

CAPÍTULO 8

IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA EN TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE

PROBLEMÁTICAS QUE LLEVAN A LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES
SILVESTRES: TRÁFICO DE FAUNA, ADULTERACIÓN DE ALIMENTOS
CON PRODUCTOS SILVESTRES, MEDICINA TRADICIONAL.

María Eugenia D'Amato

8.1. Introducción

En este capítulo presentaremos la problemática de la identificación de *especies e individuos* de especies silvestres. Esta necesidad surge de los requerimientos para asegurar la protección de la biodiversidad, la explotación sustentable de los recursos naturales y la bioseguridad (transporte de patógenos, cuarentenas), entre otros. Se presenta brevemente la situación contextual mundial en forense de fauna, un breve historial de los avances tecnológicos que permiten la práctica de esta disciplina, los avances en análisis genético de datos más importantes y casos emblemáticos de los continentes africano y asiático en la identificación de productos de origen animal.

8.2. El contexto forense: Protección de la biodiversidad

La genética forense de fauna (y flora) es una disciplina relativamente nueva, la cual está íntimamente ligada a la investigación científica para la conservación de especies. Mediante la aplicación de técnicas de genética forense tradicional es posible:

La identificación de especies.

La identificación de la región geográfica o grupo de origen.

La identificación de trazas de material biológico de especies protegidas en situaciones de tráfico o caza ilegal.

Si bien las técnicas de laboratorio son idénticas a las utilizadas en genética forense humana, el análisis posterior de la información genética requiere de un entrenamiento muy específico en análisis filogenético, estadística y genética de poblaciones. Algunos ejemplos de estos casos se encuentran en la sección 8.7. “Problemas específicos de la práctica forense de vida silvestre”.

Sin embargo, la identificación genética es casi el último eslabón de la cadena de acontecimientos en forense de fauna silvestre: para que ello suceda es necesario contar con un marco legal que defina qué especies están protegidas del comercio, el tráfico y la explotación, y de instituciones u organizaciones estatales que aseguren el cumplimiento de la ley, con una clara definición de las consecuencias de su infracción. La instancia de prosecución y los pasos posteriores a la identificación de una actividad criminal se excluye de este capítulo y se presentan sólo algunos casos a nivel informativo.

El estado de vulnerabilidad de especies animales y vegetales es definido individualmente por estados y países independientes y por organizaciones o tratados internacionales, como la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*, <http://www.iucn.org>) y CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, www.cites.org), respectivamente.

CITES es un acuerdo internacional firmado originalmente por 80 estados en 1973 y que actualmente cuenta con 178 estados signatarios.

La función de este tratado es asegurar la supervivencia de especies silvestres afectadas por el tráfico internacional. CITES determina las especies para las cuales es necesario contar con una licencia para su importación o exportación. Los estados signatarios definen, dentro de su sistema legal, el organismo que extiende las licencias y nombra asesores científicos a tal propósito.

De acuerdo al grado de vulnerabilidad de las especies, CITES define 3 niveles de protección en los apéndices I, II y III, los cuales son listas de organismos en nivel decreciente de vulnerabilidad.

Apéndice I: incluye especies amenazadas de extinción. El comercio de estas especies se permite en forma excepcional.

Apéndice II: incluye especies no necesariamente amenazadas de extinción, pero su comercio debe ser controlado para asegurar su supervivencia

Apéndice III: incluye especies protegidas en al menos 1 país.

IUCN es una organización sin fines de lucro fundada en 1948, compuesta por más de 1.200 miembros. Entre ellos figuran estados, oficinas gubernamentales y organizaciones no gubernamentales (ONGs) nacionales e internacionales que desarrollan programas de educación, desarrollo sustentable, conservación, políticas globales y aspectos legales relacionados con la conservación de la naturaleza.

Esta organización definió 7 categorías de vulnerabilidad de especies silvestres: de última preocupación (*least concern*), casi amenazadas (*near threatened*), vulnerables (*vulnerable*), en peligro (*endangered*), en estado crítico (*critically endangered*), extinta en estado salvaje (*extinct in the wild*) y extinta (*extinct*) (<http://www.iucnredlist.org/>). Estas categorías son utilizadas para el planeamiento de la conservación de especies, el monitoreo y la toma de decisiones.

Los problemas ambientales y relacionados con tráfico o explotación de especies silvestres muchas veces exceden los límites geográficos nacionales y se requiere la acción coordinada de organismos supranacionales que aseguren la protección de especies y el

cumplimiento de la legislación internacional. La red internacional de mayor envergadura es la ASEAN-WEN (*Association of Southeast Asian Nations Wildlife Enforcement Network*, <http://www.asean-wen.org/>) que nuclea aduanas, cuerpos de policía y diversas agencias gubernamentales y ambientales de 10 países (Brunéi, Camboya, Indonesia, Laos, Malasia, Myanmar, Filipinas, Singapur, Vietnam y Tailandia). Nueva Zelandia y Australia acordaron otra organización internacional, AELERT (*Australasian Environmental Law Enforcement and Regulations Network*), que nuclea diversas agencias locales, estatales y federales con el fin de coordinar acciones que aseguren la protección del medio ambiente. Una organización similar se creó en 2011 en Centroamérica, ROAVIS (*Red de Observancia y Aplicación de la Normativa de Vida Silvestre de Centro América y República Dominicana*). Esta organización coordina las acciones de protección contra el tráfico de fauna entre Sudamérica y Norteamérica y cuenta con financiación del Departamento de Estado de Estados Unidos. Los estados componentes de ROAVIS son Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y República Dominicana. ROAVIS es avalada por la ONG internacional TRAFFIC (<http://worldwildlife.org/initiatives/traffic-the-wildlife-trade-monitoring-network>) la cual es subsidiaria o una iniciativa dependiente del WWF (*World Wildlife Fund*, www.wwf.org)

Otras ONGs y organizaciones internacionales especializadas en forense de vida silvestre se especializan en la diseminación de conocimiento, coordinación de actividades, construcción de capacidad operativa y obtención de fondos para determinados proyectos de desarrollo forense. Por ejemplo, TRACE (*Tools and Resources for Applied Conservation and Enforcement*, <http://www.tracenetwork.org>), fundada en 2006.

El organismo internacional de mayor alcance y prestigio en la acción coordinada contra el crimen internacional es Interpol. Interpol es una organización internacional que cumple la función de coordinar acciones

contra el crimen internacional organizado y adquirir y compartir información de importancia para combatir crímenes de diversa índole. Esta agencia cuenta con un Programa de Crimen Ambiental, con secciones especializadas en vida silvestre, polución y pesca. También coordina el entrenamiento coordinado de personal de seguridad de distintos países con problemas comunes, como el tráfico de fauna en África.

Las organizaciones nacionales involucradas en la prevención del tráfico y explotación ilegal de fauna son generalmente las fuerzas policiales y de parques nacionales. Como la genética forense de fauna es una disciplina relativamente nueva, hay pocos países que cuentan con laboratorios estatales especializados en esta disciplina y los análisis son generalmente derivados a grupos de investigación especializados pertenecientes a universidades, museos de ciencias naturales, institutos de investigación, o zoológicos.

Entre las organizaciones nacionales más activas figuran PAW (*Partnership for Actions Against Wildlife Crime*) en Gran Bretaña, (<http://www.defra.gov.uk/paw/about/>), destinada a implementar y efectivizar las leyes de protección del medio ambiente y de la vida silvestre y de la cual participan miembros de organizaciones gubernamentales y no gubernamentales.

En Estados Unidos, dos organizaciones gubernamentales se ocupan de implementar el cumplimiento de leyes para distintos sectores de ambiente y vida silvestre. El Servicio de Vida Salvaje y Pesca de EE.UU. (USFWS, *United States Fish and Wildlife Service*) cuenta con un organismo especializado que se encarga de hacer cumplir la ley (*United States Fish and Wildlife Service Office of Law Enforcement*). El gobierno de EE.UU. también cuenta con un laboratorio especializado y dedicado solamente a forense de vida silvestre (*Fish & Wildlife Service Forensics Laboratory*) en Ashlan, Oregon (<http://www.fws.gov/lab/>). La política y las implementaciones gubernamentales en contra del tráfico de fauna en EE.UU. pueden verse en Wyler y Sheik (2013).

