxo gênico em populações de chimpanzés selvagens: o que os dados genéticos nos dizem sobre o movimento dos chimpanzés no espaço e no tempo. *Transações Filosóficas da Royal Society Série B*, 356, 889–897.
- Galan, M., Cosson, JF, Aulagnier, S. et al. (2003). Testes de amplificação cruzada de primers unglados em corços (*Capreolus capreolus*) para desenvolver um painel multiplex de 12 locos microssatélites. *Notas de Ecologia Molecular*, 3, 142–146.
- Galan, M., Baltzinger, C., Hewison, AJM e Cosson, JF (2005). Distinguir veados e veados usando DNA extraído de amostras de cabelo e o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). *Boletim da Wildlife Society*, 33, 204–211.
- Garnier, JN, Bruford, MW e Goossens, B. (2001). Sistema de acasalamento e distorção reprodutiva no rinoceronte negro. *Ecologia Molecular*, 10, 2031–2042.
- Gerber, S., Chabrier, P. e Kremer, A. (2003). FAMOZ: um software para análise de parentesco usando marcadores herdados dominantes, codominantes e uniparentais. *Notas de Ecologia Molecular*, 3, 479–481.
- Gerloff, U., Schlotterer, C., Rassmann, K. et al. (1995). Amplificação de repetições de sequência simples hipervariáveis (microssatélites) de DNA excremental de bonobos selvagens (*Pan paniscus*). *Ecologia Molecular*, 4, 515–518.
- Gerloff, U., Hartung, B., Fruth, B., Hohmann, G. e Tautz, D. (1999). Relações intracomunitárias, padrão de dispersão e sucesso de paternidade em uma comunidade selvagem de bonobos (*Pan paniscus*) determinados a partir de análise de DNA de amostras fecais. *Procedimentos da Royal Society Série B*, 266, 1189–1195.

- Boa noite, KF e Queller, DC (1999). Software de computador para realização de testes de probabilidade de parentesco de linhagem utilizando marcadores genéticos. *Ecologia Molecular*, 8, 1231–1234.
- Goossens, B., Graziani, L., Waits, LP et al. (1998a). Paternidade extrapar no marmota alpina monogâmica revelada por análise de microssatélites de DNA nuclear. *Ecologia Comportamental e Sociobiologia*, 43, 281–288.
- Goossens, B., Waits, L. e Taberlet, P. (1998b). Amostras de cabelo arrancado como fonte de DNA: confiabilidade da genotipagem de microssatélites dinucleotídeos. *Ecologia Molecular*, 7, 1237–1241.
- Goossens, B., Chikhi, L., Utami, SS, de Ruiter, J. e Bruford, MW (2000). Uma abordagem de múltiplas amostras e múltiplos extratos para análise de microssatélites de amostras fecais em um macaco arbóreo. *Genética da Conservação*, 1, 157–162.
- Goossens, B., Funk, SM, Vidal, C. et al. (2002). Medindo a diversidade genética em programas de translocação: princípios e aplicação a um projeto de soltura de chimpanzés. *Conservação Animal*, 5, 225–236.
- Goossens, B., Chikhi, L., Jalil, MF et al. (2005). Padrões de diversidade genética e migração em populações de orangotangos (*Pongo pygmaeus*) cada vez mais fragmentadas e em declínio de Sabah, Malásia. *Ecologia Molecular*, 14, 441–456.
- Griffiths, R. e Tiwari, B. (1993). Primers para a amplificação diferencial do gene da região Y determinante do sexo em uma variedade de espécies de mamíferos. *Ecologia Molecular*, 2, 405–406.
- Griffiths, R., Double, MC, Orr, K. e Dawson, RJG (1998). Um teste de DNA para sexo a maioria dos pássaros. *Ecologia Molecular*, 7, 1071–1075.
- Hansen, MM e Jacobsen, L. (1999). Identificação de espécies de mustelídeos: lontra (*Lutra lutra*), vison americano (*Mustela vison*) e doninha (*Mustela putorius*), por análise de DNA de amostras fecais. *Jornal da Sociedade Zoológica de Londres*, 247, 177–181.
- Hansson, B., Bensch, S. e Hasselquist, D. (2003). Uma nova abordagem para estudar dispersão: a migração de novos alelos revela uma dispersão tendenciosa para as fêmeas em grandes toutinegras. *Ecologia Molecular*, 12, 631–637.
- Harlin, AD, Wursig, B., Baker, CS e Markowitz, TM (1999). Esfregaço de pele para análise genética: aplicação em golfinhos (*Lagenorhynchus obscurus*). *Ciência dos Mamíferos Marinhos*, 15, 409–425.
- Hashimoto, C., Furuichi, T. e Takenaka, O. (1996). Relação de parentesco matrilinear e comportamento social de bonobos selvagens (*Pan paniscus*): sequenciamento da região D-loop do DNA mitocondrial. *Primates*, 37, 305–318.
- Hayakawa, S. e Takenaka, O. (1999). A urina como outra fonte potencial de DNA modelo na reação em cadeia da polimerase (PCR). *American Journal of Primatology*, 48, 299–304.
- Hebert, PDN, Cywinska, A., Ball, SL e DeWaard, JR (2003). Biológico identificações através de códigos de barras de DNA. *Procedimentos da Royal Society Série B*, 270, 313–321.
- Hebert, PDN, Stoeckle, MY, Zemlak, TS e Francis, CM (2004). Identificação de aves através de códigos de barras de DNA. *PLoS Biologia*, 2, 1657–1663.
- Hedmark, E., Flagstad, O., Segerstrom, P. et al. (2004). Identificação individual e sexual baseada em DNA a partir de fezes e urina de carcajus (*Gulo gulo*). *Genética da Conservação*, 5, 405–410.

