



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL FI DE GRAU

MÈTODES D'IDENTIFICACIÓ TAXONÒMICA D'ESPÈCIES AMB INTERÈS FORENSE

Joana Aina Darder Garcias

Grau de Biologia

Facultat de Ciències

Any Acadèmic 2019-20

MÈTODES D'IDENTIFICACIÓ TAXONÒMICA D'ESPÈCIES AMB INTERÈS FORENSE

Joana Aina Darder Garcias

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2019-20

Paraules clau del treball:

Identificació taxonòmica, mètodes forenses, *Barcoding*, taxonomia clàssica, *PCR-real time*, microsatèl·lits, SPInDel, TOFMS.

Nom Tutor/Tutora del Treball: Joana Francesca Ferragut Simonet

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índex

1. Abstract.....	6
2. Resum.....	6
3. Introducció.....	6
4. Objectius.....	9
5. Metodologia.....	9
6. Resultats de la recerca.....	10
7. Mètodes d'identificació d'espècies.....	12
7.1 Taxonomia clàssica.....	12
7.2 Codi de Barres.....	14
7.2.1 Procediment general.....	15
7.2.2 Codi de Barres Animal.....	17
7.2.3 Codi de Barres Vegetal.....	18
7.2.4 <i>Metabarding i Mini-barcoding</i>	19
7.3 PCR- <i>real time</i>	20
7.4 Microsatèl·lits.....	21
7.5 SPinDel.....	22
7.6 Espectrometria del Temps de Vol (TOFMS).....	24
8. Discussió.....	25
9. Conclusions.....	28
10. Referències.....	29

1. Abstract

Forensic Genetics is a branch of Genetics that encompasses a set of methods based on genetic variability between organisms with the objective of determining which is the origin of the samples to resolve legal conflicts. In the first moment, samples were related to human cases until a wide range of applications was developed in which the main objective was to recognize the origin of the non-human sample. The paper presents some of the taxonomic identification techniques that Non-Human Forensic Genetics has been able to use. Second, the main advantages and disadvantages of each of the techniques are compared. Classical taxonomic methods, based on morphological characters, are not useful when the samples do not exhibit all the distinctive physical characteristics. Alternatively, the Barcode is proposed as an identification system, microsatellites as genetic markers and PCR-Real Time as a molecular technique. The Bar Code is the system that has been designed to study a fragment shared by all the taxa of large groups but with enough variability to differentiate them. The presence of InDels in the genome has been considered a problem when performing DNA sequencing. With the development of SPinDel, the resulting sequences with interspersed InDels are used to create numerical profiles characteristic of each taxon. If the DNA is completely degraded, molecular techniques cannot be performed. The combination of Flight Time Spectrometry (TOFMS) with GCxGC or DART allows to conclude which species it is using volatile compounds or mass. Whatever technique is used, it is necessary to create a reference database.

2. Resum

La Genètica Forense es tracta d'una branca de la Genètica que engloba un conjunt de mètodes basats en la variabilitat genètica entre organismes amb l'objectiu de determinar quin és l'origen de les mostres per resoldre conflictes legals. En un primer moment les proves provenien de casos relacionats amb els humans fins que es va desenvolupar un ample ventall d'aplicacions on el principal objectiu és reconèixer la procedència de la mostra no-humana. En el treball es presenten algunes de les tècniques d'identificació taxonòmica de les quals la Genètica Forense No-Humana ha pogut fer-ne ús. En segon lloc, es comparen els principals avantatges i inconvenients de cada una de les tècniques. Els mètodes taxonòmics clàssics, basats en caràcters morfològics, no són útils quan les mostres no presenten totes les característiques físiques distintives. Llavors, es proposa com a alternativa el Codi de Barres com a sistema d'identificació, els microsatèl·lits com a marcadors genètics i la PCR-*Real Time* com a tècnica molecular. El Codi de Barres és el sistema que s'ha dissenyat per estudiar un fragment que comparteixen tots els taxons dels grans grups però amb suficient variabilitat com per diferenciar-los. La presència d'InDels en el genoma s'ha considerat un problema a l'hora de realitzar la seqüenciació de l'ADN. Amb el desenvolupament d'SPinDel s'utilitzen les seqüències amb InDels intercalats per crear perfils numèrics característics de cada taxó. Si l'ADN es troba completament degradat, les tècniques moleculars no es poden realitzar. La combinació de l'Espectrometria del Temps de Vol (TOFMS) amb GCxGC o DART permet arribar a concloure de quina espècie es tracta mitjançant la utilització dels composts volàtils o de la massa. Sigui quina sigui la tècnica utilitzada és necessària la creació d'una base de dades de referència.

3. Introducció

Durant el darrer segle, el nombre d'espècies en perill d'extinció o en estat crític ha augmentat principalment a conseqüència de la pèrdua de l'hàbitat i la sobreexplotació d'espècimens per part de l'home. Per resoldre el problema, el comerç d'organismes aguitats ha estat regulat sota una legislació internacional on s'inclou el *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES) (*The CITES species*, 2017). En l'acord internacional es divideixen les espècies

en diferents nivells o apèndixs segons el seu grau de vulnerabilitat: a l'apèndix I s'inclouen els organismes amb més perill d'extinció mentre que en el II i III es troben les menys vulnerables però significants.

Les mesures legals pel control de vida salvatge no són suficients sense proves evidents que permetin la discriminació d'organismes en atemptats contra la vida. Per tant, es veu la necessitat d'un monitoreig adequat que permeti la identificació d'espècies per a la conservació i l'aturada de l'explotació.

La discriminació taxonòmica d'espècies és una de les moltes aplicacions que desenvolupa la Genètica Forense i s'entén com el conjunt de mètodes i tècniques basades en la variabilitat genètica entre organismes amb l'objectiu de determinar quin és l'origen de les mostres que es troben a l'escena del crim per resoldre conflictes legals (Ogden *et al.*, 2009).

Des del primer moment, l'única funció que exercia la Genètica Forense era la resolució de casos relacionats amb la identificació de mostres humanes tot i que les seves aplicacions eren limitades (Arenas *et al.*, 2017). Posteriorment, la necessitat de determinar restes no humanes conegudes com el "testimoni silenciós" a l'escena del crim provocà el desenvolupament de la Genètica Forense No Humana (GFNH). Aquesta categoria inclou diversos escenaris: la causació d'un dany per part d'un animal a una propietat o a un humà, la relació genètica entre organismes o la identitat d'una mostra que està en disputa com per exemple, controls de dopatge en curses de cavalls. Pel que fa a aquest últim hi ha un ampli ventall d'exemples que es consideren proves auxiliars derivades de la disciplina de la botànica, zoologia, microbiologia i anàlisi (Figura 1). Els exemples més comuns en el que participa la Genètica Forense No-Humana són el control de tràfic il·legal d'espècies, detecció de frau en el menjar i seguretat sanitària, detecció de falsificacions d'organismes, entre altres (Amorim, 2019).