La Sociedad para la Ciencia Forense de Vida Silvestre (*Society for Wildlife Forensic Science*, www.wildlifeforensicscience.org/) fue creada en enero de 2011, con 52 laboratorios miembros de los Estados Unidos, Canadá, Brasil, Australia, Nueva Zelandia, Gran Bretaña, Suecia, Suiza, India, Malasia, Hong-Kong, Tailandia y Sudáfrica. Mediante una iniciativa de esta sociedad se creó, en forma análoga al SWGDAM (*Scientific Working Group for DNA Analysis Methods*) para genética forense humana en EE.UU y también en 2011, el Grupo Científico de Trabajo para las Ciencias Forenses de Vida Silvestre (SWGWILD, *Scientific Working Group for Wildlife Forensic Sciences*) encargado de delinear recomendaciones de prácticas a seguir en procedimientos de forense de vida silvestre. Se puede acceder a estas recomendaciones en el sitio <http://www.wildlifeforensicscience.org/swqwild/>.

8.3. Tráfico de fauna: crimen de escala global

Las regiones más afectadas por el tráfico internacional de fauna son África y Asia. Las mismas cuentan con una enorme riqueza de biodiversidad, pero son también de las más pobres del planeta. El tráfico internacional de especies y productos animales de alto valor está normalmente ligado a otras organizaciones criminales, también internacionales, que facilitan el tráfico de drogas o armas y la presencia de milicias organizadas en países con inestabilidad política, que aprovechan la disponibilidad de especies de gran valor en el mercado ilícito para solventar sus actividades (Warchol et al., 2004; Milliken y Shaw, 2012; CITES, IUCN & TRAFFIC, 2013).

El reporte de WWF (Dalberg, 2012) indica que el tráfico de vida silvestre y sus productos, excluyendo pesquerías y maderas, ocupa el cuarto lugar de comercio ilícito en el mundo, después del tráfico de narcóticos, falsificaciones y tráfico humano, con un marco que excede los 10 mil millones⁽²⁾ de USD anuales.

La pobreza y las costumbres locales también implican una amenaza para la fauna local. Un reporte del Parlamento de Gran Bretaña sobre el “comercio de carne del monte” (*bushmeat trade*) en la cuenca de Congo indica que el tráfico de animales para este fin alcanza las 3,4 millones de toneladas por año, mientras que en la cuenca del Amazonas los volúmenes de tráfico no llegan a un 5% de este valor (PostNote, 2005). Una revisión más reciente y detallada, avalada por TRAFFIC (www.traffic.org), presenta los valores de volumen de caza y precios en el mercado de “carne del monte” en África (Lindsay et al., 2012). El tráfico de aves y reptiles es también un comercio de gran envergadura en Sudáfrica y Namibia, con destino a ser utilizados como mascotas (Warchol et al., 2003).

8.4. Breve historia de la genética forense

8.4.1. Los avances tecnológicos

El desarrollo de la genética forense de especies salvajes (o especies no-modelo) está íntimamente asociado al desarrollo de los estudios poblacionales y evolutivos de estas especies. Son precisamente estos trabajos los que posibilitaron contar con secuencias de ADN de referencia. Hubo dos hitos importantes en el desarrollo de tecnologías que permitieron un incremento exponencial no solamente en genética forense sino en la disponibilidad pública de secuencias de ADN. El primero fue el desarrollo del método de PCR (Saiki et al., 1985, 1988), trabajo que le valió a Kary Mullis el premio Nobel de Química en 1993. La reacción de PCR tuvo un enorme impacto en las ciencias biológicas y biomédicas. La posibilidad de obtener una gran cantidad de producto (secuencias de ADN) también facilitó la combinación de la reacción de PCR con el método de secuenciación de ADN mediante la utilización de dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). En 1989, el equipo de Allan Wilson⁽¹⁾ de la Universidad de California en Berkeley, EE.UU, publicó los primeros

primers universales para diversos genes mitocondriales (Kocher et al., 1989). Estos hechos dieron un enorme impulso al estudio de organismos no-modelo y permitió el avance de estudios filogenéticos y poblacionales de un gran espectro de organismos eucariotas y procariotas. El incremento exponencial de la disponibilidad de secuencias de los genes mitocondriales citocromo b (cyt b) se muestra en la Figura 8.1. La creciente disponibilidad de una gran cantidad de información genética de referencia facilitó el desarrollo de la genética forense faunística (Hsieh et al., 2001; Hsieh et al., 2003).

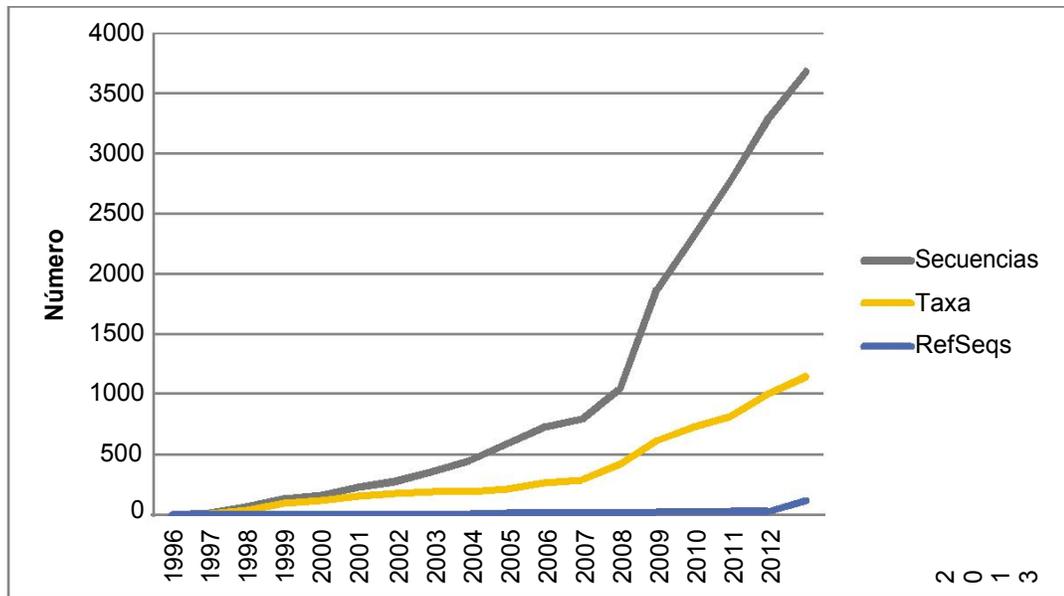


Figura 8.1: Ejemplo de la creciente disponibilidad de secuencias mitocondriales de animales en GenBank. Se muestran el número de secuencias disponibles para “Bovidae” y “cytb”, el número de taxa y el número de genomas mitocondriales completos elegidos como referencia para la base de datos RefSeq and NCBI.

A mediados de la década del 80 nacen los métodos modernos de identificación genética de individuos. La primera investigación forense resuelta por polimorfismos de ADN fue conducida por el profesor Sir Alec Jeffreys, quien resolvió un problema de inmigración de un niño de Ghana, probando la relación de parentesco con su madre y hermanos

residentes en Gran Bretaña (Jeffreys et al., 1985b). La técnica que desarrolló fue denominada “huellas digitales genéticas” (*DNA fingerprinting*) y utilizaba sondas marcadas radioactivamente para detectar fragmentos de ADN genómico cortado con enzimas de restricción y transferido a un soporte sólido, como membranas de nitrocelulosa. Las sondas representaban motivos repetidos que aparecían dispersos en el genoma en organizaciones en tándem de cientos de pares de bases. La utilización de esta técnica de identificación de polimorfismos de repeticiones (minisatélites, Jeffreys et al. 1985a) dominó la genética forense hasta principios de los '90. Esta técnica de las huellas genéticas también se usó en otros organismos en estudios poblacionales, identificación de líneas, cepas, pedigrís, entre otros.