- Hellborg, L. e Ellegren, H. (2003). Sequências marcadas ancoradas conservadas no cromossomo Y (YCATS) para a análise de DNA específico de mamíferos masculinos. *Ecologia Molecular*, 12, 283–291.
- Henegariu, O., Heerema, NA, Dlouhy, SR, Vance, GH e Vogt, PH (1997). PCR multiplex, parâmetros críticos e protocolo passo a passo. *Bio Técnicas*, 23, 504–511.
- Higuchi, R., Von Beroldingen, CH, Sensabaugh, GF e Erlich, HA (1988). Tipagem de DNA a partir de fios de cabelo únicos. *Natureza*, 332, 543–546.
- Hoelzel, AR (2001). Pesca de tubarão em sopa de barbatana. *Genética da Conservação*, 2, 69–72.
- Hoffman, JI e Amos, W. (2005). Erros de genotipagem de microssatélites: abordagens de detecção, fontes comuns e consequências para a exclusão paterna. *Ecologia Molecular*, 14, 599–612.
- Hořss, M., Kohn, M., Pařařbo, S., Knauer, F. e Schroder, W. (1992). Análise de excrementos por PCR. *Natureza*, 359, 199.
- Huber, S., Bruns, U. e Arnold, W. (2002). Determinação do sexo de veados vermelhos usando reação em cadeia da polimerase de DNA de fezes. *Boletim da Wildlife Society*, 30, 208–212.
- Hung, CM, Li, SH e Lee, LL (2004). Tipagem de DNA fecal para determinar a abundância e organização espacial de lontras (*Lutra lutra*) ao longo de dois sistemas de riachos em Kinmen. *Conservação Animal*, 7, 301–311.
- Idaghdour, Y., Broderick, D. e Korrida, A. (2003). As fezes como fonte de ADN para estudos moleculares numa população ameaçada de abetardas. *Genética da Conservação*, 4, 789–792.
- Immel, UD, Hummel, S., Herrmann, B. (1999). Perfil de DNA de fezes de orangotango (*Pongo pygmaeus*) para provar descendência e identidade em animais selvagens. *Eletroforese*, 20, 1768–1770.
- Jeffery, KJ, Abernethy, KA, Tutin, CEG e Bruford, MW (2007). Degradação biológica e ambiental do cabelo de gorila e sucesso da amplificação de microssatélites no DNA extraído do cabelo. *Jornal Biológico da Sociedade Linneana*, 91, 281–294.
- Jensen, T., Pernasetti, FM e Durrant, B. (2003). Condições para sexo rápido determinação em 47 espécies de aves por PCR de DNA genômico de sangue, vasos sanguíneos da membrana da concha e penas. *Biologia Zoológica*, 22, 561–571.
- Jones, AG (2001). GERUD 1.0: um programa de computador para a reconstrução de genótipos parentais de matrizes de progênies usando dados de DNA multilocus. *Notas de Ecologia Molecular*, 1, 215–218.
- Jones, AG (2005). GERUD 2.0: um programa de computador para a reconstrução de genótipos parentais a partir de matrizes de progênies de meio-irmãos com pais conhecidos ou desconhecidos. *Notas de Ecologia Molecular*, 5, 708–711.
- Jones, AG e Ardren, WR (2003). Métodos de análise de filiação em natural populações. *Ecologia Molecular*, 12, 2511–2523.
- Knapp, Los Angeles (2005). Fatos, fezes e estabelecimento de padrões para o estudo dos genes do MHC usando amostras não invasivas. *Ecologia Molecular*, 14, 1597–1599.
- Kohn, MK e Wayne, RK (1997). Fatos sobre fezes revisitados. *Tendências em Ecologia e Evolução*, 12, 223–227.
- Kohn, M., York, EC, Kamradt, DA, Haight, G., Sauvajot, RM e Wayne, RK (1999). Estimar o tamanho da população através da genotipagem das fezes. *Anais da Royal Society SeriesB*, 266, 657–663.

- Kraaijeveld-Smit, FJL, Lindenmayer, DB e Taylor, AC (2002). Dispersão padrões e estrutura populacional em um pequeno marsupial, *Antechinus agilis*, de duas florestas analisadas usando marcadores microssatélites. *Australian Journal of Zoology*, 50, 325–338.
- Launhardt, K., Epplen, C., Epplen, JT e Winkler, P. (1998). Amplificação de microssatélites adaptados de sistemas humanos em DNA fecal de langures *Hanuman selvagens* (*Presbytis entellus*). *Eletroforese*, 19, 1356–1361.
- Launhardt, K., Borries, C., Hardt, C., Epplen, JT e Winkler, P. (2001). Análise de paternidade de rotas reprodutivas masculinas alternativas entre os langures (*Semnopithecus entellus*) de Ramnagar. *Comportamento Animal*, 61, 53–64.
- Li, M., Wei, FW e Goossens, B. et al. (2004). Filogeografia mitocondrial e variação subespecífica no panda vermelho (*Ailuurus fulgens*): implicações para a conservação. *Filogenética Molecular e Evolução*, 36, 78–89.
- Liedloff, A. (1999). Mantel, v. 2: Calculadora de teste não paramétrico Mantel. <http://www.sci.qut.edu.au/nrs/mantel.htm>.
- Linch, CA, Smith, SL e Prahlow, JA (1998). Avaliação do cabelo humano raiz para tipagem de DNA subsequente à comparação microscópica. *Jornal de Ciências Forenses*, 43, 305–314.
- Lívia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N. e Panara, FA (2006). Método não destrutivo, rápido, confiável e barato para amostrar, armazenar e extrair DNA de alta qualidade do muco do corpo dos peixes e das células bucais. *Notas de Ecologia Molecular*, 6, 257–260.
