

CONVENCIÓN SOBRE EL COMERCIO INTERNACIONAL DE ESPECIES
AMENAZADAS DE FAUNA Y FLORA SILVESTRES



Decimoséptima reunión del Comité de Flora
Ginebra (Suiza), 15-19 de abril de 2008

Cuestiones relativas a la identificación

DESARROLLO DE TÉCNICAS GENÉTICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN FORENSE
DE LA MADERA Y LOS PRODUCTOS DE MADERA DE *GONYSTYLUS* (RAMIN)

1. Este documento ha sido presentado por la Autoridad Científica del Reino Unido.
2. Introducción
 - a) El comercio de *Gonystylus* spp. se caracteriza por el movimiento de una gran variedad de partes y productos a través de las fronteras internacionales. Se ha comprobado que la identificación de esas partes y productos constituye un desafío para los organismos de observancia de la CITES en los países de importación y exportación.
 - b) La inclusión del género *Gonystylus* spp. ha facilitado la identificación del material comercializado utilizando las técnicas tradicionales de anatomía de la madera, con la dificultad de distinguir fiablemente las especies individuales. Los especialistas en anatomía de la madera pueden realizar rápida y fiablemente la identificación anatómica de muestras. El desarrollo en fecha reciente de la clave morfológica dirigida por ordenador *CITESwoodID* (Richter, Gembruch y Koch, 2005), combinado con un curso de formación de dos días de duración, ha mejorado considerablemente las posibilidades de los oficiales de observancia para proceder al análisis de riesgos y la identificación inicial de muchas especies de madera objeto de comercio. Para completar estos recursos, se necesita cada vez más un método de identificación categórica rápido y de alto rendimiento para el ramín que pueda utilizarse como un instrumento de laboratorio normalizado, fácilmente transferible entre los países y capaz de proporcionar pruebas forenses a los tribunales. A fin de examinar esas opciones, la Autoridad Administrativa del Reino Unido, el Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (Defra) financió un proyecto piloto para explorar el uso de técnicas genéticas en la identificación de maderas incluidas en los Apéndices de la CITES. El proyecto fue realizado por el *Wildlife DNA Services* y el Real Jardín Botánico de Kew, (la Autoridad Científica CITES del Reino Unido para la flora).
3. Objetivos
 - a) El objetivo de este proyecto era producir un método validado para la identificación genético forense de la madera y los productos de madera de ramín (*Gonystylus* spp.), para su uso por los organismos de observancia (Aduanas / inspección fronteriza) y los comerciantes. El proyecto se diseñó como un estudio piloto para proporcionar una prueba conceptual para el desarrollo de un ensayo aplicado. En consecuencia, tenía un alcance taxonómico limitado, centrándose en un solo género, pero incluyendo todas las fases en la producción de un ensayo, desde la recogida de muestras y la extracción de ADN hasta la selección del marcador, el diseño del ensayo y la validación. Cabe reseñar que la investigación estaba impulsada por las necesidades de los

usuarios finales, en este caso, el Departamento de Aduanas e Impuestos Especiales de su Majestad (Reino Unido). Este enfoque significaba que los criterios que regían la aplicación práctica del ensayo se especificaban desde el inicio, inclusive las consideraciones sobre la posibilidad de transferir el ensayo, el costo por muestra, la capacidad de muestras, la rapidez del ensayo y la solidez de la técnica para proporcionar pruebas fiables para entablar acciones legales.

- b) En el Anexo de este documento se presentan los métodos y los resultados, únicamente en inglés y español.

4. Conclusiones

La investigación puso de relieve que las muestras de madera y de productos de madera pueden identificarse rápida y económicamente utilizando las técnicas actuales de análisis genéticos disponibles. El desarrollo de esas técnicas es relativamente directo y con la creciente disponibilidad de datos genéticos para muchas especies arbóreas, debería ser posible repetir este tipo de prueba para una mayor proporción de maderas comercializadas. Los métodos analíticos se transfieren fácilmente entre laboratorios y producen resultados que son suficientemente sólidos para poder ser utilizados como prueba legal.