En la década del '90, los marcadores que toman la delantera en la identificación de individuos son los microsátélites, marcadores que dominaron la genética forense humana desde entonces. Estos son de enorme utilidad en estudios evolutivos, genética de poblaciones y estudios genealógicos (Goldsstein y Schlotterer, 1999).

En identificación de especies, los SNPs adquieren mayor relevancia. A partir de trabajos originales como los de Bartlett y Williamson (1992) se desarrollaron innumerables métodos específicos de detección de especies a partir de material biológico. Los métodos modernos varían desde la utilización de primers especie-específicos para la generación de productos de PCR de tamaño específico, a la utilización de métodos automatizados de detección de SNPs (Ogden et al., 2009).

El último gran hito tecnológico es el desarrollo de tecnologías genómicas de secuenciación clonal, conocidas como secuenciación de próxima generación (NGS) (Mardis, 2013). Esta tecnología es particularmente útil para el estudio de material de origen mixto o mezclas de productos de distintas fuentes y fue utilizada en la investigación de la identidad de productos medicinales tradicionales asiáticos (ver sección

Casuística). Ogden, en su revisión de 2011, detalla la potencialidad y diversidad de estas técnicas en forense de vida silvestre.

8.4.2. Una necesidad imperiosa: las bases de datos

En todo sistema de identificación genética es necesario contar con un sistema de referencia. Así como la identificación de individuos en genética forense humana requiere del conocimiento de las frecuencias alélicas o haplotípicas poblacionales, en la identificación de especies es necesario tener un sistema de referencia apropiado, tanto para la identificación de especies como de individuos. En la sección anterior se indicaron los eventos científicos que permitieron el incremento de la información disponible. En esta sección se presentan las bases de datos de secuencias de ADN que permiten el acceso a esta información.

Las dos bases de datos de mayor impacto (utilización) son GenBank y BOLD. Estas difieren en alcance e interés. El NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) de EE.UU contiene diversas bases de datos genéticos y genómicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/all/#databases>), entre ellas GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), creada en 1982. Esta base de datos es depositaria de secuencias completas de genomas de diversas especies (especie humana, especies domésticas y varios microorganismos), diversas secuencias completas o parciales de genes nucleares o mitocondriales y genomas mitocondriales completos de diversas especies silvestres. Estas secuencias son enviadas directamente a la base de datos, sin intención de publicación posterior, o forman parte de trabajos publicados en revistas científicas internacionales con revisión por pares previo a su publicación. Muchas editoriales exigen la disponibilidad pública de las secuencias utilizadas en los estudios filogenéticos o poblacionales como condición *sine qua non* (*Wiley Scientific Publications*, <http://www.wiley.com/WileyCDA/>) para la publicación de trabajos científicos. GenBank es el mayor repositorio mundial de secuencias de ADN. Sin embargo, no está exento de errores

ya que no cuenta con controles de calidad de interpretación de electroferogramas y secuencias, como es la norma en bases de datos genéticas humanas de aplicación forense como EMPOP (empop.org). Otras fuentes de error son las identificaciones erróneas de especies y posiblemente el error humano y la confusión de muestras durante el procesamiento de información en los laboratorios. Ejemplos de identificación de depósitos erróneos en GenBank se pueden encontrar en Harkins et al. (2006), Teletchea et al. (2008), Linacre and Tobe (2011), D'Amato et al. (2013).

La base de datos BOLD es más reciente. Fundada en 2003, es depositaria de un fragmento de 648 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad 1 (COI). Este fragmento, de gran utilidad para la identificación de especies, fue denominado “código de barras de la vida” (*barcoding of life*, Hebert et al., 2003; Ratnasingham y Hebert, 2007). La información enviada a esta base de datos debe estar acompañada de información sobre el “voucher” de origen, institución de origen e información biológica adicional. Las secuencias depositadas en BOLD se encuentran también disponibles en GenBank, pero la situación inversa no se cumple. No todas las secuencias de COI en GenBank cumplen con las condiciones de aceptación para BOLD.

8.5. La problemática más frecuente en la práctica forense de vida silvestre

Las técnicas mencionadas en esta sección tuvieron un gran impacto científico que excedió el campo de la genética forense humana. Si bien la organización y estandarización de la genética forense de vida silvestre fue un poco más tardía (ver sección siguiente), contó con la ventaja de utilizar la experiencia adquirida en la práctica forense humana para la obtención de datos.

Sin embargo, el tipo de marcadores a utilizar depende del tipo de pregunta que se intenta responder. A diferencia de la genética forense humana, que generalmente requiere de un análisis de parentesco, la práctica de genética forense de especies silvestres suele requerir de análisis filogenético o de la identificación del grupo, stock, linaje o variante geográfica al cual un determinado individuo pertenece. Los procedimientos generales de práctica de laboratorio y de análisis de datos se detallan a continuación.

8.6. Los procedimientos estándar

En forma similar a la práctica de genética forense humana, la práctica de genética forense animal debe seguir protocolos de trabajo que aseguren la calidad (*quality assurance*) de los resultados y definan controles de calidad de los procedimientos utilizados. Budowle et al. (2005) describen la necesidad de establecer prácticas de laboratorio que reduzcan la posibilidad de contaminación y aseguren la calidad de los resultados, como el testeado de reactivos con anterioridad al análisis de muestras, la utilización de controles negativos durante la extracción del ADN y de la preparación de la reacción de PCR, y la calibración y el monitoreo regular de la precisión de instrumentos. Los procedimientos experimentales de laboratorio deben estar adecuadamente validados, es decir, se deben conocer los límites de sensibilidad, reproducibilidad, exactitud, precisión y los parámetros experimentales dentro de los cuales se obtienen perfiles genéticos similares (Para más detalles, ver el capítulo 10).

Los procedimientos estándar de operación (SOP, *standard operating procedures*) deben establecer claramente qué criterios se utilizaron para la denominación de alelos de microsatélites, basados exclusivamente en el número de repeticiones presentes en el fragmento amplificado por PCR. Una nomenclatura claramente expresada permite la comparación de datos entre laboratorios. En la denominación de secuencias de ADN

mitocondrial, los sitios polimórficos son expresados utilizando genomas mitocondriales de referencia, por ejemplo los presentes en la sección RefSeq de GenBank (<http://ftp.cbi.pku.edu.cn/pub/database/RefSeq/release/mitochondrion/?C=D;O=A>) gato (NC_001700), pollo (NC_001323), vaca (NC_001567), perro (NC_002008), cabra (NC_005044), caballo (NC_001640), cerdo (NC_000845) y oveja (NC_001941) y para especies salvajes de ciervo (NC_004563), oso (NC_003426), salmón (NC_001960), y esturión (NC_004420); o bien genomas mitocondriales adoptados como referencia por la comunidad científica por su temprana fecha de publicación (genoma de *Bos taurus* V00654, Anderson et al., 1982).

Sin embargo, en un reporte forense, una identificación *ad hoc* no es válida y las conclusiones del análisis deben estar acompañadas de valores numéricos o analíticos que las avalen. A continuación se presentan los procedimientos más frecuente de comparación de secuencias, grado de similitud entre secuencias y parámetros evaluados en búsquedas en bases de datos y evaluación de similitud por métodos filogenéticos, conjuntamente con sus ventajas, problemas y limitaciones.

8.7. Problemas específicos de la práctica forense de vida silvestre

8.7.1. Especies. Delimitación e identificación de especies

Una de las situaciones más frecuentes en la práctica de genética forense de vida silvestre es la identificación de especies protegidas en productos de origen animal o en trazas de material biológico en ropas y utensilios de cazadores ilegales. Esta situación nos retrotrae a la pregunta posiblemente más fundamental en biología: ¿Qué es una especie? No es la intención de este capítulo resumir la problemática de la delimitación de especies, sino presentar los problemas enfrentados en forma práctica y cómo reportar la identificación específica. En definitiva,

la práctica taxonómica muchas veces es reducida al criterio personal del investigador, resumido en la frase “una especie biológica es lo que un taxónomo entiende como tal”⁽³⁾.