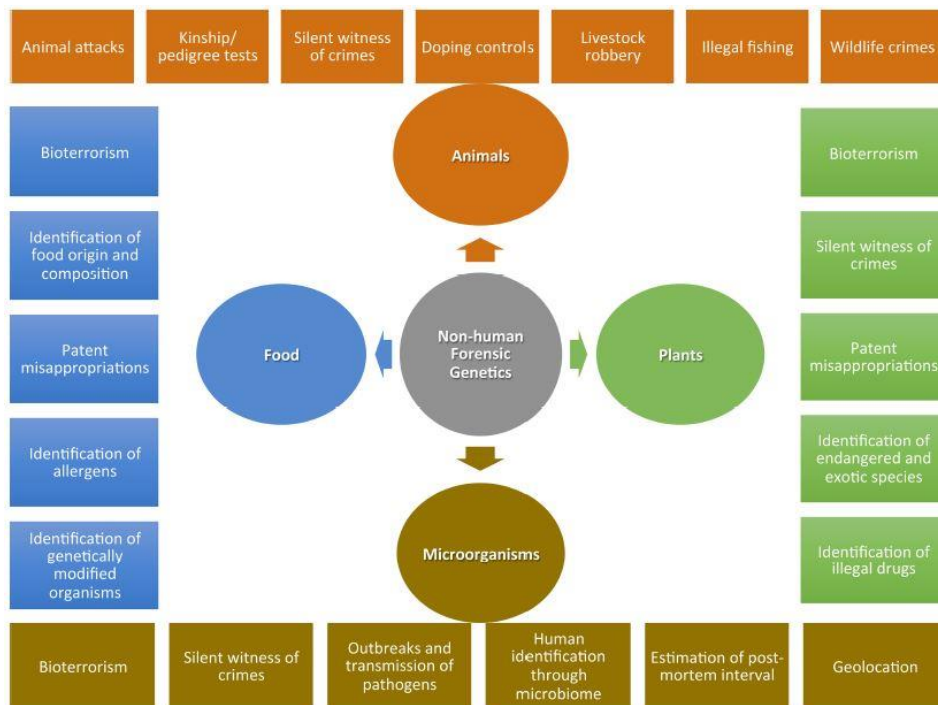


Fig. 1. Principals aplicacions de la Genètica Forense No-Humana en referència al camp de la zoologia, botànica, microbiologia i anàlisi d'aliments (Arenas *et al.*, 2017)

Els taxònoms han usat els caràcters morfològics pel reconeixement d'espècies animals i vegetals des d'abans de l'època de Carl von Linnaeus. Inclús després de cents d'anys de feina, aproximadament només es reconeixen i nombren el 20% de les espècies existents (Kress, 2017).

La identificació taxonòmica és relativament fàcil en organismes domèstics o molt estudiats (Amorim, 2019). En aquest cas, el reconeixement mitjançant caràcters morfològics podria ser útil, no obstant, a vegades, la detecció de diferències entre espècies, especialment en mostres deteriorades o en individus que es troben en fases immadures com ous, pupes o larves, pot ser una tasca molt complicada (Sedghiani *et al.*, 2017).

Les tècniques moleculars basades en l'estudi de la seqüència genòmica per a la identificació de mostres són una bona alternativa als mètodes clàssics. Aquestes tècniques però, es limiten a dissenyar sondes específiques per a cada espècie, exigint un treball laboriós de validació. Gràcies a l'acceptació de l'adopció universal del Codi de Barres (Hebert *et al.*, 2003a) i l'establiment d'una plataforma de codificació de les barres anomenada *Barcode of Life Data System* (BOLD) es va desenvolupar un consens d'identificació d'espècies de tot el món el qual va millorar i simplificar la tasca de reconeixement taxonòmic.

Un *DNA barcode* o codi de barres és un sistema d'identificació el qual usa una seqüència curta de nucleòtids seleccionada especialment del genoma (Waugh, 2007) per una posterior amplificació mitjançant una reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Finalment, l'amplicó prèviament seqüenciat es compara amb una base de dades de referència on es recull tota la informació genòmica dels organismes (Yang *et al.*, 2018). En definitiva es tracta d'un fragment genòmic característic de cada espècie, però amb prou diferències com per poder diferenciar-les.

La *PCR-real time* es tracta d'una tècnica molecular basada en el genoma que s'empra com alternativa al *Barcode* amb l'objectiu de reduir el nombre de passos per al reconeixement d'un taxó. El mètode consisteix en la utilització de fluoròfors per a mesurar la fluorescència mitjançant un sensor. D'aquesta manera es permet quantificar i detectar si l'amplificació PCR s'ha produït a causa de la presència de l'ADN objectiu.

Un dels principals problemes a l'hora de seqüenciar l'ADN és la presència de mutacions d'inserció/deleció anomenats InDels (Santos i Pereira, 2018). L'SPInDel (*Species Identification by Insertions/Deletions*) utilitza aquestes regions per desenvolupar perfils numèrics característics de cada taxó. Dits perfils es creen a partir de les diferents longituds de seqüències resultants de la intercalació d'InDels.

Tot i disposar de tècniques útils per a la GFNH, aquesta no es troba tan desenvolupada com la GFH (Ahmed *et al.*, 2018) a causa de diversos motius (Iyengar, 2014). Es deu primerament a que l'anàlisi forense de vida lliure ha d'afrontar una gran quantitat d'espècies, fet que comporta una manca de marcadors genètics òptims. Seguidament, durant molts d'anys s'han obtingut marcadors i protocols sense una posterior validació necessària pel cas forense. Un altre motiu, gran part de la pràctica i recollida il·legal de recursos naturals es produeix en països pobres on els recursos financers són limitats. Finalment, la delinqüència contra les plantes i fauna salvatge sempre té una prioritat inferior a la participació de la criminalitat humana.

No sempre es poden utilitzar les proves genètiques per arribar a determinar una espècie ja que en ocasions el material genètic es troba en unes condicions nefastes o completament degradat. És útil centrar la investigació en altres mètodes com l'Espectrometria del Temps de Vol

(TOFMS) la qual es combina amb GCxGC amb l'objectiu de detectar els composts orgànics que es desprenen d'un cos o amb DART (*Direct Analysis in Real Time*). Amb la unió de DART-TOFMS s'identifiquen els components de la mostra mitjançant un espectrofotòmetre de masses.

En síntesi, per a que totes les tècniques mencionades siguin proves robustes i fiables és necessari comptar amb una base de dades de referència prou ampla i validada per a facilitar la discriminació. Finalment la combinació dels mètodes assegura amb més fiabilitat la correcta identificació taxonòmica de la mostra.

4. Objectius

Els objectius principals del treball són:

- Conèixer i descriure les tècniques taxonòmiques actuals utilitzades en el camp forense.
- Descriure exemples actuals de cada tècnica en el camp forense.
- Comparar les principals avantatges i limitacions de cada tècnica.
- Explicar com ajuda la combinació de les tècniques taxonòmiques en la identificació de mostres forenses.

5. Metodologia

Per tal d'obtenir informació amb rigor científic, s'ha dut a terme la recerca bibliogràfica amb els cercadors Pubmed, Scopus i Web of Science. En conseqüència, el cercador Google Acadèmic ha quedat descartat des d'un primer moment ja que no ofereix informació contrastada per un comitè científic. Les passes de l'estudi són les mateixes per a cada un dels motors de recerca (Figura 2).

Primerament, s'han escollit les paraules clau per a les tres recerques. La primera decisió fou fer una recerca més general per saber quins eren els mètodes forenses més repetits que apareixien en els articles. Llavors en les dues primeres recerques es va optar per paraules clau amb les que s'obtingués una visió global de les possibles tècniques forenses. Les paraules escollides foren *forensic identification* i *forensic methods*. Degut a que el nombre d'articles trobats en cada recerca no era manejable, es va decidir acotar més cada una de les cerques afegint una nova paraula clau: *species*. En la tercera recerca es varen utilitzar *taxonomic identification* com a paraula clau, on igual que en les altres recerques, el nombre d'articles era molt elevat, i per això, es va afegir les sigles COI (Citocrom Oxidasa I). Es va decidir emprar COI perquè amb les anteriors recerques es va comprovar que la tècnica taxonòmica forense més repetida era el *Barcoding*, i específicament, la utilització del fragment COI per a la discriminació d'espècies animals. A més, en cada una de les recerques s'ha aplicat el filtre dels darrers 10 anys de publicació per obtenir informació sobre les tècniques actuals.