- Lopez-Giraldez, F., Gomez-Moliner, BJ, Marmi, J. e Domingo-Roura, X. (2005). Distinção genética de amostras de cabelo de vison americano e europeu (*Mustela vison* e *M. lutreola*) e doninha europeia (*M. putorius*) por detecção de um SINE específico da espécie e um ensaio RFLP. *Jornal de Zoologia*, 265, 405–410.
- Lorenzini, R., Posillico, M., Lovari, S. e Petrella, A. (2004). Não invasivo genotipagem do ameaçado urso pardo dos Apeninos: um estudo de caso para não deixar os cabelos soltos. *Conservação Animal*, 7, 199–209.
- Lucchini, V., Fabri, E., Marucco, F. et al. (2002). Rastreamento molecular não invasivo de matilhas de lobos colonizadores (*Canis lupus*) nos Alpes ocidentais italianos. *Ecologia Molecular*, 11, 857–868.
- Lukacs, PM e Burham, KP (2005a). Estimando o tamanho da população a partir do DNA dados de captura-recaptura fechados baseados em erros de genotipagem. *Journal of Wildlife Management*, 69, 396–403.
- Lukacs, PM e Burham, KP (2005b). Revisão dos métodos de captura-recaptura aplicáveis à amostragem genética não invasiva. *Ecologia Molecular*, 14, 3909–3920.
- Lukas, D., Bradley, CJ, Nsubuga, AM et al. (2004). Complexo principal de histocompatibilidade e variação de microssatélites em duas populações de gorilas selvagens. *Ecologia Molecular*, 13, 3389–3402.
- Makuwa, M., Souquière, S. e Telfer, P. et al. (2003). Ocorrência de vírus da hepatite em primatas não humanos nascidos na natureza: um inquérito epidemiológico de 3 anos (1998–2001) no Gabão. *Jornal de Primatologia Médica*, 32, 307–314.
- Manel, S., Berthier, P. e Luikart, G. (2002). Detectando a caça furtiva de animais selvagens: identificando a origem dos indivíduos com testes de atribuição bayesiana e genótipos multilocus. *Biologia da Conservação*, 16, 650–659.
- Marshall, TC, Slate, J., Kruuk, LEB e Pemberton, JM (1998). Confiança estatística para inferência de paternidade baseada em probabilidade em populações naturais. *Ecologia Molecular*, 7, 639–655.

- Matsubara, M., Basabose, AK, Omari, I. et al. (2005). Identificação de espécies e sexo de gorilas das planícies ocidentais (*Gorilla gorilla gorilla*), gorilas das planícies orientais (*Gorilla beringei graueri*) e humanos. *Primatas*, 46, 199–202.
- Matsuda, M. (2003). Determinação do sexo em peixes: lições da determinação do sexo gene do teleosteo medaka, *Oryzias latipes*. *Desenvolvimento, Crescimento e Diferenciação*, 45, 397–403.
- Maudet, C., Miller, C., Bassano, B. et al. (2002). DNA de microssatélites e recente métodos estatísticos na gestão da conservação da vida selvagem: aplicações em íbex alpino [*Capra ibex (ibex)*]. *Ecologia Molecular*, 11, 421–436.
- McKelvey, KS e Schwartz, MK (2004a). Erros genéticos associados a estimativa populacional utilizando marcação molecular não invasiva: problemas e novas soluções. *Jornal de Gestão da Vida Selvagem*, 68, 439–448.
- McKelvey, KS e Schwartz, MK (2004b). Fornecendo confiável e preciso estimativas de captura-marcação-recaptura de maneira econômica. *Journal of Wildlife Management*, 68, 453–456.
- McKelvey, KS e Schwartz, MK (2005). DROPOUT: um programa para identificar loci problemáticos e amostras para amostras genéticas não invasivas em uma estrutura de captura-marcação-recaptura. *Notas de Ecologia Molecular*, 5, 716–718.
- Miller, SD, Joyce, P. e Waits, LP (2005). Um novo método para estimar o tamanho de pequenas populações a partir de dados de marcação-recaptura genética. *Ecologia Molecular*, 14, 1991–2005.
- Milligan, BG (1998). Isolamento total de DNA. Em *Análise Genética Molecular de Populações: Uma Abordagem Prática*, ed. AR Hoelzel. Oxford: IRL Press, pp.
- Mills, LS, Citta, JJ, Lair, K., Schwartz, M. e Tallmon, D. (2000). Estimando a abundância animal usando amostragem de DNA não invasiva: promessas e armadilhas. *Aplicações Ecológicas*, 10, 283–294.
- Mitani JC, Merriwether DA e Zhang, CB (2000). Afiliação masculina, cooperação e parentesco em chimpanzés selvagens. *Comportamento Animal*, 59, 885–893.
- Miyaki, CY, Griffiths, R., Orr, K. et al. (1998). Identificação sexual de papagaios, tucanos e mutuns por PCR: perspectivas para estudos de populações selvagens e em cativeiro. *Biologia Zoológica*, 17, 415–423.
- Möller, LM e Beheregaray, LB (2004). Evidência genética de dispersão com base no sexo em golfinhos-nariz-de-garrafa residentes (*Tursiops aduncus*). *Ecologia Molecular*, 13, 1607-1612.
- Moore, MK, Nemiss, JA, Rice, SM, Quattro, JM e Woodley, CM (2003). Uso de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição para identificar ovos de tartarugas marinhas e carnes cozidas para espécies. *Genética da Conservação*, 4, 95–103.