Los pasos fundamentales en la identificación forense de especies son los siguientes:

1. Elección de una secuencia de ADN a estudiar.
2. Obtención de información genética del espécimen, muestra, producto de origen animal o vegetal, mancha, provista por autoridades pertinentes para el análisis.
3. Comparación del resultado con secuencias de referencia.
4. Validación de la correspondencia (*match*).

El primer paso en la identificación de especies es la *elección de un fragmento de ADN* que sea altamente informativo. Esta condición está dada por el grado de polimorfismo inter-específico de dicho gen y la cantidad de información disponible como referencia en las bases de datos. Históricamente, los fragmentos de ADN que dominaron esta práctica son los genes mitocondriales *cyt b* y *COI*. De las 1140 bases de *cyt b* generalmente se utiliza una región de aproximadamente 360 del pb, mientras que de las 1544 bases de *COI* se utiliza un fragmento de aproximadamente 600 pb. El debate sobre cuál es más adecuado para la identificación de especies fue extensamente cubierto por la literatura científica. El trabajo de Tobe et al. (2011) indica que la señal filogenética de *cyt b* es mayor que la de *COI*.

El diseño experimental se basa entonces en la secuencia de ADN informativa a estudiar. La extracción de ADN es seguida de una reacción de PCR utilizando primers universales y/ o especie-específicos, seguidos de una reacción de secuenciación, utilizando el método de Sanger de terminación por dideoxinucleótidos.

El siguiente paso es la comparación del resultado obtenido con otras secuencias de referencia. La práctica más recomendable es la obtención de estas referencias en el laboratorio forense utilizando material

conocido provisto por especialistas que certifiquen la identidad taxonómica de las muestras (*vouchers* de BioBanks, zoológicos o museos). La utilización de referencias existentes en bases de datos es la práctica más frecuente, por ejemplo, la exploración directa de GenBank y BOLD.

La función “BLAST search” en GenBank permite determinar cuáles son las secuencias más similares a la de estudio y que están presentes en la base de datos. El resultado de GenBank BLAST es una lista de secuencias ordenadas de mayor a menor similitud con respecto a la secuencia en estudio. Los parámetros que permiten evaluar el grado de similitud son el “bit-score” (score máximo y total), E-value, porcentaje de identidad y grado de cobertura. El último es un valor muy intuitivo; es el grado de solapamiento entre la secuencia en estudio y otras existentes en la base de datos. Una cobertura del 50% indica que la secuencia en estudio es superpuesta o cubierta sólo en la mitad de su extensión por otra existente en la base de datos. La calidad del alineamiento entre la secuencia en estudio y las existentes en la base de datos está dada por los valores de “bit score” (cuanto mayor el valor, más confiable es el alineamiento) y un valor estadístico de la probabilidad de que una similitud de ese tipo ocurra por azar está dada por el E-value. Cuanto más bajo el E-value, menor es la posibilidad de una correspondencia (*match*) por azar. Por ejemplo, un valor de $E=0,01$ indica que existe una probabilidad en 100 de que esa correspondencia ocurra por azar. Estos valores deben ser adecuadamente evaluados, ya que una base de datos deficiente en determinados taxa puede dar valores altos de score, que no son necesariamente las más próximas en sentido filogenético.

Durante el estudio de la identidad específica de charqui (*biltong*) en Sudáfrica (D’Amato et al., 2013), la especie con máximo bit-score (756) para una secuencia de COI (acceso a GenBank JX567041) resultó *Lagorchestes hirsutus*, canguro liebre (hare-wallaby), una pequeña especie de Macropodidae. El resultado mostró un 100% de cobertura, un E-value de 0,0 (0 probabilidad de un match de este tipo por azar) y una

identidad del 88%. La misma muestra fue secuenciada para cytb (acceso a GenBank JX567196). Esta vez la especie con máximo bit-score (586) y 100% de cobertura fue el canguro rojo *Macropus rufus*, el Macropodidae de mayor tamaño, con un E-value de 10^{-158} . Estos resultados indican la escasez de secuencias de COI para especies de Macropodidae en el GenBank.

La inspección de match en el GenBank es una primera aproximación, que debe ser validada por otros métodos. Las bases de datos presentan limitaciones y, como se demostró arriba, la representatividad de taxa y genes suele ser limitada. La inspección de las distancias genéticas intra- e inter-específicas fue sugerida por el trabajo de Tobe et al. (2010). Estos autores investigaron los rangos de distancia genética intra- e inter-específica para cyt b y COI utilizando datos de 236 especies de mamíferos. Para ello utilizaron la distancia de Kimura de 2 parámetros multiplicada por 100 [K2P (x100)] (Kimura-2-Parameter-Model; Kimura, 1980). Este es un modelo de sustitución nucleotídica que considera diferente ritmo de sustitución para transiciones y transversiones. Estos autores observaron que las diferencias intra- e inter-específicas mostraban valores de K2P (x100) menores que 1,5 % y mayores que 2,5%, respectivamente.

Estos valores deberían considerarse cuidadosamente en un análisis forense. Especies con una importante estructura genética poblacional o que hayan sufrido una importante deriva génica pueden mostrar valores intra-específicos superiores al 2% de similitud genética. En el otro extremo se encuentran las especies con historias evolutivas muy recientes, como los ñus o los Équidos, con importantes eventos de especiación en el Pleistoceno. En el estudio de D'Amato et al. (2013) mencionado anteriormente, la evaluación de toda la información disponible para especies detectadas en *biltong* encontró valores intra-específicos de hasta un 10% de divergencia entre especies de jirafas y valores menores que 2,5% de divergencia entre el ñu azul y el ñu negro. Los valores encontrados por Tobe et al. (2010) son una buena guía

inicial, pero es altamente recomendable realizar una evaluación exhaustiva de toda la información disponible para la/s especie/s en estudio, utilizando otros métodos, como el análisis filogenético.

El análisis filogenético tiene la ventaja de poder identificar grupos de secuencias en agrupamientos jerárquicos de mayor a menor similitud. Los métodos filogenéticos permiten obtener valores estadísticos que apoyen la credibilidad de estos grupos. Los métodos de máxima parsimonia, máxima probabilidad (maximum likelihood) y distancia (neighbor joining) utilizan un reemplazo (bootstrap) de nucleótidos y con estas nuevas secuencias con algunos nucleótidos reemplazados se vuelve a reconstruir la filogenia un determinado número de veces. La proporción de veces que las ramas del árbol son recuperadas en forma idéntica al árbol original es el valor de *bootstrap*, el cual es presentado en el nodo. En general se acepta 95% o mayor como valores confiables de topología. Valores menores que 50% en general no se muestran por su bajo nivel de confiabilidad. Yang y Rannala han publicado recientemente una revisión de métodos moleculares filogenéticos (2012).

Los resultados de una reconstrucción filogenética deben ser también evaluados cuidadosamente. Un elevado valor de *bootstrap* en los nodos indica que estas secuencias están emparentadas pero no necesariamente indica identidad específica. Se requiere una evaluación de la distancia genética entre los componentes de un grupo, clado o rama.

Una limitación inherente de los marcadores uniparentales es, precisamente, su carácter de uniparental. Las secuencias mitocondriales pierden calidad de información para casos de hibridación e introgresión. En el estudio de identidad de especies utilizadas para manufacturar *biltong*, se evaluaron referencias provistas por especialistas, secuencias presentes en GenBank y secuencias encontradas en la carne durante el estudio. Las especies de ñu entraron en contacto secundario por acción antropogénica en Sudáfrica. Parte del material de referencia provisto por

los especialistas no correspondía a la especie esperada de ñu, lo que refleja un grado de introgresión importante después del cual no es posible identificar híbridos, que adquieren el fenotipo de la especie en la que lo absorbe genéticamente.

8.7.2. Determinación del origen geográfico de los especímenes.

Asignación

El análisis de la distribución geográfica de la diversidad genética en una especie es una necesidad prioritaria en el diseño de unidades de conservación. El término filogeografía fue acuñado por Avise y colaboradores en 1987 (Avise et al., 1987), originado del análisis de distribución geográfica de linajes mitocondriales dentro de una especie. Esta concepción permitió el desarrollo del concepto de UES (Unidades Evolutivas Significativas; Moritz, 1994).