Tots els títols dels articles trobats en cada una de les recerques, s'han ordenat alfabèticament per tal de facilitar la tasca d'eliminació en cas de repetició. Finalment, s'han unificat els títols de les tres cerques per una posterior selecció.

Per tal d'acotar el nombre de fonts emprades s'han seguit els següents criteris de selecció: a) eliminar els capítols de llibre, b) descartar els articles referents a tècniques de la Genètica Forense Humana que no s'usin en la Genètica Forense No-Humana, c) eliminar articles de parla no anglesa i d) suprimir els articles que no tractin sobre tècniques taxonòmiques d'identificació d'espècies com per exemple reportatges de casos criminals d'espècies.

Finalment, els articles restants s'utilitzaran per a la realització del treball. Seguint la metodologia esmentada, s'obté una recerca exhaustiva, sistemàtica i actualitzada de les tècniques d'identificació taxonòmica d'espècies.

En el cas que sigui necessari, s'accedirà a articles que no siguin trobats durant la recerca com són la contrastació de referències citades en els articles trobats i articles originals del desenvolupament d'una tècnica.

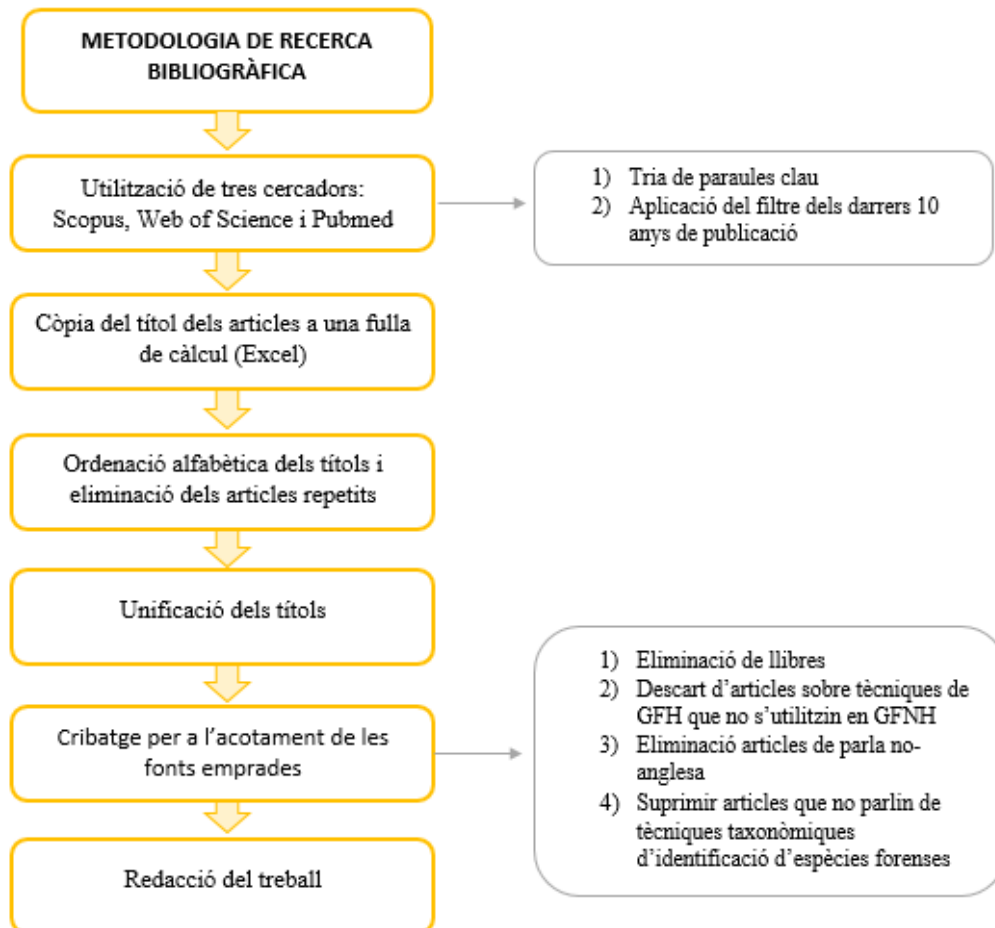


Figura 2. Esquema de la metodologia seguida per a dur a terme la recerca bibliogràfica.

6. Resultats de la recerca

Amb l'objectiu de trobar articles on s'expliquessin les tècniques que s'utilitzen per a la identificació taxonòmica d'espècies s'ha seguit la metodologia explicada en l'apartat anterior. En aquesta secció es comentaran els resultats obtinguts aplicant dita sistemàtica, és a dir, es mencionarà el nombre d'articles obtinguts i eliminats per a cada recerca (Figura 3).

La primera recerca es va realitzar amb les paraules clau *forensic identification* en cada un dels cercadors (Pubmed, Scopus i *Web of Science*). El nombre d'articles obtinguts fou de 11.833, 12.468 i 13.687, respectivament. Al ser un número molt elevat i poc manejable es va decidir afegir la paraula *species* per tal d'acotar els resultats obtenint així: 1.043, 1.914 i 1.417, respectivament.

La segona recerca de caràcter general es va fer amb les paraules *forensic methods* amb la qual es varen obtenir 37.183 articles a Pubmed, 40.287 a Scopus i 21.848 a *Web of Science*. De la

mateixa manera que la recerca anterior, la quantitat d'articles va originar que no es poguessin manejar i per tant, s'afegeix una tercera paraula clau *species* obtenint finalment 1.339, 1.505 i 938, corresponent a cada motor de recerca.

La darrera cerca més específica es va dur a terme amb les paraules *taxonomic identification*. Aquest cop, el nombre d'articles apareguts era molt superior a les dues recerques anteriors (70.744 articles a Pubmed, 19.414 a Scopus i 24.183 a Web os Science), per això de la mateixa manera es va voler reduir el nombre afegint una tercera paraula *COI*. Amb les tres paraules el nombre d'articles va disminuir a 1.043, 1.165 i 1.809.

Per altra banda per a cada una de les recerques, s'aplicà el filtre dels darrers deu anys de publicació per tal d'obtenir informació sobre l'ús de tècniques actuals, i en repercussió el nombre d'articles va tornar a remetre. Llavors, en la primera recerca s'obteniren 685 publicacions a Pubmed, 1.207 a Scopus i 1.036 a Web of Science. En la segona, 931 a Pubmed, 1.073 a Scopus i 1.654 a Web of Science mentre que en la darrera recerca s'obteniren 865, 985 i 707, respectivament.

Tot seguit, es copiaren els títols dels articles en una fulla de càlcul (Excel), tot separant per recerques, per tal d'ordenar-los alfabèticament i eliminar les publicacions repetides. És per aquest motiu que del total de 3.658 articles de la primera recerca, 1.013 foren eliminats per repetició, donant lloc a un total de 2.038 articles. En el cas de la segona recerca, es copien 2.557 títols dels quals 735 es repetien. Aleshores, la dada final de publicacions fora repeticions era de 1.530. Finalment, també es varen eliminar 1.013 títols repetits dels 3.658 copiats de la tercera cerca, de manera que quedaren finalment 1.530 articles.

La següent passa realitzada ha estat la unificació de les tres recerques i per això, s'han agrupat tots els títols dels articles no repetits, per tal de posteriorment tornar-los ordenar alfabèticament i eliminar les còpies. Per tant, d'un total de 5.126 articles entre les tres recerques, 898 es repeteixen donant lloc a un total de 4.177 publicacions en els quals s'ha aplicat un criteri de selecció (explicat a l'apartat de metodologia). Finalment, 297 articles s'utilitzaran de font de partida per a la redacció del treball.