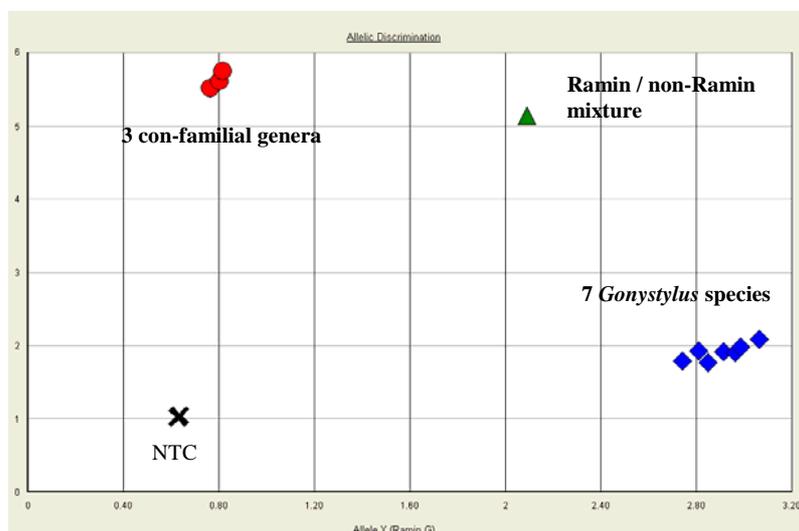


Figura 1: Resultados del ensayo TaqMan mostrando una diferenciación entre las siete especies de ramín (*Gonystylus*) y las tres especies más estrechamente relacionadas. El triángulo representa un control de la mezcla del ADN 1:1, las cruces (abajo a la izquierda) son controles negativos.

5. Aplicaciones prácticas

En la práctica, el proceso de prueba consta de tres fases: la recogida de muestras, la extracción de ADN y el análisis genético. La recogida de muestras se efectúa en el lugar de la inspección y puede ser realizado por un investigador con un mínimo de formación y equipo. Las muestras se transfieren luego a un laboratorio. El ADN se extrae de la muestra utilizando un método que se ha optimizado durante el proyecto para varios tipos de productos de madera. El análisis genético subsiguiente se efectúa mediante una técnica industrial normalizada y ofrece una identificación rápida y inequívoca del ADN del ramín. La fase completa en el laboratorio lleva unas seis horas en total con capacidad para procesar 96 muestras simultáneamente (con algunos instrumentos hasta 384 muestras).

6. Requisitos en materia de recursos

Recogida de muestras: Equipo básico para extraer ~ 1cm³ de material, p.ej. navaja o sierra.
Capacitación de un oficial de observancia (1-2 horas)

Análisis de laboratorio: Juegos y reactivos comercialmente disponibles de extracción de ADN
Sistema de análisis genético de PCR en tiempo real
Protocolo disponible libremente (SOP) para realizar el análisis

Instalaciones: Para la labor de supervisión, la prueba puede realizarse en cualquier laboratorio con el equipo necesario (>50 en el Reino Unido). Para la investigación forense, las instalaciones disponibles se limitan a laboratorios de pruebas de calidad garantizada(>5 en el Reino Unido). Existen instalaciones semejantes en todo el mundo.

Costos estimados: *N.B. los costos están sujetos a fuertes economías de escala*

Establecer costos de un labo para comprar un ensayo (1500 pruebas)	GBP 500.00
Costos de reactivos por muestra (p.ej. tiempo del personal/transparencias)	GBP 3.00
Precio realista de supervisión para la agencia de control	GBP 20.00
Precio realista del análisis forense para la observancia	GBP 50.00

7. Referencias

Richter H.G., Gembruch K, & Koch G. (2005). Software program: *CITESwoodID* version 1.0, *BFH German Federal Agency for Nature Conservation*. Available on CD-ROM.

Weising, K. & Gardener R.C. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genome of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42, 9-19.

8. Reconocimientos

Los colaboradores en el proyecto desean dar las gracias a las siguientes personas por su asistencia: Lillian Chua (*Forest Research Institute Malaysia*); Oliver Gailing (*Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding*, Universidad de Göttingen, Alemania). La labor se llevó a cabo gracias al concurso financiero del Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales (Defra) – Autoridad Administrativa CITES del Reino Unido.

9. Para mayor información

Para mayor información sobre la aplicación de la prueba, sírvase contactar con:

Dr Rob Ogden, Wildlife DNA Services

Telephone: +44 1506 424290

Fax: +44 1506 424280

Email: rob-ogden@wdnas.com

10. En Anexo a este documento se presenta información detallada sobre el desarrollo y el rendimiento del test, que se publicará en una próxima edición del diario "Endangered Species Research".