Entre las secuencias mitocondriales más utilizadas en filogeografía y estudios intra-específicos figuran *cyt b* y *D-loop*. El último muestra un ritmo de mutación 10 veces mayor al observado en las secuencias mitocondriales codificantes y similar al de los microsatélites.

Durante el análisis de *biltong* en D'Amato et al. (2013) una de las especies identificadas fue la cebrá Cape Mountain, incluida en el apéndice II de CITES. El análisis filogenético con *cyt b* sugiere que la carne de este espécimen provenía de Namibia y no de Sudáfrica.

En los últimos 14 años se han publicado y perfeccionado métodos de asignación de individuos a poblaciones mediante el uso de marcadores diploides. Los primeros intentos estuvieron basados en la utilización de frecuencias alélicas existentes en grupos predeterminados o conocidos (Petkau et al., 1995; Eichert y Banks, 2000) para determinar la probabilidad de un genotipo de pertenecer a ellos. Cornuet et al. (1999), basados en Rannala y Mountain (1997), desarrollaron un método bayesiano parcial en el que mediante simulaciones de Monte Carlo se generan genotipos de poblaciones parentales previo a la asignación del

genotipo de interés. Estos métodos se hallan implementados en el programa GenClass (Piri et al., 2004) y representan métodos supervisados de clasificación en los que los grupos de asignación son predeterminados o conocidos por el investigador. Más recientemente, Wesser et al. (2004) elaboraron un método de inferencia de frecuencias alélicas en regiones geográficas no muestreadas, partiendo de datos genotípicos y distribución geográfica de los mismos. Así, es posible la asignación de muestras de origen desconocido a regiones geográficas de las cuales no se cuenta con información. Este método tiene una ventaja sobre los mencionados más arriba, en los que las asignaciones se encuentran limitadas a muestras conocidas; el mismo fue utilizado en la inferencia de la zona de origen de marfil africano confiscado (ver sección Casuística 8.8).

Todos estos métodos asumen equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento (LE). La utilidad y limitaciones de estos métodos de asignación fueron evaluadas por Manel et al. (2002) y Ball et al. (2011) con ejemplos de datos publicados para estudios de genética de poblaciones y estudios forenses. (Para más detalle sobre los métodos de asignación, ver capítulo 6).

8.7.3. Identificación de individuos

Los procedimientos en la identificación de individuos son básicamente idénticos a los utilizados en estudios de determinación de parentesco (filiación) en humanos. Los marcadores genéticos utilizados son las secuencias mitocondriales de la región control o D-loop y los microsatélites especie-específicos. Revisiones de estos procedimientos se encuentran publicadas en Evett y Weir (1998) y Fung y Hu (2008). Un ejemplo de estos procedimientos se puede ver en la identificación de una tigresa matada en el Tiger Safari Zoo Park en la India en el año 2000, sólo para obtener sus garras. Unos 4 años más tarde se realizó un análisis de filiación entre las garras del tigre encontradas en posesión de

un sospechoso y los padres y hermanos del animal matado, habitante del mismo zoológico. Los análisis dieron una identificación positiva del parentesco esperado entre el material secuestrado al sospechoso y los tigres del zoológico (Gupta et al., 2011).

8.8. Casuística forense de vida silvestre

8.8.1. Caza ilegal de rinocerontes en África

La expansión económica en Asia determinó un mayor poder adquisitivo de sus habitantes. Desafortunadamente este hecho afectó en forma dramática la situación de supervivencia de muchas especies utilizadas en medicina tradicional y consumo humano. Los cuernos de rinoceronte tienen un enorme valor económico en la medicina tradicional del sudeste asiático y China por sus supuestas propiedades afrodisíacas: 1 kg de cuerno alcanza valores de USD 30.000 en el mercado ilegal. El rinoceronte de Java se extinguió en Vietnam en el año 2011. De esta especie sólo quedan unas pocas decenas de animales en Java e Indonesia. Al disminuir las poblaciones asiáticas, la atención se desvió hacia África, con la consecuente dilapidación de las poblaciones naturales en ese continente. CITES prohibió el comercio de rinocerontes africanos y sus productos en 1977. Sudáfrica está habitada por 2 especies de rinoceronte, el negro (*Diceros bicornis*) y el blanco (*Ceratotherium simum*) (Figura 8.2). La población de rinocerontes blancos fue reducida a unos 40 individuos a principios del siglo XX y actualmente los aproximadamente 20.000 animales que se encuentran en reservas nacionales y privadas de Sudáfrica descienden de esta población remanente. El 90% de los rinocerontes blancos y el 40% (de un total de 5.000 individuos) de los negros se encuentran en Sudáfrica

. La caza ilegal es llevada a cabo por sindicatos internacionales organizados, que cuentan con una importante logística para la localización de las presas, el transporte y el armamento.



Figura 8.2: Hembra de rinoceronte blanco con su cuerno cortado como medida preventiva de caza ilegal en el Parque Nacional Kruger. Foto cortesía Carla D'Amato.

Sudáfrica presenta el 85% de los 25.000 rinocerontes en estado silvestre en el planeta. En Sudáfrica, la depredación se realiza tanto en parques nacionales como en tierras privadas, pero la peor parte es sufrida por el Parque Nacional Kruger. Este Parque forma parte del Great Limpopo Transfrontier Park – conjuntamente con el Gonarezhou National Park en Zimbabwe y el Limpopo National Park en Mozambique – que en forma conjunta alcanzan una extensión de 35.000 km². El parque Kruger tiene una extensión de casi 20 millones de hectáreas (19.485 km²), una superficie equivalente al tamaño de Israel, Gales o la provincia de Tucumán. Esta extensión es de muy difícil monitoreo, por lo que está fácilmente expuesto al crimen organizado ingresante desde países limítrofes (ver 3). La estrategia adoptada por parques nacionales y propietarios de reservas privadas es el corte de cuernos de los animales para evitar que sean asesinados. Esta práctica no siempre es exitosa, ya que la caza continúa aún con el propósito de extraer la base

remanente de los cuernos removidos. La última estrategia adoptada por el Parque Nacional Kruger es la utilización de drones para monitoreo y locación de cazadores ilegales. La estadística de caza ilegal estimada por el Departamento de Asuntos Ambientales de Sudáfrica se muestra en la Figura 8.3. Los valores del año 2013 fueron recolectados en septiembre. Aproximadamente un 60% de esta depredación tiene lugar en el Parque Nacional Kruger.

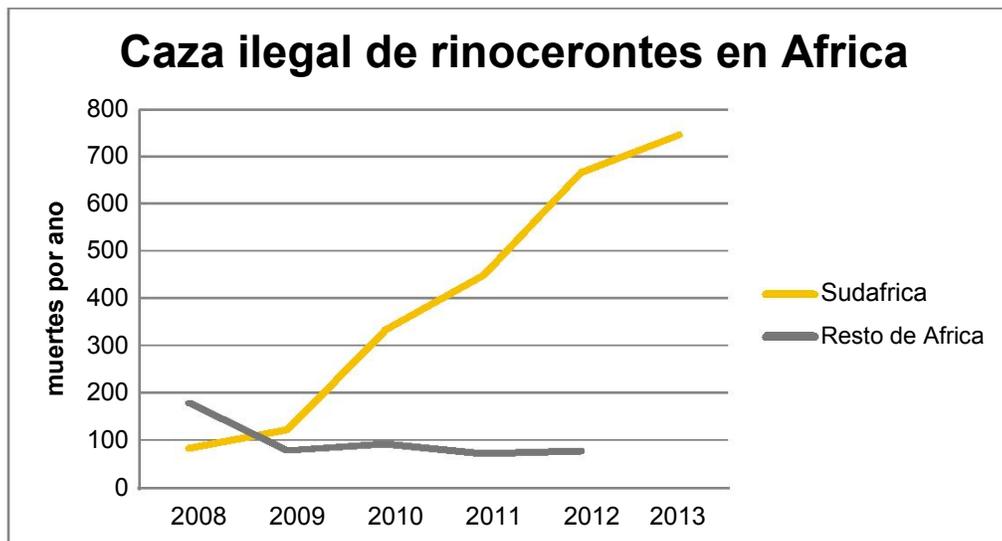


Figura 8.3: Numero de rinocerontes cazados anualmente en Sudáfrica y África debido al comercio ilegal de cuernos. Los valores continentales para 2013 corresponden al mes de febrero.