Com a conclusió, es va observar que els articles repetits coincidien majoritàriament als cercadors de Pubmed i Scopus en les cerques de *Forensic species identification* i *Forensic species methods*.

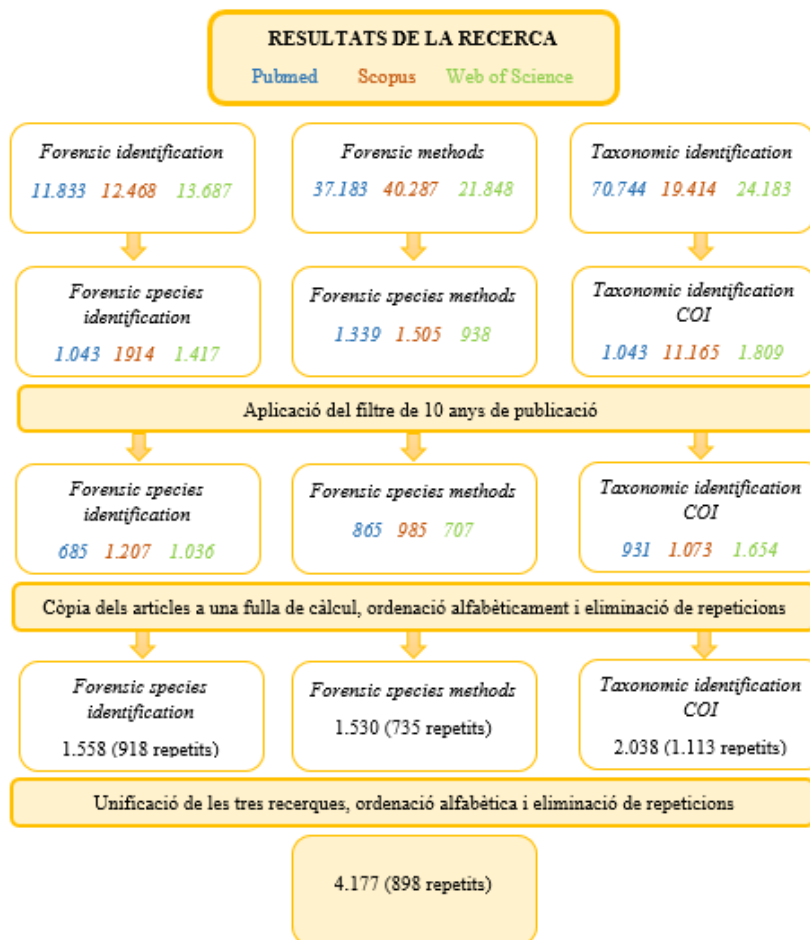


Figura 3. Esquema de l'apartat de resultats de la recerca. S'especifiquen en diferents colors el nombre d'articles trobats en cada cercador (blau, Pubmed; vermell, Scopus; verd, Web of Science).

7. Mètodes d'identificació d'espècies

7.1 Taxonomia clàssica

Les tècniques taxonòmiques clàssiques es basen en la identificació de caràcters morfològics o anatòmics. En aquest apartat es recullen clars exemples del seu ús en el camp de la investigació forense.

Els delictes relacionats amb la vida salvatge presenten com a principal objectiu el guany de diners a partir de la venda d'animals, de plantes o dels productes que deriven d'ells. Aproximadament uns 55 milions d'animals moren cada any per la seva pell i és la Xina el principal país exportador (Garofalo *et al.*, 2018). La identificació de pèls i pell pot ser una tasca molt difícil, sobretot quan estan tractats amb químics, colorants o són peces molt petites, sigui quin sigui el mètode que s'empra (Mariacher *et al.*, 2019)

Una de les tècniques morfològiques encarregades en l'anàlisi del pèl animal per la seva identificació és la tricologia. Es tracta d'un mètode no invasiu i barat que permet la determinació de l'espècie, inclús la raça, de mamífers mitjançant la combinació dels patrons de les escates cuticulars i l'anàlisi de les cèl·lules medul·lars del pèl (Felix *et al.*, 2019). En la Figura 4 s'observen exemples de diferents patrons cuticulars que permeten la diferenciació d'espècies.

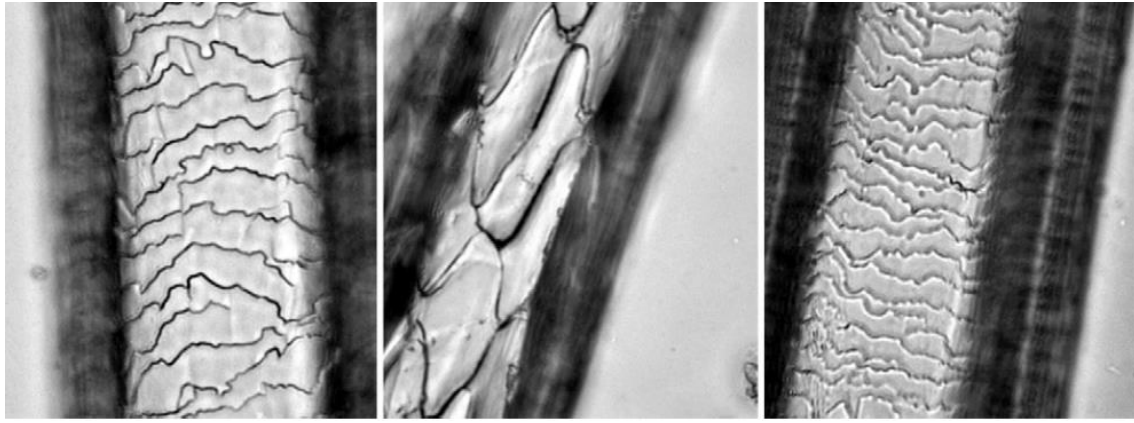


Figura 4. Morfologia de les escates cuticulars del pèl d'espècies animals diferents. La primera imatge pertany a una cabra, la segona a un ca i la darrera a un moix. Escala: 25 μm . (Modificat d' Ahmed *et al.*, 2018)

Per a dur-se a terme, es realitza un primer estudi dels pèls mitjançant la microscòpia òptica per saber l'estat d'aquest. Posteriorment, es produeix la criosecció (tècnica que consisteix en que la mostra és endurida per congelació i es talla amb un micròtom) i tot seguit es fixen en un porta-objectes per ser visualitzats en un microscopi òptic. Totes les mostres seran fotografiades però només les imatges més nítides podran ajudar a identificar quina espècie és (Mandoreba *et al.*, 2019).

En l'estudi de Sarma *et al.*, (2014) es conclou que la tricologia pot arribar a ser de vital importància en el reconeixement d'animals salvatges, és per aquest motiu, que es veu la necessitat de realitzar una base de dades on es recullin els mètodes estadístics per la classificació dels caràcters morfològics, intra e interespecífics, per a la identificació d'una espècie (Kitpipit i Thanakiatkrai, 2013). En el cas contrari, estudis com el de Sato *et al.*, (2010) afirmen que els paràmetres usats (patrons de medul·la i forma de la cutícula) no poden ser utilitzats únicament per a la identificació d'espècies, sinó que es veu la necessitat de combinar-los amb tècniques moleculars. Així mateix, un estudi morfològic bàsic serveix de mètode d'exclusió de mostres per un posterior anàlisis molecular i que, en conseqüència, s'abarateixen els costos (Mariacher *et al.*, 2019).

Un altre ús aplicable a l'estudi dels pèls és la detecció de substàncies tòxiques com arseni i identificar el temps d'exposició (Ahmed *et al.*, 2018).

La presència de cranis de fèlids en la investigació forense de cada cop és més habitual i és per aquest motiu que estudis morfològics qualitius com el de Sims (2012) de cada vegada es realitzen més sovint per explicar les principals diferències significatives a nivell dels canins, perfil nasal i morfologia de la cavitat auditiva (Taula 1).