- Morin, PA e Woodruff, DS (1992). Exclusão de paternidade usando múltiplos locos microssatélites hipervariáveis amplificados a partir de DNA nuclear de células ciliadas. Em *Paternidade em Primatas: Testes e Teorias Genéticas*, ed. RD Martin, AF Dixon e EJ Wickings. Basileia: Karger, pp.
- Morin, PA, Messier, J. e Woodruff, DS (1994a). Extração de DNA, amplificação e sequenciamento direto de penas de calau. *Jornal da Sociedade Científica da Tailândia*, 30, 31–41.
- Morin, PA, Moore, JJ, Chakraborty, R. et al. (1994b). Seleção de parentesco, social estrutura, fluxo gênico e evolução dos chimpanzés. *Ciência*, 265, 1193–1201.
- Morin, PA, Wallis, J., Moore, JJ e Woodruff, DS (1994c). Exclusão de paternidade em uma comunidade de chimpanzés selvagens usando repetições de sequência simples hipervariáveis. *Ecologia Molecular*, 3, 469–478.

- Morin, PA, Chambers, KE, Boesch, C. e Vigilant, L. (2001). Análise quantitativa por PCR de DNA de amostras não invasivas para genotipagem precisa de microssatélites de chimpanzés selvagens (*Pan troglodytes verus*). *Ecologia Molecular*, 10, 1835-1844.
- Moritz, C. (1994). Aplicações da análise de DNA mitocondrial na conservação: uma revisão crítica. *Ecologia Molecular*, 3, 401-411.
- Moritz, C. e Cicero, C. (2004). Código de barras do DNA: promessas e armadilhas. *Biologia PLoS*, 2, 1529-1531.
- Mowat, G. e Strobeck, C. (2000). Estimativa do tamanho da população de ursos pardos usando captura de cabelo, perfil de DNA e análise de marcação-recaptura. *Journal of Wildlife Management*, 64, 184-193.
- Murphy, MA, Waits, LP e Kendall, KC (2000). Avaliação quantitativa de métodos de secagem fecal para análise de DNA de urso pardo. *Boletim da Wildlife Society*, 28, 951-957.
- Murphy, MA, Waits, LP, Kendall, KC et al. (2002). Uma avaliação de métodos de preservação de longo prazo para amostras de DNA fecal de urso pardo (*Ursus arctos*). *Genética da Conservação*, 3, 435-440.
- Murphy, MA, Waits, LP e Kendall, KC (2003). A influência da dieta na amplificação do DNA fecal e na identificação do sexo em ursos pardos (*Ursus arctos*). *Ecologia Molecular*, 12, 221-226.
- Navidi, W., Arnheim, N. e Waterman, MS (1992). Uma abordagem de múltiplos tubos para genotipagem precisa de amostras de DNA muito pequenas usando PCR: considerações estatísticas. *Jornal Americano de Desenvolvimento Humano*, 50, 347-359.
- Nielsen, EE, Hansen, MM e Loeschcke, V. (1999). Análise de DNA de amostras antigas: aspectos técnicos, aplicações e perspectivas para conservação. *Hereditas*, 130, 265-276.
- Nota, Y. e Takenaka, O. (1999). Extração de DNA da urina e identificação do sexo em pássaros. *Ecologia Molecular*, 8, 1235-1238.
- Nsubuga, AM, Robbins, MM, Roeder, AD et al. (2004). Fatores que afetam o quantidade de DNA genômico extraído de fezes de macacos e a identificação de um método de armazenamento melhorado. *Ecologia Molecular*, 13, 2089-2094.
- Nuechterlein, GL e Buitron, D. (2000). Uma técnica de campo para extrair sangue de ovos de aves vivas para análise de DNA. *Aves aquáticas*, 23, 121-124.
- Oka, T. e Takenaka, O. (2001). Parentesco de gibões selvagens testada por amostragem de DNA não invasiva e microssatélites polimórficos amplificados por PCR. *Primates*, 42, 67-73.
- Ortega, J., Franco, MD, Adams, BA, Ralls, K. e Maldonado, JE (2004). Um método confiável e não invasivo para determinação do sexo na ameaçada raposa Kit San Joaquin (*Vulpes macrotis mutica*) e outros canídeos. *Genética da Conservação*, 5, 715-718.
- Paetkau, D. (2003). Uma exploração empírica da qualidade dos dados em inventários populacionais baseados em DNA. *Ecologia Molecular*, 12, 1375-1387.
- Paetkau, D. (2004). O número ideal de marcadores em estudos genéticos de captura-marcação-recaptura. *Journal of Wildlife Management*, 68, 449-452.
- Palomares, F., Godoy, JA, Piriz, A., O'Brien, SJ e Johnson, WE (2002). Análise genética fecal para determinar a presença e distribuição de carnívoros esquivos: desenho e viabilidade para o lince ibérico. *Ecologia Molecular*, 11, 2171-2182.

- Palsbøll, P., Allen, J., Brube, M. et al. (1997). Marcação genética de baleias jubarte. *Natureza*, 388, 676–679.
- Palumbi, SR e Cipriano, F. (1998). Identificação de espécies utilizando ferramentas genéticas: o valor das sequências genéticas nucleares e mitocondriais na conservação das baleias. *Jornal de Hereditariedade*, 89, 459–464.
- Pank, M., Stanhope, M., Natanson, L., Kohler, N. e Shivji, M. (2001). Identificação rápida e simultânea de partes do corpo de tubarões morfológicamente semelhantes *Carcharhinus obscurus* e *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) usando PCR multiplex. *Biotecnologia Marinha*, 3, 231–240.
- Parsons, KM (2001). Genotipagem confiável de microssatélites de DNA de golfinhos de fezes. *Notas de Ecologia Molecular*, 1, 341–344.