La Universidad de Pretoria desarrolló un sistema de identificación de individuos patentado como Rhodis®, Rhino DNA Index System. El proyecto Rhodis® tiene como objetivo la generación de una base de datos de perfiles de individuos en todas las reservas nacionales, provinciales y privadas; permite la trazabilidad de cuernos confiscados de manos de traficantes y se los puede adjudicar a individuos (cadáveres) específicos.

El sistema consiste de 22 loci de microsatélites y un sistema de sexado (Harper et al., 2013) y permite distinguir las dos especies. Aplicando una corrección por endocría de $\Theta = 0,3$ la probabilidad de

coincidencia aleatoria (RMP, *random match probability*) para el rinoceronte blanco es $1,7 \times 10^{-5} - 6 \times 10^{-6}$. Los valores exceden el número existente de individuos de esta especie. Esta base de datos cuenta actualmente con unos 3.500 perfiles individuales de ambas especies.

El Laboratorio de Genética Veterinaria de la Universidad de Pretoria y el Servicio de Policía de Sudáfrica desarrollaron en forma conjunta un kit para la recolección de material biológico de rinocerontes para estandarizar el muestreo y asegurar la cadena de custodia en casos forenses. Hacia fines de 2012, el sistema de identificación genética permitió el arresto de unos 400 cazadores ilegales y el encarcelamiento de 25⁽⁴⁾.

8.8.2. Caza ilegal de elefantes en África

El elefante africano *Loxodonta africana* fue cazado en forma intensiva debido al precio del marfil. En 1989 CITES promueve la veda total de la explotación de elefantes africanos y el tráfico de marfil: el elefante africano es enlistado en el Apéndice I de CITES. Sin embargo, los países de África del sur Namibia, Botswana, Zimbabwe y Sudáfrica transfirieron a esta especie al Apéndice II entre 1997-2000. Actualmente, las regiones más afectadas por la caza ilegal de elefantes son África central y occidental (recopilado en UNEP, CITES, IUCN, TRAFFIC, 2013). En 1997 CITES establece MIKE (*Monitoring the Illegal Killing of Elephants*) y TRAFFIC establece el programa ETIS (*Elephant Trade Information System Database*) como programas de recolección de información de caza ilegal de elefantes y el estudio de la ruta de contrabando y recolección de datos de confiscaciones. La ruta de tráfico ilegal y contrabando involucra más frecuentemente a países del sudeste asiático y China (CITES report SC61). Se estima que las matanzas en todo el continente en 2012 y 2013 alcanzaron los 25.000 y 22.000 ejemplares, respectivamente (CITES, IUCN, TRAFFIC, 2013).

El número remanente de animales de esta especie en estado salvaje es de aproximadamente 470.000 en todo el continente (Blanc et al., 2007). Recientemente se reconoció el estatus de especies diferentes, de modo tal que las dos formas conocidas, el elefante de bosque y el de sabana, sean especies diferentes, *Loxodonta africana cyclotis* y *Loxodonta africana africana* (Figura 4), actualmente *L. africana* y *L. cyclotis*, respectivamente (Rohland et al., 2010). Ambas son consideradas “vulnerables” por la IUCN.



Figura 8.4. *Loxodonta africana africana*. Kruger National Park.
Foto cortesía Malena D’Amato

Wasser et al. (2004) realizaron un estudio genético para evaluar la distribución geográfica de la variabilidad genética en elefantes africanos y así poder predecir el origen geográfico a partir de muestras de colmillos y marfil de origen desconocido. Partiendo de muestras de tejidos y escatológicas colectadas en 28 localidades, realizaron una tarea de genotipado con 16 microsatélites especie-específicos. Estos

autores desarrollaron un método de emparejado espacial de frecuencias alélicas (*spatial-smoothing based estimates of allele frequencies*) que permite la asignación de muestras de origen desconocido a regiones geográficas de las que no hay material de referencia. Este método, denominado de asignación continuo (CAM, *continuous assignment method*), es más efectivo que los métodos tradicionales de asignación como el de Paetkau et al. (1995). Estos autores utilizaron sus métodos de asignación para analizar muestras confiscadas de contrabando de marfil. Uno de estos episodios fue la confiscación de 6,5 toneladas de marfil ocurrida en Singapur en 2002. El análisis de las muestras indicó que los colmillos provenían del elefante de sabana, de una región geográfica del sur de África circunscripta a Zambia, cercano a Malawi, lugar desde donde partió la carga marítima a oriente (Wesser et al., 2007). Un estudio subsiguiente realizado sobre una confiscación de la cadena de tráfico Camerún-Hong-Kong asignó el material estudiado al elefante de bosque, con origen geográfico en el sur de Gabón (Wesser et al., 2008). El material confiscado de ambas cadenas mostró una asignación geográfica similar, evidenciando así una organización internacional del comercio ilícito mediante múltiples puntos de embarque para material proveniente de una zona de explotación. Estos estudios permitieron evidenciar países y zonas de explotación intensiva donde se reforzaron los esfuerzos en contra de la cacería ilegal. Los estudios de ADN del material confiscado permitieron de esta manera incrementar la información sobre las rutas de cacería y contrabando del marfil en África.

8.8.3. Pesca ilegal de abalon en Sudáfrica

El abalon *Haliotis midae* o perlemoen (Figura 8.5) es un gastrópodo intermareal de la familia Haliotidae, endémico de Sudáfrica; es el haliótido de mayor porte presente en el territorio Sudafricano. Esta especie es blanco de pesca ilegal debido al elevado precio que alcanza en el mercado asiático: unos U\$S 300 por kilogramo de carne sin valva.

La explotación ilegal del abalon se encuentra íntimamente ligada a factores socioeconómicos en Sudáfrica, y la ruta internacional del comercio ilícito de esta especie está coordinada con el tráfico de sustancias abusivas ilegales desde China mediante la actuación de organizaciones criminales internacionales (Steinberg, 2005).

H. midae es una especie de crecimiento lento, alcanzando la madurez sexual a la edad de 8-9 años y un tamaño de 20 cm a la edad de 30 años. En el año 2010 el gobierno sudafricano tomó la controvertida decisión de retirar a esta especie del Apéndice III de CITES.

Los pescadores ilegales devalvan los abalones y cuando son interrogados por autoridades o patrullajes costeros aseguran haber pescado otra especie intermareal de menor tamaño, el siffie *Haliotis spadicea*. El tamaño legal de pesca del abalon es 114 mm, limitado a unos pocos individuos por buzo mediante la obtención de un permiso específico.

Sweijd et al. (1998) diseñaron un ensayo para distinguir a estas dos especies mediante el análisis de la secuencia de ADN del gel “sperm lysin”, que presenta un alto grado de conservación intra-específico (Vacquier et al., 1990). El test consiste en una amplificación por PCR de un fragmento de 130 pb de este gen, seguido de RFLP o bien secuenciación por método de Sanger. Una transición determina la ausencia de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Hha* III en el siffie (GCAC) mientras que la secuencia GCGC del abalon es reconocida y clivada. Los productos de PCR son resueltos en geles de agarosa. Este test se realiza desde el año 2002 en la Universidad de Stellenbosch (Roodt-Wilding y Bester, 2006) donde regularmente se analiza el material biológico confiscado, hisopados de instrumentos y material utilizado en la recolección de abalon como guantes y cuchillos. *H. midae* es detectado en una cifra superior al 75% de los casos así estudiados (Bester, comunicación personal).



Figura 8.5: Ejemplares juveniles de *Haliotis midae*. Fotografía cortesía de A. Bester, Universidad de Stellenbosch.