Taula 1. Principals característiques descriptives de cinc espècies de fèlids (Sims, 2012)

Species	Canines	Nasals	Auditory bullae*
Cheetah (<i>Acinonyx jubatus</i>)	small, hooked backwards, grooves absent or faint	straight to concave	small, compact, both ento and ecto inflated: separation line visible
Jaguar (<i>Panthera onca</i>)	conical, robust, grooves absent or faint	concave	ento large, inflated with anterior extension; ecto not inflated with flattened projections
Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	long, more laterally flattened, grooves prominent often paired	convex	ento large, inflated with minimal anterior projection; ecto similar to jaguar
Puma (<i>Puma concolor</i>)	small, conical, grooves absent or faint	convex	ento large, inflated with minimal anterior projection; ecto not inflated without flattened projections
Snow leopard (<i>Uncia uncia</i>)	long, more laterally flattened, grooves prominent	concave	ento flattened; ecto inflated, separation line visible

El reconeixement de paràsits que presenten probòscide es pot dur a terme mitjançant la distribució i nombre de ganxos que hi tenen presents. Al realitzar la seva fixació, l'òrgan no és reconeix de manera que s'ha dissenyat un mètode de reconstrucció 3-D a partir de fotografies i programes informàtics útil per a la seva identificació (Reier *et al.*, 2019).

Tot i així, el reconeixement d'espècies mitjançant la utilització de caràcters morfològics pot ser una tasca molt complicada degut a que en molts de casos, tot i que taxònoms especialitzats hi participin, les mostres biològiques es troben degradades (Jogayya *et al.*, 2013) o incompletes de manera que l'ús de claus diatòmiques resulta inútil (Arenas *et al.*, 2017).

A l'article de Hebert *et al.*, (2003b) s'hi descriuen algunes de les limitacions dels mètodes taxonòmics clàssics. En alguns casos com és la identificació dels insectes només es pot resoldre en un estadi evolutiu concret o en un dels dos sexes. Un altre inconvenient consisteix en que es pot ocasionar un mal reconeixement del tàxon degut a la plasticitat fenotípica i la variabilitat genètica dels caràcters utilitzats. Una altra limitació es troba en l'aplicació d'espècies críptiques, tot i que en certes ocasions es poden arribar a identificar espècies críptiques mitjançant mesures proporcionals. A Kobayashi i Kondo (2007) s'explica com la mida de la closca dels mol·luscs permet la identificació de dues espècies críptiques (*Margaritifera laevis* i *M. Middendorffi*). Finalment, la identificació morfològica pot arribar a ser un gran repte per a la falta d'espècies-tipo (Salveti *et al.*, 2020).

El reconeixement taxonòmic clàssic presenta diverses limitacions que han provocat el desenvolupament de noves tècniques moleculars basades en el genoma.

7.2 Codi de Barres

Una de les tècniques que destaquen en els estudis taxonòmics basats en el genoma és el Codi de Barres o *DNA Barcoding*. En aquest apartat es defineix què és el Codi de Barres i en què consisteix.

El Codi de Barres es basa en seqüenciar fragments concrets del genoma (Kumar *et al.*, 2018) que comparteixen totes les espècies dels grans grups però són prou variables com per distingir-les. Llavors s'aplica aquest fonament per comparar-la amb seqüències de referència dipositades

en bases de dades i així relacionar-la amb l'espècie de la qual pertany (Hebert *et al.*, 2003a). Per tant, proporciona una estratègia segura per a la identificació d'espècies conegudes i no conegudes mitjançant un anàlisi de variació de seqüència.

Són diverses les característiques que hauria de tenir el codi de barres ideal. Zhang *et al.*, (2015) afirma que hauria de posseir poca variació intraespecífica, una alta divergència interespecífica i el mínim de la divergència interespecífica hauria de ser major que el màxim de la variació intraespecífica. En altres paraules explica que ha de ser una seqüència prou conservada per tal que hi hagi menys variabilitat dins de la mateixa espècie que entre espècies i que la taxa de mutació ha de ser suficient per presentar una bretxa de codificació de barres o *barcoding gap* (regions del genoma que presenten una menor variació intraespecífica menor que la interespecífica) (Meyer i Paulay, 2005). S'estima que una bona variació interespecífica entre espècies properes és d'almenys el 3% però aquest nombre pot variar entre els diferents grups taxonòmics (Staats *et al.*, 2016). Per altra banda, el codi de barres hauria de ser universal per a que la seva amplificació sigui senzilla i ha de contenir pocs processos d'inserció o eliminació de nucleòtids per facilitar l'alineació de seqüències (Yang *et al.*, 2018).

Són moltes les avantatges que presenta enfront la taxonomia tradicional ja que és un mètode molt més fiable i precís d'usar el qual no es troba limitat per la morfologia o etapa de desenvolupament de l'individu (Hebert *et al.*, 2003b). A més, poden ser utilitzats sense coneixements previs dels taxons a analitzar (Hebert *et al.*, 2004) i els equips de laboratori necessaris per a dur a terme la tècnica solen estar presents en l'àrea de biologia molecular (Yu *et al.*, 2017). Aleshores, organitzacions internacionals com *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) i *Barcode of Life Data System* (BOLD) promouen la utilització del Codi de Barres com a mètode molecular estàndard per a la identificació d'espècies (Yang *et al.*, 2018).

7.2.1 Procediment general

La identificació taxonòmica d'espècies mitjançant l'ús del codi de barres és un procés similar per a totes les mostres animals i vegetals (Yang *et al.*, 2018). El primer pas consisteix en l'extracció de l'ADN de la mostra a analitzar per posteriorment, seleccionar el codi de barres més adient i amplificar-lo mitjançant una reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Finalment, la cadena amplificada es seqüencia i compara amb una base de dades de referència on es recull tota la informació genòmica dels organismes.

L'extracció de l'ADN és la primera passa de la tècnica, el protocol de la qual presenta diversos punts crítics com són la lisis de teixits, l'eliminació d'impureses i la seva precipitació. Aquest procés es pot dur a terme mitjançant mètodes tradicionals, per exemple com l'extracció amb dodecilsulfat sòdic (SDS) i fenol-cloroform, però la majoria d'estudis ja ho fan mitjançant l'ús de kits comercials o protocols específics per l'extracció d'ADN per un cas en concret (Staats *et al.*, 2016)

Un cop, l'ADN de la mostra ha quedat aïllat, s'escull la regió del codi de barres més adient per a la posterior amplificació. La selecció dependrà de l'estat de dita mostra i de quin sigui el seu origen. En el cas dels animals, s'estableix el Citocrom Oxidasa I (COI) com a codi de barres estàndard proposat pel Consorci de Codi de Barres de la Vida (CBOL) (Yan *et al.*, 2013) però si la mostra es troba molt degradada la taxa d'amplificació és superior amb la utilització de *mini-barcodes* (<100pb).

L'amplificació de la regió *barcode* està lligada a la presència d'encebadors o *primers*, els quals començaran l'amplificació del segment en la regió d'ADN hipervariable per assegurar la màxima resolució taxonòmica (Leray *et al.*, 2013). Uns mateixos *primers* poden amplificar moltes espècies diferents. Pel seu disseny i avaluació s'utilitza un software de biologia

molecular. A part dels encebadors, per a la realització de la PCR també és necessari la presència d'ADN polimerases termoestables, de dNTP i de nucleòtids. Per altra banda, s'han de tenir en compte altres paràmetres com la temperatura i el temps de desnaturalització i unió a l'encebador (*annealing*) ja que són fonamentals per a la correcta amplificació.