MÉTODOS Y RESULTADOS DEL PROYECTO

Métodos

Recogida de muestras

1. Se obtuvieron muestras de referencia autenticadas a partir del material amablemente cedido por el Instituto de Investigación Forestal de Malasia (FRIM) y de la colección mantenida en el Real Jardín Botánico de Kew. Las muestras de referencia se dividieron en tres categorías: *Gonystylus* (siete especies concretas, inclusive las más comercializadas); especies genéticamente conexas (representativas de los tres géneros confamiliares de *Gonystylus*); y especies anatómicamente similares (ejemplos de 17 especies que podía ocasionar confusión en la identificación del ramín). Además, se obtuvo una serie de muestras tipos, incluso material de hojas secas, madera no procesada y una variedad de productos trabajados como clavijas, persianas y mangos de utensilios.

Extracción del ADN

2. Se probaron dos juegos comerciales de extracción de ADN para material vegetal: *Tepnel Nucleon Phytopure*, basado en un método de precipitación salina y *Tepnel GMO BioKit*, basado en la captura de partículas magnéticas de ADN. Se utilizaron ambos juegos siguiendo los protocolos de los fabricantes. La calidad del ADN recuperado de las hojas y de la madera procesada se evaluó utilizando la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se esperaba que el ADN de la madera procesada fuese de calidad inferior (rendimiento reducido y fragmentado) en comparación con el material de las hojas frescas. La magnitud de la fragmentación se evaluó mediante la amplificación de la PCR de dos secuencias de longitud diferentes de los productos (200 y 800 bp) del plasto génico *matK*.

Selección del marcador genético

3. Se han preseleccionado cinco regiones génicas encontradas en el plasto de ADN para proceder a su investigación como posibles marcadores discriminatorios para su utilización como código de barras universal del ADN para las plantas: *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, *accD* y *YCF5*. Se produjeron secuencias de ADN para cada región para las muestras de especies *Gonystylus* y las tres especies genéticamente conexas.
4. Se alinearon las secuencias para permitir la identificación de cada una de las posiciones de los nucleótidos que varían entre las especies. Esas posiciones dentro de las secuencias, conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), se evaluaban ulteriormente para seleccionar los SNP que muestran el mismo tipo de ADN en todas las especies de ramín, pero tipos de ADN diferentes en las especies distintas al ramín. Del diagnóstico resultante del SNP se elige un marcador genético único para su uso en la fase de diseño del ensayo.

Desarrollo del ensayo

5. La base del ensayo es un método de identificación del ADN conocido como TaqMan, que permite detectar la variación genética en el SNP elegido utilizando sondas de colores diferentes. Las sondas se leen ulteriormente en una máquina que permite identificar a la muestra de la prueba como perteneciente al ramín o a una especie distinta del ramín.

Validación

6. Se investigó el ensayo final TaqMan para examinar su actuación con diferentes tipos de muestras, diferentes especies y diferentes concentraciones de ADN. Además de la validación del propio ensayo, se desarrollo con control interno junto a la sonda para demostrar la presencia del ADN en muestras que no arrojan resultados con la sonda TaqMan. Esto puede ocurrir con muestras que son genéticamente muy diferentes del ramín. El control interno consiste en un segundo marcador

genético, un locus microsatélite plasto (CCPR2) (Weising, & Gardener, 1999), que dará un resultado normalizado para casi todas las especies de árboles para poner de relieve que la prueba funciona correctamente.

Resultados del ensayo

7. Se logró recuperar el ADN y amplificar el PCR con éxito para el material vegetal fresco y los especímenes de madera trabajada de ramín. En todos los casos se amplificó el pequeño fragmento de ADN; el fragmento más grande se amplificó solamente en el material de hoja fresca, como se había previsto. La técnica de extracción del ADN que ha dado los mejores resultados fue el juego *Teqnel Phytopure*, basándose en la recuperación del ADN y el costo.
8. La evaluación de las secuencias del ADN producidas para cada una de las cinco regiones genéticas candidatas indicaron que el marcador *matK* era el más adecuado para distinguir entre las muestras de ramín y de otras especies. La región *matK* contenía tres posiciones separadas de SNP que podía discriminar los dos grupos.
9. El ensayo SNP actuó como se había previsto, discriminando correctamente el ramín de las muestras de otras especies distintas del ramín. La identificación de muestras fue definitiva en todos los casos, con la formación de distintas agrupaciones para ambos tipos de secuencias (Figura 1).
10. Las pruebas de validación mostraron que el ensayo funcionaba con la ADN recuperado de todos los tipos de muestras probadas, inclusive los productos trabajados. El ensayo no dio resultados positivos falsos para las 20 especies distintas del ramín probados (tres genéticamente similares y 17 morfológicamente similares). El ensayo TaqMan ofrece resultados homogéneos hasta un nivel de 0,01ng/μl de ADN templado.