- Parsons, KM, Dallas, JF e Claridge, DE et al. (1999). Amplificando o DNA mitocondrial dos golfinhos a partir de plumas fecais. *Ecologia Molecular*, 8, 1753-1768.
- Parsons, KM, Piertney, SB, Middlemas, SJ, Hammond, PS e Armstrong, JD (2005). Identificação baseada em DNA de espécies de presas de salmonídeos em fezes de focas. *Jornal de Zoologia*, 266, 275–281.
- Paxinos, E., McIntosh, C., Ralls, K. e Fleischer, R. (1997). Um método não invasivo para distinguir espécies de canídeos: amplificação e restrição enzimática de DNA de esterco. *Ecologia Molecular*, 6, 483–486.
- Pearce, JM, Fields, RL e Scribner, KT (1997). Materiais de ninho como fonte de dados genéticos para estudos ecológicos aviários. *Journal of Field Ornithology*, 68, 471–481.
- Pearse, DE, Eckerman, CM, Janzen, FJ e Avise, JC (2001). Um análogo genético dos métodos de 'marcação-recaptura' para estimar o tamanho da população: uma abordagem baseada em avaliações de ascendência molecular. *Ecologia Molecular*, 10, 2711–2718.
- Pichler, FB, Dalebout, ML e Baker, CS (2001). Extração não destrutiva de DNA de dentes de cachalote e marfim. *Notas de Ecologia Molecular*, 1, 106–109.
- Pidancier, N., Miquel, C. e Miaud, C. (2003). Swabs bucais como método não destrutivo de amostragem de tecido para análise de DNA em anfíbios. *Jornal Herpetológico*, 13, 175–178.
- Piggott, deputado (2004). Efeito da idade da amostra e época de coleta na confiabilidade da genotipagem de microssatélites de DNA fecal. *Pesquisa da Vida Selvagem*, 31, 485–493.
- Piggott, MP e Taylor, AC (2003a). Coleta remota de DNA animal e suas aplicações na gestão da conservação e na compreensão da biologia populacional de espécies raras e crípticas. *Pesquisa da Vida Selvagem*, 30, 1–13.
- Piggott, MP e Taylor, AC (2003b). Avaliação extensiva de métodos de preservação fecal e extração de DNA em espécies nativas e introduzidas na Austrália. *Australian Journal of Zoology*, 51, 341–355.
- Piggott, MP, Bellemain, E., Taberlet, P. e Taylor, A. (2004). Um método de pré-amplificação multiplex que melhora significativamente a amplificação de microssatélites e as taxas de erro para DNA fecal em condições limitantes. *Genética da Conservação*, 5, 417–420.
- Pilgrim, KL, McKelvey, KS, Riddle, AE e Schwartz, MK (2005). Identificação do sexo de felinos com base em amostras genéticas não invasivas. *Notas de Ecologia Molecular*, 5, 60–61.
- Pires, AE e Fernandes, ML (2003). Últimos lincos em Portugal? Abordagens moleculares num cenário de pré-extinção. *Genética da Conservação*, 4, 525–532.

- Prendini, L. (2005). Identificando aranhas através de códigos de barras de DNA. *Jornal Canadense de Zoologia*, 83, 498–504.
- Pritchard, JK, Stephens, M. e Donnelly, P. (2000). Inferência da estrutura populacional usando dados de genótipos multilocus. *Genética*, 155, 945–959.
- Prugh, LR, Ritland, CE, Arthur, SM e Krebs, CJ (2005). Monitorando a dinâmica populacional de coiotes por meio da genotipagem de fezes. *Ecologia Molecular*, 14, 1585–1596.
- Queller, DC e Boag, KF (1989). Estimando parentesco usando marcadores genéticos. *Evolução*, 43, 258–275.
- Randi, E. e Lucchini, V. (2002). Detectando introgressão rara de cão doméstico genes em populações de lobos selvagens (*Canis lupus*) por análises de mistura bayesiana de variação de microssatélites. *Genética da Conservação*, 3, 31–45.
- Reed, JE, Baker, RJ, Ballard, WB e Kelly, BT (2004). Diferenciando Excrementos de lobo cinzento mexicano e coiote usando análise de DNA. *Boletim da Wildlife Society*, 32, 685–692.
- Reed, JZ, Tollit, DJ, Thompson, PM e Amos, W. (1997). Escatologia molecular: o uso da análise genética molecular para atribuir espécie, sexo e identidade individual às fezes das focas. *Ecologia Molecular*, 6, 225–234.
- Roeder, AD, Archer, FI, Poinar, HN e Morin, PA (2004). Um novo método para coleta e preservação de fezes para estudos genéticos. *Notas de Ecologia Molecular*, 4, 761–764.
- Roeder, AD, Jeffery, K. e Bruford, MW (2006). Um microssatélite universal kit multiplex para análise genética de grandes símios. *Folia Primatológica*, 77, 240–245.
- Ronn, A.-C., Andre's, O. e Bruford, MW et al. (2006). Amplificação de deslocamento múltiplo para gerar uma fonte ilimitada de DNA para genotipagem em espécies de primatas não humanos. *Jornal Internacional de Primatologia*, 27, 1145–1169.
- Roon, DA, Thomas, ME, Kendall, KC e Waits, LP (2005a). Avaliação de amostras mistas como fonte de erro em estudos genéticos não invasivos utilizando microssatélites. *Ecologia Molecular*, 14, 195–201.
- Roon, DA, Waits, LP e Kendall, KC (2005b). Um teste de simulação do eficácia de vários métodos para verificação de erros em dados genéticos não invasivos. *Conservação Animal*, 8, 203–215.