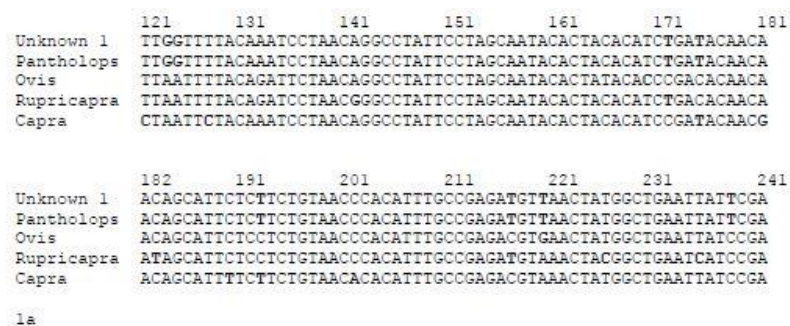
Un cop amplificada la regió seleccionada es passa a la seva seqüenciació. El mètode més usat és Sanger ja que permet la lectura de seqüències de fins a 1.000 pb, tot i que també és adequat per a mostres menors. El procés inclou quatre passes: purificació dels productes amplificats per PCR, reacció de seqüenciació, una segona purificació i finalment electroforesi capil·lar.

Des de l'any 2005, les avantatges de les tècniques de Sequenciació de Nova Generació (NGS) o seqüenciació massiva han revolucionat la branca de la Taxonomia (Shokralla *et al.*, 2012). Les NGS permeten la seqüenciació de mils de fragments d'ADN en paral·lel. La piroseqüenciació fou la primera tècnica de seqüenciació massiva incorporada al mercat (Shokralla *et al.*, 2014).

Finalment, la regió serà comparada amb una seqüència de referència disponible en bases de dades públiques per a la correcta identificació de l'espècie. El codi de barres normalment es basa en biblioteques públiques de referència establertes en NCBI GenBank o BOLD (*BOLD Systems*, 2014-2020).

L'anàlisi de seqüències s'executa amb eines com *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Es tracta d'un algoritme basat en les similituds, el qual relaciona la seqüència analitzada amb la seqüència de referència present en la base de dades (Altschul *et al.*, 1997) proporcionant un percentatge de semblança. En el cas que no hi hagi una similitud entre les seqüències de referència i l'analitzada, el programa ho identificarà com un nou taxó (Staats *et al.*, 2016). Els mètodes basats en arbres filogenètics són una tècnica complementària (Ogden *et al.*, 2009). El que fan és assignar la seqüència analitzada a un determinat *cluster*, és a dir, agrupen les espècies que tenen una seqüència similar en unitats taxonòmiques operacionals (OTUs). Un OTU és comunament definit com un *cluster* que presenta un 97% de similitud i per tant, pot ser considerat com una única espècie (Hebert *et al.*, 2003a)

En la Figura 5 s'ensenya un exemple de la coincidència entre una mostra extreta d'un xal de shatoosh (teixit que es forma a partir dels pels més fins de l'antilop tibetà) amb les seqüències de referència del GenBank.



	Pantholops	Ovis	Rupricapra	Capra	Unknown 1
Pantholops	-	90.00	91.67	90.84	100.00
Ovis	12	-	91.67	90.84	90.00
Rupricapra	10	10	-	88.33	91.67
Capra	11	11	14	-	90.84
Unknown 1	0	12	10	11	-

1b

Figura 5. Bases 121-241 del gen citocrom b de *Pantholops hodgsonii* (antilop) en comparació amb les espècies de mamífers que presenten les homologies més

propres a la seqüència. També es mostra el nombre de bases diferint entre les quatre espècies i el % de similitud entre les 120 bases (Linacre i Tobe, 2011).

7.2.2 Codi de Barres Animal

L'ADN mitocondrial (ADNmt) és una font de marcadors moleculars degut al seu alt nombre de còpies, herència materna, falta de recombinació i alta tasa de mutació (Piganeau *et al.*, 2004). S'ha estandaritzat l'ús dels gens mitocondrials en el reconeixement d'espècies (Jogayya *et al.*, 2013) degut a que presenten una elevada variació interespecífica i baixa variació intraespecífica.

Per altra banda, presenta una sèrie de mancances entre les quals inclou índex de mutació inconsistent, heteroplasmia i introgressió (Rubinoff *et al.*, 2006). L'heteroplasmia és la coexistència entre dos o més genomes d'ADNmt en el mateix organisme (Breton *et al.*, 2007), és a dir, consistiria en la presència de pseudogens nuclears mitocondrials (Numts). Els Numts són còpies no funcionals d'ADNmt trobades en el nucli de les cèl·lules eucariotes. Poden ser fàcilment coamplificats juntament amb l'ADNmt mitjançant l'ús d'encebadors universals. Llavors la caracterització dels organismes usant un *primer* curt pot resultar un vertader problema. Per reduir la possibilitat d'identificacions incorrectes, s'han d'identificar i eliminar els Numts presents (Song *et al.*, 2008). La introgressió consistiria en el moviment de gens d'una espècie a una altra degut per un procés d'hibridació. L'espècie híbrida presentaria un genoma mixt de les dues espècies procedents i en conseqüència la seqüència resultant s'hauria d'afegir a la base de dades.

Entre els marcadors mitocondrials destaquen el Citocrom b (Cit b), 12S rRNA, 16S rRNA o la regió D-loop però el considerat marcador fonamental per als animals és el Citocrom Oxidasa I (COI, COX1, CO1) (Hebert *et al.*, 2003b). La seqüència COI (648 pb) és un locus del codi de barres que es troba a l'ADN mitocondrial (Hebert *et al.*, 2003a) i que codifica part de l'enzim terminal de la cadena respiratòria dels mitocondris (Vartak *et al.*, 2015).

Aquesta seqüència (648pb) forma part d'una proteïna transmembrana present en els mitocondris, la qual conté una seqüència molt conservada entre espècies. Funciona com l'acceptor terminal d'electrons en la cadena respiratòria i per tant, catalitza la reducció de l'oxigen a aigua. La proteïna compren diverses subunitats nuclears i tres sintetitzades en el mitocondri (subunitats I, II i III). El Citocrom Oxidasa I es troba localitzat preferentment entre les membranes de la cresta mitocondrial (Waugh, 2007).

El Govern Federal de Brazil ha adoptat el fragment COI del Codi de Barres com a mètode estàndart per a la identificació rutinària de productes pesquers processats (Carvalho *et al.*, 2017). A l'estudi s'analitzaven 255 productes de peix per demostrar si es trobaven ben etiquetats o si es tractaven d'espècies en perill o que patien la sobrepesca. Com a resultat es va demostrar que el 17.3% de les mostres es trobaven mal identificades i algunes de les mostres es relacionaven en taxons sobreexplotats.

Malgrat que el 98% dels animals poden ser identificats amb el marcador COI (Hajibabaei *et al.*, 2006) no sempre es pot usar degut a la presència de buits en les bases de dades ja que no hi són presents les seqüències de referència d'alguns grups com els rèptils i els amfibis per la falta d'estudis taxonòmics usant COI (Klippel *et al.*, 2015). La raó que justifica la manca d'estudis recau en que el gen 16S ARNr seria el principal marcador utilitzat fins al moment pel reconeixement de dits grups (Murphy *et al.*, 2013). Altres grups en que l'ús de COI no és eficient són en els nematodes, els gasteròpodes, els cnidaris i els equinoderms degut a que és una regió poc conservada (Hebert *et al.*, 2003a; Remigio i Hebert, 2003; Derycke *et al.*, 2010; Hoareau i Boissin, 2010).