8.8.4. Tráfico ilegal de chitas en el sur del continente africano

El chita (*Acinonyx jubatus*) tenía una amplia distribución geográfica en los continentes africano y asiático. Actualmente, es considerada una especie vulnerable por IUCN y está incluida en el Apéndice I de CITES. La mayor población africana se encuentra en Namibia, con aproximadamente 2.500 animales. El tráfico de esta especie está limitado a un número anual de 5 animales vivos o como trofeos de caza para Botswana, 150 para Namibia y 50 para Zimbabwe. En Sudáfrica, el chita está presente en la lista de especies que necesitan protección en el *National Environmental Management: Biodiversity Act, 2004* (Acta N° 10 de 2004). La posesión o transporte de especies protegidas necesita de un permiso emitido por autoridades nacionales y provinciales.

En 2008, un estudio realizado por la *Universidad del Free State* (Kotze *et al.*, 2008) detectó el origen extra nacional de unos 6 chitas encontrados en una estancia lindera con Botswana. Esta es una zona afectada por el tráfico de vida silvestre. Los dueños de la estancia no poseían los permisos necesarios y las autoridades de control delegaron

el estudio del origen de estos animales. Como referencia se utilizó ADN de un total de 57 animales provenientes de Botswana, Namibia y Sudáfrica. Analizaron el polimorfismo de 13 microsatélites aislados en gato doméstico y los 11 loci que no mostraron desvíos de HWE se utilizaron en el análisis de asignación. Estos autores aplicaron tres métodos: un método basado en frecuencias génicas, un método bayesiano parcial y un método bayesiano completo. El método basado en frecuencias génicas de Paetkau (1995) asignó 5 de los 6 animales a Namibia y uno no pudo ser asignado a ningún grupo. La utilización del test de exclusión de Rannala y Mountain (1997) en combinación con el método bayesiano parcial de Cornuet et al. (1999) asignó 4 animales a Namibia, mientras que 2 animales no pudieron ser asignados. Estos dos procedimientos se encuentran implementados en el programa GENECLASS 2 (Piry et al. 2004). El programa STRUCTURE se utilizó en forma relajada, admitiendo mezcla [admixture] y correlación en la frecuencia de alelos. Este procedimiento es más realista que los parámetros utilizados por Manel et al. (2002). Los 3 grupos (clusters) identificados en este análisis mostraron una diferente proporción de distribución de los especímenes de referencia entre ellos y una mayor similitud de 2 de los animales en estudio con especímenes de Namibia, tres con el grupo representado mayoritariamente por animales sudafricanos y uno con el grupo representado mayoritariamente por los animales de referencia de Botswana. Estos resultados indican que la hipótesis del origen de Botswana de los seis chitas debe descartarse. Históricamente muchas de las poblaciones de chitas de Sudáfrica provienen de translocaciones realizadas desde Namibia.

8.9. Identificación de especies en productos comestibles de origen animal en Sudáfrica

En los países de Sudáfrica, es muy popular el consumo de carne seca con especias, un tipo de charqui llamado localmente *biltong* (Figura 8.6) y salchichas secas (*droë wors*). Estos productos son manufacturados

por productores locales a pequeña escala o bien a gran escala, y cuentan con marcas comerciales. Si bien se manufacturan con carne de vaca, los productos más populares provienen de carne de antílopes locales, cazados a tal propósito o explotados como ganadería, o de carne de avestruz, única especie nativa que se cría en forma intensiva.



Figura 8.6: Canasta abierta de *biltong* en un negocio especializado en este producto.

Un estudio reciente (D'Amato et al. 2013) evaluó la identidad y veracidad de la etiquetas comerciales de unas 146 muestras de carne procesada como *biltong*, salchichas secas, carpaccio, carne fresca y ahumada en el mercado de Sudáfrica. Las muestras fueron analizadas mediante secuenciación de productos de PCR utilizando primers para *cyt b* y *COI*. El análisis de identificación de especies se realizó de manera exhaustiva mediante diferentes métodos como BLAST en Genbank, análisis filogenético, análisis de asignación por caracteres diagnósticos y análisis de distancia genética intra- e inter-específica. Quedaron así evidenciados los problemas y las ventajas de estos métodos en la investigación de identificación de especies, y los riesgos de basar las conclusiones de asignación a un solo método.

El resultado de esta investigación (Figura 8.7) demostró que el 69,2% de los productos contenía material distinto al de la etiqueta comercial, de los cuales 42% correspondía a *Bos taurus*, mientras que una proporción

similar pertenecía a otra especie salvaje. Entre ellas se detectó la cebra de montaña *Equus zebra zebra* (Figura 8.8), catalogada en el Apéndice II de CITES. En menor proporción se detectaron las especies domésticas *Ovis aries*, *Equus caballus* y *Sus scrofa* y 3 especies de canguro.

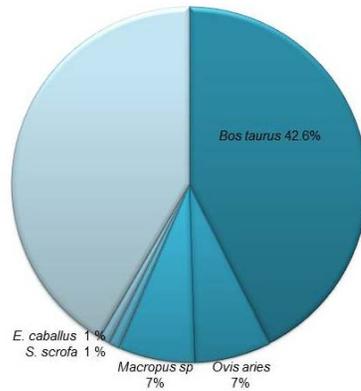


Figura 8.7: Proporción de la contribución específica a los productos de carne “salvaje” substituidos en el mercado sudafricano.



Figura 8.8: Cebra de montaña *Equus zebra zebra*, encontrada en *biltong*.

8.10. Aplicación de pirosecuenciación en la identificación de especies a partir de material biológico altamente procesado

Las nuevas tecnologías genómicas basadas en pirosecuenciación y producción de una gran cantidad de datos simultáneamente (*High Throughput*) produjeron un enorme impacto no sólo en los estudios genómicos sino también en otras disciplinas, como la genética forense. Estos métodos de secuenciación de próxima generación (NGS) y de segunda generación permiten la identificación de una gran cantidad individual de hebras de ADN originadas a partir de un solo evento de PCR (reseñadas en Glenn, 2011). Este tipo de secuenciación clonal (cada hebra es considerada un “clon”) es posible gracias a plataformas como Illumina MySeq (Illumina), 454 GS Junior (Roche) y Ion Torrent (Life Technologies).

Un trabajo realizado en la Universidad de Perth, Australia, evidenció la composición compleja de productos de medicina tradicional china (Coghlan et al., 2012) compuestos por materiales biológicos altamente procesados, en forma de jarabes, píldoras o pulverizados. Esta situación determina la imposibilidad de aplicar los métodos tradicionales de PCR y secuenciación para la investigación exhaustiva de la composición del producto, salvo que se desee investigar la presencia de ciertas especies con primers de PCR altamente específicos. Para evitar este inconveniente, el grupo de Michael Bunce aplicó primers de PCR universales para blancos de origen vegetal y animal: la región del p-loop del gen plastídico trnL, y el gen 16S rRNA mitocondrial. Los productos de PCR fueron secuenciados y analizados en la plataforma 454-Junior (Roche) (ver Rothberg y Leamon, 2008, para mayor detalle). Se leyeron aproximadamente 49.000 secuencias totales que partieron de 15 muestras de productos de medicina tradicional china detenidas por oficiales aduaneros en el momento de entrada a Australia. El resultado del estudio mostró la presencia de 68 familias de plantas, algunas potencialmente tóxicas como *Ephedra* y *Asarum*; dos especies de animales catalogadas por IUCN como vulnerable y en estado

crítico, respectivamente: el oso negro asiático (*Ursus thibetanus*) y la saiga (*Saiga tatarica*), mientras que el 78% de los productos contenía especies no declaradas.

8.11. Material y lecturas adicionales

John E. Cooper and Margaret E. Cooper (eds.): Wildlife forensic investigation—principles and practice. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2013, ISBN: 978-1-4398-1374-4

Jane E. Huffman, John R. Wallace (eds) : Wildlife Forensics: Methods and Applications. Wiley & Sons Ltd.,2012. New Delhi, India, 2012, ISBN: 978-0-470-66258-8, ISBN: 978-0-470-66259-5.