- Ross, KG (2001). Ecologia molecular do comportamento social: análises de sistemas reprodutivos e estrutura genética. *Ecologia Molecular*, 10, 265–284.
- Rudnick, JA, Katzner, TE, Bragin, EA, Rhodes, OE e Dewoody, JA (2005). Usando penas perdidas naturalmente para identificação individual, análises de parentesco genético e monitoramento populacional em uma população ameaçada de extinção de águia imperial oriental (*Aquila heliaca*) do Cazaquistão. *Ecologia Molecular*, 14, 2959–2967.
- Russello, MA e Amato, G. (2001). Aplicação de um teste não invasivo baseado em PCR para identificação do sexo em um papagaio ameaçado de extinção, *Amazona guildingii*. *Biologia Zoológica*, 20, 41–45.
- Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S. et al. (2004). Um teste não invasivo para sexo identificação em águia-cobreira (*Circaetus gallicus*). *Sondas Moleculares e Celulares*, 18, 193–196.
- Santiago, ML, Bibollet-Ruche, F., Bailes, E. et al. (2003). Amplificação de um genoma completo do vírus da imunodeficiência simia a partir de RNA fecal de um chimpanzé selvagem. *Jornal de Virologia*, 77, 2233–2242.
- Schander, C. e Willassen, E. (2005). O que o código de barras biológico pode fazer pela marinha biologia? *Pesquisa em Biologia Marinha*, 1, 79–83.

- Schwartz, MC, Tallmon, D. e Luikart, G. (1999). Usando genética para estimar o tamanho das populações selvagens: muitos métodos, muito potencial, utilidade incerta. *Conservação Animal*, 2, 321–323.
- Schwartz, MK, Pilgrim, KL, McKelvey, KS et al. (2004). Hibridização entre lincos canadenses e lincos: resultados genéticos e implicações de manejo. *Genética da Conservação*, 5, 349–355.
- Seddon, JM (2005). Primers específicos para canídeos para sexagem molecular usando amostras de tecido ou não invasivas. *Genética da Conservação*, 6, 147–149.
- Seddon, JM, Parker, HG, Ostrander, EA e Ellegren, H. (2005). SNPs em estudos ecológicos e de conservação: um teste na população de lobos escandinavos. *Ecologia Molecular*, 14, 503–511.
- Segelbacher, G. (2002). Análise genética não invasiva em aves: testando a confiabilidade de amostras de penas. *Notas de Ecologia Molecular*, 2, 367–369.
- Segelbacher, G. e Steinbrück, G. (2001). Fezes de aves para identificação de sexo e análise de microsatélites. *Vogelwarte*, 41, 139–142.
- Shaw, CN, Wilson, PJ e Branco, BN (2003). Um método molecular confiável de determinação de gênero para mamíferos. *Jornal de Mammalogia*, 84, 123–128.
- Shewale, JG, Nasir, H., Schneida, E. et al. (2004). Sistema STR do cromossomo Y, Y-PLEX™ 12, para casos forenses: desenvolvimento e validação. *Diário de Ciências Forenses*, 49, 1278–1290.
- Shivji, M., Clarke, S., Pank, M. et al. (2002). Identificação genética de pelágicos partes do corpo de tubarão para conservação e monitoramento do comércio. *Biologia da Conservação*, 16, 1037–1047.
- Shrimpton, JM e Heath, DD (2003). Censo vs. tamanho efetivo da população de salmão Chinook: efeitos de perturbação ambiental em grande e pequena escala. *Ecologia Molecular*, 12, 2571–2583.
- Signorovitch, J. e Nielsen, R. (2002). PATRI: inferência de paternidade utilizando dados genéticos. *Bioinformática*, 18, 341–342.
- Ardósia, J., Marshall, T. e Pemberton, J. (2000). Uma avaliação retrospectiva de a precisão do programa de inferência de paternidade CERVUS. *Ecologia Molecular*, 9, 801–808.
- Sloane, MA, Sunnucks, P., Alpers, D., Beheregaray, B. e Taylor, AC (2000). Identificação genética altamente confiável de wombats de nariz peludo individuais a partir de pêlos coletados remotamente: um método de censo viável. *Ecologia Molecular*, 9, 1233–1240.
- Smith, KL, Alberts, SC, Bayes, MK et al. (2000). Amplificação entre espécies, genotipagem não invasiva e herança não mendeliana de STRPs humanos em babuínos da savana. *American Journal of Primatology*, 51, 219–227.
- Smulders, MJM, Snoek, LB, Booy, G. e Vosman, B. (2003). Perda completa da diversidade genética do MHC na população de hamster comum (*Cricetus cricetus*) na Holanda: consequências para estratégias de conservação. *Genética da Conservação*, 4, 441–451.
- Steinel, A., Munson, L., van Vuuren, M. e Truyen, U. (2000). Genético caracterização de sequências de parvovírus felino de vários carnívoros. *Jornal de Virologia Geral*, 81, 345–350.
- Stone, J. e Bjorklund, M. (2001). DELRIOUS: um programa de computador projetado para analisar dados de marcadores moleculares e calcular estimativas de delta e parentesco com confiança. *Notas de Ecologia Molecular*, 1, 209–212.

- Storz, JF, Ramakrishnan, U. e Alberts, SC (2002). Tamanho genético efetivo de uma população de primatas selvagens: influência da demografia atual e histórica. *Evolução*, 56, 817–829.
- Stow, AJ, Sunnucks, P., Briscoe, DA e Gardner, MG (2001). O impacto da fragmentação do habitat na dispersão do lagarto de Cunningham (*Egernia cunninghami*): evidências de análises alélicas e genotípicas de microssatélites. *Ecologia Molecular*, 10, 867–878.