Un altre marcador utilitzat tradicionalment en el reconeixement és el Citocrom b (Cit b), però en comparació amb el COI, les bases de dades d'accés públic són encara més incompletes i no poden assegurar una correcta identificació de l'espècimen (Wilson-Wilde *et al.*, 2010), si bé, el Citocrom b juntament amb 12S i 16S ARNr són els marcadors genètics més usats en la discriminació d'espècies en mostres degradades (Karlsson i Holmlund, 2007). Això deu ser perquè igual que el marcador 16S rRNA, contenen regions internes altament conservades a través dels taxons, adequat per la designació de *primers* universals, alternats amb regions curtes hipervariables que són específics d'espècies (Sarrí *et al.*, 2014).

L'estudi fet per Rajpoot *et al.*, (2018) és un bon exemple de l'ús del fragment Citocrom b com a codi de barres en mostres de mala qualitat. L'arrel de la planta Hatha Jodi (nom comú de la planta) és un símbol de bona sort i per tant, presenta una gran demanda en el comerç indi. L'arrel del vegetal té un aspecte molt similar als genitals de *Varanus* (sargantana protegida a la Índia) per la qual cosa s'aprofita la seva gran semblança per comercialitzar els genitals enlloc de l'arrel. Com a conseqüència del comerç il·legal del rèptil ha desencadenat una disminució de la població de la sargantana. El resultat de l'assaig ha revelat un 100% de coincidència entre les seqüències de les mostres requisades amb les seqüències de referència de *Varanus*.

7.2.3 Codi de Barres Vegetal

La identificació molecular dels animals està ben establerta degut a la utilització del fragment de gen mitocondrial Citocrom C Oxidasa I (COI) com a codi de barres estàndard però en vegetals, aquesta seqüència és altament invariable (Jiao *et al.*, 2019) i conseqüentment, no es pot usar com a codi de barres (Baek *et al.*, 2013). Aleshores, les regions nuclears i del cloroplast es solen usar en estudis filogenètics per a la identificació taxonòmica d'espècies vegetals (Chase *et al.*, 2005).

Dependrà del tipus de mostra a analitzar que s'utilitza una regió o una altra: en mostres que han estat prèviament emmagatzemades durant un llarg període o degradades, com la fusta, s'utilitzarà majoritàriament el genoma cloroplàstic degut a que presenta un nombre de còpies major (Jiao *et al.*, 2019). Entre els codis de barres basats en el genoma del cloroplast, es proposen les regions *rbcL*, *matK* i *trnH-psbA* com els marcadors oficials recomanats per *Barcode of Life* (Eurlings *et al.*, 2013).

El codi de barres *rbcL* codifica la subunitat major de la rubilosa-1,5-bifosfat carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO). Com que la RUBISCO és un enzim fotosintètic crític, *rbcL* fou el primer gen que fou seqüenciat. La seva amplificació, seqüenciació i alineació és molt senzilla en la majoria de plantes terrestres però el seu poder discriminatori és modest (Staats *et al.*, 2016).

Per altra banda, la regió *matK* (841 pb) codifica l'enzim maturasasa que participa a l'splicing d'introns de tipus II a partir de transcripcions d'ARN. Tot i que per alguns autors consideren a *matK* com a marcador anàleg de COI (Hilu *et al.*, 1997), la seva amplificació és costosa, sobretot en les plantes que no són angiospermes degut a la falta de *primers* universals (Fazekas *et al.*, 2008).

L'espaciador intergènic *trnH-psbA* (450pb) és un dels segments més variables del cloroplast en angiospermes. Com que la seva longitud pot variar entre els 296 a 1120pb, l'obtenció de fragments i la seva seqüenciació pot resultar problemàtica. A més, quan la longitud de la regió *trnH-psbA* presenta una seqüència molt curta (300pb) en les angiospermes provoca que la variació entre seqüències no sigui suficient per a la discriminació entre espècies (Vijayan i Tsou, 2010).

Entre els marcadors basats en l'ADN nuclear destaca l'ITS. Es tracta d'una regió repetida en tàndem dins del genoma nuclear que generalment demostra una variabilitat interespecífica molt elevada (Jiao *et al.*, 2019). A l'estudi de Yu *et al.*, (2017) en el que s'examinen quin són els millors marcadors per a la identificació de *Dalbergia* (espècie de bosc en perill d'extinció) s'arriba a la conclusió que ITS2 és el millor fragment per al seu reconeixement i que es podria reconèixer com a codi de barres universal pel món vegetal (Chen *et al.*, 2010). En contra, s'exposen dues restriccions: possibilitat de contaminació per microbis i amplificació de còpies no funcionals (Yu *et al.*, 2017).

Tot i que alguns autors expressen la seva conformitat cap a un codi de barres específic, altres afirmen que la combinació de *primers* (còctel de *primers*) augmenta la taxa de discriminació d'espècies comparat amb l'ús d'un sol (Kolmann *et al.*, 2017). Es deu a que permet detectar més polimorfismes alhora en les seqüències estudiades i la posterior elecció de fragments més curts però eficients en la discriminació de taxons en mostres degradades (Botti i Giuffra, 2010).

Els assajos previs per a la detecció de *Hoodia* (espècie de cactus sintetitzadora d'esteroides glicosídics utilitzats per perdre pes) en diferents productes utilitzant el Codi de Barres varen fallar. Degut a la seva utilitat, el comerç il·legal ha provocat la incorporació del vegetal a la llista CITES. En Gathier *et al.*, (2013) es combinen el marcador nuclear ITS juntament amb *psbA-trnH* per a una major resolució de *Hoodia* en diferents productes. Aquests marcadors permeten amplificar petites quantitats d'ADN presents a la mostra i distingir entre espècies molt properes gràcies a que la longitud de la seva cadena és de menor mida. Es conclou que el Codi de Barres és un sistema d'identificació vàlid per al reconeixement de *Hoodia*. A més, es va poder detectar l'adulteració de certs productes vegetals amb compostos que no estaven especificats en l'etiqueta.

7.2.4 *Metabarding i Mini-barcoding*

En l'estudi de mostres degradades o mixtes per la identificació del material del qual està format, no sempre es pot utilitzar el Codi de Barres convencional. Per aquesta raó, s'han dissenyat nous protocols derivats del *Barcoding* anomenats *Metabarcoding* o *Mini-barcoding*. Ambdós mètodes, juntament amb el Codi de Barres, són capaços de reconèixer espècies animals i discriminar productes originals d'aquells que estan modificats en la medicina tradicional, material cru, productes processats i preparacions complexes (Yang *et al.*, 2018).

L'ADN-*Metabarcoding* és un tipus especial de Codi de Barres i per tant, utilitza la mateixa base de dades de referència que el codi de barres però permet la identificació de taxons en mostres mixtes mitjançant l'ús de mètodes de seqüenciació massiva (Taberlet *et al.*, 2012). El prefix "meta" es refereix a la col·lecció de seqüències *barcode* de diferents espècies (Staats *et al.*, 2016).

El protocol a seguir pel *Metabarcoding* consisteix en: 1) extreure l'ADN de la mostra, 2) amplificar el segment específic *Barcode* o un altra regió d'interès, 3) seqüenciació massiva de l'amplicó d'ADN, 4) anàlisi de les seqüències usant un programa informàtic adient i 5) identificació d'espècies mitjançant la similitud dels amplicons amb la base de dades (Staats *et al.*, 2016).

A l'estudi de De Boer *et al.*, (2017), on s'analitza el *Metabarcoding* per a la identificació d'orquídies i altres plantes en productes comercials, conclou que l'ADN *Metabarcoding* serveix per a la verificació de la presència o absència de certes plantes en productes que només podien ser analitzats a través de proves químiques, i en conseqüència serveix per identificar i monitorar espècies afectades pel comerç il·legal.