Adrian Linacre, Shanan Tobe (eds.) Wildlife DNA Analysis: Applications in Forensic Science. Wiley-Blackwell. 2013. ISBN: 978-0-470-66595-4 | ISBN-13: 978-047-0-66596-1

Links

Información sobre estadística de caza ilegal y actividades de protección de rinocerontes

https://www.environment.gov.za/update_on_rhinopoaching

<http://www.bdlive.co.za/national/science/2013/02/08/drones-now-part-of-anti-poaching-arsenal>

<http://www.iol.co.za/scitech/science/environment/drones-to-help-fight-in-anti-poaching-war-1.1526137#.UmlfG1NYWSo>

<http://www.rhodis.co.za/>

Pesca y tráfico ilegal de abalon

Rhodes University , Nota de perspectiva sobre la acción sobre la pesca y tráfico ilegal de abalon en la provincia sudafricana Eastern Cape, 9 de Noviembre de 2012

<http://www.ru.ac.za/perspective/perspectivearticles/name,72437,en.html>

Charla presentada por Vernon Munninck en el evento independiente de Ted^X “Who moved my sushi ? ” el 24 de marzo de 2012 en Cape Town. Vernon Munnick, Guardaparques de Cape Nature en la zona costera protegida de Hermanus, Sud África, comparte su experiencia de trabajo en una zona depredada por la pesca ilegal de abalon.

<http://www.youtube.com/watch?v=cNxa8uJHkGo>

[http://www.capenature.co.za/news.htm?sm\[p1\]\[action\]=content&sm\[p1\]\[cntid\]=2085&sm\[p1\]\[persistent\]=1](http://www.capenature.co.za/news.htm?sm[p1][action]=content&sm[p1][cntid]=2085&sm[p1][persistent]=1)

Links

<http://www.interpol.int/Member-countries/Africa/South-Africa>

<http://sansalvador.usembassy.gov/news/2011/09/26.html>

https://aelert.net/?page_id=1805 <http://www.asean-wen.org/index.php/about-us/what-is-asean-wen>

<http://earthday.worldwildlife.org/about/news-press>

<http://www.traffic.org/> <http://www.havocscope.com/value-of-the-illegal-wildlife-trade/> <http://www.havocscope.com/tag/wildlife-trafficking/>

8.12. Referencias Bibliográficas

Anderson S., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Eperon I.C., Sanger F., Young I.G., (1982) *Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome.* J Mol Biol. Número 156, pp.683–717.

Avise, J.C.; Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., and Saunders, N.C., (1987). *Annual Review of Ecology and Systematics.* Número 18, pp. 489-522.

- Ball, M.C., Finnegan, L.A., Nette, T., Broders, H.G., Wilson, P.J., (2011) *Wildlife forensics: "supervised" assignment testing can complicate the association of suspect cases to source populations*. *Forensic Sci Int Genet*. Jan; Número 5(1), pp. 50-56.
- Banks, M.A., Eichert, W., (2000.) *WHICHRUN (Version 3.2) a computer program for population assignment of individuals based on multilocus genotype data*. *Journal of Heredity*. Número 91, pp. 87-89.
- D'Amato, M.E., Alechine, E., Cloete, K.W., Davison, S., Corach, D., (2013) *Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study*. *Investigative Genetics* Número 4, pp. 6 doi:10.1186/2041-2223-4-6
- Evetts, I.W., Weir, B.S., (1998) *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Fung, W.K., Hu, Y.-Q., (2008) *Statistical DNA Forensics: Theory, Methods and Computation*. Wiley.
- Gupta, S.K., Bhagavatula, J., Thangaraj, K., Singh, L., (2011) *Establishing the identity of the massacred tigress in a case of wildlife crime*. *Forensic Sci Int Genet*. Número 5(1), pp. 74-75
- Harkins, G.W., (2006) *Studies on the population genetics of Euphausiids: a comparison of patterns in pelagic taxa displaying different distributions and life-histories*. PhD Thesis.: University of the Western Cape.
- Harper, C.K., Vermeulen, G.J., Clarke, A.B., de Wet, J.I., Guthrie, A.J., (2013) *Extraction of nuclear DNA from rhinoceros horn and characterization of DNA profiling systems for white (*Ceratotherium simum*) and black (*Diceros bicornis*) rhinoceros*. *Forensic Science International: Genetics*. Número 7, pp. 428–433.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., (2003) *Biological identifications through DNA barcodes*. *Proc Biol Sci*, Número 270, pp. 313–321.
- Kimura, M., (1980) *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. *J Mol Evol*. Número 16, pp. 111–120.

- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., (1985a) *Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA*. Nature. Número 314(6006), pp. 67-73.
- Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F., Semeonoff, R., (1985b) *Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints*. Nature. Número 317(6040), pp. 818-819.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., (1989) *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. Proc Natl Acad Sci U S A. Número 86(16), pp. 6196-200.
- Linacre, A.M., Tobe, S.S., (2011) *An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science*. Investigative Genet. Número 2, pp. 2
- Lindsey, P., Balme, G., Becker, M., Begg, C., Bento, C., Bocchino, C., Dickman, A., Diggle, R., Eves, H., Henschel, P., Lewis, D., Marnewick, K., Mattheus, J., McNutt, J.W., McRobb, R., Midlane, N., Milanzi, J., Morley, R., Murphree, M., Nyoni, P., Opyene, V., Phadima, J., Purchase, N., Rentsch, D., Roche, C., Shaw, J., van der Westhuizen, H., Van Vliet, N., Zisadza, P.(2012) *Illegal hunting and the bush-meat trade in savanna Africa: drivers, impacts and solutions to address the problem*. Panthera / Zoological Society of London. Wildlife Conservation Society report, New York. 74 pages. Disponible en www.traffic.org
- Manel, S., Berthier, P., Luikart, G., (2002) *Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes*. Conserv.Biol. Número 16 (2002), pp. 650–659.
- Mardis, E.R., (2013) *Next-Generation Sequencing Platforms*. Annual Review of Analytical Chemistry. Número 6, pp. 287-303.
- Moritz, C. (1994). *Defining "evolutionary significant units" for conservation*. Trends in Ecology and Evolution. Número 9 (10), pp. 373– 375.

- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C., (1995) *Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears*. Mol Ecol. Número 4, pp. 347–354.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., (2004) *GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection*. Journal of Heredity Número 95, pp. 536-539.
- Post-Note 124 (2005) 236. The Parliamentary Office of Science and Technology. The Bushmeat Trade. www.parliament.uk/post/home.htm
- Rannala, B., and Mountain, J. L., (1997) *Detecting immigration by using multilocus genotypes*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Número 94, pp. 9197-9201.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., (2007) *BOLD: the barcode of life data system*. Mol Ecol Notes. Número 7, pp. 355–364.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science. Número 230 (4732), pp. 1350-1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Número 74 (12), pp. 5463–5467
- Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisse, M., Laudet, V., Hänni, C., (2008) *Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples*. J Appl Ecol, Número 45, pp. 967–975.
- Tobe, S.S., Kitchener, A.C., Linacre, A.M., (2010) *Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome B and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes*. PLoS One. Número 5(11), e14156.
- Yang, Z., Rannala, B., (2012) *Molecular phylogenetics: principles and practice*. Nature Reviews Genetics. Número 13, pp. 303-314.

WWF / Dalberg. (2012) *Fighting illicit wildlife trafficking: A consultation with governments*. WWF International, Gland, Switzerland.

Notas

(1) Publicó la hipótesis del origen africano de la humanidad, conocida como la hipótesis de la Eva africana en Science en 1987.

(2) En inglés billones = mil millones, pero para los idiomas latinos billón = millón de millón.

(3) Profesor Victor Crisci, comunicado a una clase de Introducción a la Taxonomía Numérica en 1985.

(4) **Rhino DNA technology helps fight against poaching**, noticia publicada por SABC news (South African Broadcasting Corporation) el 7 de septiembre de 2013. <http://www.sabc.co.za/news/a/bfe8ea80410281fc86f0a7434f2981a1/Rhino-DNA-technology-helps-fight-against-poaching-20130709>