- Sugiyama, Y., Kawamoto, S., Takenaka, O., Kumizaki, K. e Norikatsu, W. (1993). Discriminação de paternidade e relações intergrupais de chimpanzés em Bossou. *Primates*, 34, 545–552.
- Symondson, WOC (2002). Identificação molecular de presas em dietas de predadores. *Ecologia Molecular*, 11, 627–641.
- Taberlet, P. (1991). Uma única pena arrancada como fonte de DNA para a genética das aves. *Auk*, 108, 959–960.
- Taberlet, P. e Bouvet, J. (1994). Polimorfismo do DNA mitocondrial, filogeografia e genética de conservação do urso pardo (*Ursus arctos*) na Europa. *Procedimentos da Royal Society Série B*, 255, 195–200.
- Taberlet, P. e Luikart, G. (1999). Amostragem genética não invasiva e identificação individual. *Jornal Biológico da Sociedade Linneana*, 68, 41–55.
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B. et al. (1996). Genotipagem confiável de amostras com quantidades muito baixas de DNA usando PCR. *Pesquisa de ácidos nucleicos*, 24, 3189–3194.
- Taberlet, P., Camarra, J.-J., Griffin, S. et al. (1997). Rastreamento genético não-invasivo da população ameaçada de ursos-pardos dos Pirenéus. *Ecologia Molecular*, 6, 869–876.
- Taberlet, P., Waits, LP e Luikart, G. (1999). Amostragem genética não invasiva: observe antes de saltar. *Tendências em Ecologia e Evolução*, 14, 323–327.
- Takenaka, O., Takashi, H., Kawamoto, S., Arakawa, M. e Takenaka, A. (1993). Amplificação de DNA de microssatélites polimórficos personalizada para testes de paternidade de chimpanzés. *Primates*, 34, 27–35.
- Tallmon, DA, Bellemain, E., Swenson, JE e Taberlet, P. (2004). Monitoramento genético do tamanho efetivo da população e da migração do urso pardo escandinavo. *Journal of Wildlife Management*, 68, 960–965.
- Teletchea, F., Maudet, C. e Hanni, C. (2005). Identificação molecular alimentar e forense: atualização e desafios. *Tendências em Biotecnologia*, 23, 359–366.
- Tikel, D., Blair, D. e Marsh, D. (1996). Fezes de mamíferos marinhos como fonte de DNA. *Ecologia Molecular*, 5, 456–457.
- Triant, DA, Pace, RM e Stine, M. (2004). Abundância, diversidade genética e conservação de ursos negros da Louisiana (*Ursus americanus luteolus*) detectadas através de amostragem não invasiva. *Genética da Conservação*, 5, 647–659.
- Utami, SS, Goossens, B., Bruford, MW, de Ruiter, J. e van Hooff, JARAM (2002). Bimaturismo masculino e sucesso reprodutivo em orangotangos de Sumatra. *Ecologia Comportamental*, 13, 643–652.
- Valderrama, X., Karesh, WB, Wildman, DE e Melnick, DJ (1999). Métodos não invasivos para coleta de tecido capilar fresco. *Ecologia Molecular*, 8, 1749–1752.
- Valie`re, N. (2002). GIMLET: um programa de computador para análise genética individual dados de identificação. *Notas de Ecologia Molecular*, 2, 377–379.
- Valie`re, N. e Taberlet, P (2000). Urina coletada em campo como fonte de DNA para identificação de espécies e indivíduos. *Ecologia Molecular*, 9, 2150–2152.

- Valie' re, N., Berthier, P., Mouchiroud, D. e Pontier, D. (2002). GEMINI: software para testar os efeitos de erros de genotipagem e abordagem multitubos para identificação individual. *Notas de Ecologia Molecular*, 2, 83–86.
- Valsecchi, E., Glockned-Ferrari, D., Ferrari, M. e Amos, W. (1998). Molecular análise da eficiência da amostragem de pele descamada na genética de populações de baleias. *Ecologia Molecular*, 7, 1419–1422.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, WF, Wills, DPM e Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software para identificação e correção de erros de genotipagem em dados de microssatélites. *Notas de Ecologia Molecular*, 4, 535–538.
- Vege, S. e McCracken, GF (2001). Genótipos microssatélites de grandes morcegos marrons (*Eptesicus fuscus*: Vespertilionidae, Chiroptera) obtidos de suas fezes. *Acta Chiroptera*, 3, 237–244.
- Vidya, TNC, Kumar, VR, Arivazhagan, C. e Sukumar, R. (2003). Aplicação de sexagem molecular em populações de elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) de vida livre no sul da Índia. *Ciência Atual*, 85, 1074–1077.
- Vigilante, L. (1999). Uma avaliação de técnicas de extração e amplificação de DNA de cabelos naturalmente perdidos. *Química Biológica*, 380, 1329–1331.
- Vigilante, L., Hofreiter, M., Siedel, H. e Boesch, C. (2001). Paternidade e parentesco em comunidades de chimpanzés selvagens. *Anais da Academia Nacional de Ciências dos EUA*, 98, 12890–12895.
- Wagner, RS, Miller, MP, Crisafulli, CM e Haig, SM (2005). Variação geográfica, estrutura genética e designação de unidade de conservação na salamandra Larch Mountain (*Plethodon larselli*). *Jornal Canadense de Zoologia*, 83, 396–406.
- Espera, LP (2004). Usando amostragem genética não invasiva para detectar e estimar abundância de espécies raras de vida selvagem. Em *Amostragem de espécies raras ou evasivas: conceitos, projetos e técnicas para estimar parâmetros populacionais*, ed. WL Thompson. Washington, DC: Island Press, pp.
- Espera, LP e Leberg, PL (2000). Vieses associados à estimativa populacional usando marcação molecular. *Conservação Animal*, 3, 191–199.
- Waits, LP, Luikart, G. e Taberlet, P. (2001). Estimando a probabilidade de identidade entre genótipos em populações naturais: cuidados e orientações. *Ecologia Molecular*, 10, 249–256.
- Wallin, JM, Holt, CL, Lazaruk, KD, Nguyen, TH e Walsh, PS (2002). Construção de sistemas universais de PCR multiplex para genotipagem comparativa. *Jornal de Ciências Forenses*, 47, 52–65.
- Walsh, HE e Edwards, SV (2005). Genética da conservação e capturas acessórias da pesca no Pacífico: diferenciação mitocondrial e atribuição populacional em albatrozes-de-pés-pretos (*Phoebastria nigripes*). *Genética da Conservação*, 6, 289–295.
- Walsh, PS, Metzger, DA e Higuchi, R. (1991). Chelex-100 como meio para extração simples de DNA para tipagem baseada em PCR de material forense. *Biotécnicas*, 10, 506–513.
- Wan, QH e Fang, SG (2003). Aplicação da reação em cadeia da polimerase espécie-específica na identificação forense de espécies de tigres. *Ciência Forense Internacional*, 131, 75–78.
- Wan, QH, Fang, SG, Chen, GF et al. (2003). Uso de impressão digital de oligonucleotídeos e DNA fecal na identificação da distribuição do tigre chinês (*Panthera tigris amoyensis* Hilzheimer). *Biodiversidade e Conservação*, 12, 1641–1648.

- Wandeler, P., Smith, S., Morin, PA, Pettifor, RA e Funk, SM (2003). Padrões de degeneração do DNA nuclear ao longo do tempo: um estudo de caso em amostras históricas de dentes. *Ecologia Molecular*, 12, 1087–1093.
- Wasser, SK, Shedlock, AM, Comstock, K. et al. (2004). Atribuindo Africano DNA de elefante à região geográfica de origem: aplicações ao comércio de marfim. *Anais da Academia Nacional de Ciências dos EUA*, 101, 14847–14852.
- Wayne, RK e Morin, PA (2004). Genética da conservação na nova era molecular. *Fronteiras em Ecologia e Meio Ambiente*, 2, 89–97.
- Whittier, CA, Horne, W., Slenning, B., Loomis, M. e Stoskopf, MK (2004). Comparação de métodos de armazenamento para amplificação por PCR por transcriptase reversa de RNA de rotavírus de amostras fecais de gorila (*Gorilla g. gorilla*). *Journal of Virological Methods*, 116, 11–17.
- Wilberg, MJ e Dreher, BP (2004). GENECAP: um programa para análise de dados de genótipos multilocus para amostragem não invasiva e estimativa de população de captura-recaptura. *Notas de Ecologia Molecular*, 4, 783–785.
- Will, KW e Rubinoff, D. (2004). Mito da molécula: Os códigos de barras de DNA para espécies não podem substituir a morfologia para identificação e classificação. *Cladística*, 20, 47–55.
- Willis, PM, Cresp, BJ, Dill, LM, Baird, RW e Hanson, MB (2004). Hibridização natural entre botos de Dall (*Phocoenoides dalli*) e botos (*Phocoena phocoena*). *Jornal Canadense de Zoologia*, 82, 828–834.
- Wilson, GJ, Frantz, AC, Pope, LC et al. (2003). Estimativa da abundância de texugos usando tipagem de DNA fecal. *Jornal de Ecologia Aplicada*, 40, 658–666.
- Wolf, C., Hubner, P. e Luthy, J. (1999). Diferenciação de espécies de esturjão por PCR-RFLP. *Pesquisa Alimentar Internacional*, 32, 699–705.
- Woodruff, DS (2003). Genotipagem não invasiva e estudos de campo de primatas não humanos de vida livre. Em *Parentesco e Comportamento em Primatas*, ed. B. Chapais e C. Berman. Oxford: Oxford University Press, pp.
- Woods, JG, Paetkau, D., Lewis, D. et al. (1999). Marcação genética de ursos pretos e marrons de vida livre. *Boletim da Wildlife Society*, 27, 616–627.
- Worthington Wilmer, J., Allen, PJ, Pomeroy, PP, Twiss, SD e Amos, W. (1999). Para onde foram todos os pais? Uma extensa análise de microssatélites de paternidade na foca cinza (*Halichoerus grypus*). *Ecologia Molecular*, 8, 1417–1429.
- Yamamoto, K., Tsubota, T., Komatsu, T. et al. (2002). Identificação sexual do urso negro japonês, *Ursus thibetanus japonicus*, por PCR baseada no gene da amelogenina. *Jornal de Ciência Médica Veterinária*, 64, 505–508.
- Yan, P., Wu, XB, Shi, Y. et al. (2005). Identificação de carne de jacaré chinês (*Alligator sinensis*) por PCR diagnóstico do gene mitocondrial do citocromo b. *Conservação Biológica*, 121, 45–51.
- Yasuda, T., Iida, R., Takeshita, H. et al. (2003). Um método simples de extração de DNA e tipagem de STR de amostras de urina usando um kit de extração de DNA/RNA disponível comercialmente. *Jornal de Ciências Forenses*, 48, 108–110.
- Ydaghdour, Y., Broderick, D. e Korrida, A. (2003). As fezes como fonte de ADN para estudos moleculares numa população ameaçada de abetardas. *Genética da Conservação*, 4, 789–792.
- Zhan, X., Li, M., Zhang, Z. et al. (2006). O censo molecular aumenta a estimativa da população de pandas gigantes em mais de 100%. *Biologia Atual*, 16, R451-R452.