Tot i que el *Metabarcoding* pareix un procés simple d'aplicar, Staats *et al.*, (2016) exposa les limitacions que dificulten la tasca. En primer lloc, les condicions a les quals estan exposades les mostres causen una pèrdua de la qualitat de l'ADN i variació en les concentracions. A més, el poder de discriminació dels mètodes informàtics depèn directament de l'elecció del marcad o *Barcoding* i de la informació proveïda de la base de dades elegida.

La majoria de mostres utilitzades en el *Metabarcoding* provenen de teixits dels espècimens però en els darrers anys s'ha desenvolupat un nou subtipus anomenat *Environmental Metabarcoding* (*e-metabarcoding*) (Valentini *et al.*, 2016) en el que s'usen mostres extretes de l'aire o aigua (e-ADN) sense necessitat d'un previ aïllament d'ADN (Lodge *et al.*, 2012). De la mateixa manera també poden ser extretes del sediment per analitzar la diversitat d'invertebrats, fongs i bacteris (Orgiazzi *et al.*, 2015).

En moltes ocasions, les mostres que arriben al laboratori estan molt processades i en conseqüència, l'ADN es troba molt degradat. Així i tot, és possible la seva amplificació i seqüenciació mitjançant el disseny de nous *primers* estàndard que permetin escurçar la longitud del fragment (Eurlings *et al.*, 2013). Els nous codis de barres formats per una cadena més curta de nucleòtids (50-400 pb) s'anomenen *mini-barcodes*.

Per a teixits animals amb ADN degradat, els Mini Codi de Barres posseeixen una major taxa d'èxit que els Codis de Barra que utilitzen una longitud completa (Yang *et al.*, 2018), arribant a la identificació del 90% de les mostres (Shokralla *et al.*, 2011).

L'ús de *Mini-barcodes* és una bona eina pel reconeixement de mostres degradades però en reduir la seqüència a amplificar també es perd informació. Per aquest motiu és necessari la seqüenciació de diferents fragments amb diferent nombre de parells de bases per arribar a obtenir la quantitat més gran d'informació possible. És el que passa en Dubey *et al.*, (2011) on s'ha pogut dur a terme la correcta identificació de mostres en mal estat de *Python molurus* amb la utilització d'una seqüència de 245pb. Prèviament, es va utilitzar un fragment de 175 pb amb el que només es podia arribar al gènere *Python*, segurament per la falta de seqüències de referència a la base de dades. *Python molurus* és una espècie de serp protegida de l'Índia que és caçada per la comercialització de la seva pell. Gràcies als esforços de les autoritats per frenar el tràfic il·legal de serps i la utilització de *mini-barcodes* per mostres en mal estat es propicia la conservació de l'espècie.

Pel que fa a les plantes, el disseny de *Mini-barcodes* estàndard de moment no ha tingut èxit a causa del fet que les restriccions de longitud permeten treballar amb ADN altament degradat però condiciona la resolució de l'espècie (Staats *et al.*, 2016).

7.3 PCR-*real time*

Una de les tècniques taxonòmiques usades en el camp de la investigació criminal d'espècies és el *DNA Barcoding*. Així i tot, l'aplicació d'aquest quan el temps és limitat és difícil. Per aquest motiu es proposa la PCR *real-time* (PCRrt) com a mètode alternatiu per a reduir el nombre de passos necessaris per al diagnòstic d'una espècie sense la necessitat de realitzar-lo dintre d'un laboratori (Cardeñosa *et al.*, 2018).

La PCR en temps real o també coneguda com a PCR quantitativa és una variant de la PCR convencional, i per tant, utilitza els mateixos components. A diferència de la PCR estàndard s'utilitzen fluoròfors (SYBR Green, TaqMan) per mesurar la quantitat de productes amplificats en cada moment (Pereira *et al.*, 2008) i detectar si l'amplificació PCR s'ha produït a causa de la presència de l'ADN objectiu.

El colorant fluorescent és inserit a la sonda de nucleòtids. Mentre que la sonda es troba sencera no es desprèn fluorescència. En el moment, que la seqüència objectiu es troba present, la sonda

es comença a dissociar mitjançant l'activitat nucleasa de l'ADN polimerasa. Aquesta dissociació augmenta el senyal de fluorescència. Les molècules restants de fluoròfors s'eliminen en cada cicle la qual cosa permet un augment de la intensitat de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicons produïts (Pereira *et al.*, 2008). Els fluoròfors són detectats per un sensor de fluorescència present en el termociclador en el moment que es produeix l'amplificació de l'ADN. El disseny d'encebadors específics per a l'espècie a estudiar és un pas obligatori o es corre el risc de produir-se una amplificació creuada d'espècies properes que condueixen a falsos positius (Littlefair *et al.*, 2016).

Durant el darrer pas del protocol se solen generar diagrames de corbes de fusió que poden ser usades per a la identificació final de les espècies. Les corbes de fusió es generen per la dissociació de l'ADN de doble cadena durant les temperatures de l'escalfament i la corba de fusió varia normalment amb la relació GC / AT de l'amplicó generat i la seva mida (Ririe *et al.*, 1997).

La presència de taxons protegits en productes pot ser fàcilment determinada mitjançant la PCR a temps real. És el cas de la utilització del mètode per a la identificació de shatoosh (llana provinent de *Pantholops hodgsonii*, antílop) en peces de roba (Fei *et al.*, 2014). El seu comerç ha causat la disminució del nombre d'espècimens i per aquest motiu, s'han dissenyat un conjunt de primers per la 12S ARNmt específics de l'antílop. La tècnica ha permès la detecció d'un 1% de shahtoosh mesclat amb caixmir fent que una sola fibra es pugui arribar detectar.

7.4 Microsatèl·lits

Els microsatèl·lits (STR, *Short Tandem Repeats*) són seqüències curtes compostes entre 1 a 6 parells nucleòtids de longitud que tenen una alta taxa de mutació per culpa de l'escorregut de la polimerasa durant la replicació de l'ADN (Ellegren, 2004). Aquestes seqüències es repeteixen en tàndem un nombre determinat de cops. Les més freqüents són les mono, di, tri o tetra, si bé, els més emprats són els tetra gràcies al fet que el percentatge d'*stutter* és menor (Gill *et al.*, 1994).

A causa dels alts nivells de polimorfisme, codominància i reproductibilitat de les anàlisis, s'ha demostrat l'aplicació dels microsatèl·lits a l'àrea forense, conservació d'espècies i filogeografia (Vanden Abeele *et al.*, 2019). El caràcter codominant permet la distinció entre organismes homozigots i heterozigots. A més, es poden aplicar en material degradat o en mal estat gràcies a la seva mida (<300 pb) (Gill *et al.*, 1994).

S'han de tenir en compte diversos factors per a la selecció d'un microsatèl·lit. Per una banda la qualitat de les dades obtingudes a partir de STR, considerant la presència d'errors en el genotip o per la manca d'informació. Per altra banda, s'ha de prendre consciència del poder discriminatori de cada un dels microsatèl·lits (Coetzer *et al.*, 2017).

La cria en captivitat és una de les principals activitats per a l'obtenció d'animals amb valor comercial. Per tant, es dona la possibilitat que els individus siguin caçats il·legalment i col·locats en centres de captivitat al·legant que ja eren descendents legítims d'individus en captivitat. Els lloros de la família *Psittacidae* són molt apreciats pels col·leccionistes pel seu plomatge colorit, capacitat de mimica, atractiu exòtic i raresa. Per aquests motius són sovint incorporats a centres en captivitat per una posterior comercialització. La verificació filial mitjançant la utilització de microsatèl·lits pot ser una evidència fiable de l'activitat il·legal. En Jan i Fumagalli (2016) es desenvolupen microsatèl·lits per a set tipus diferents de lloros involucrats en el comerç il·legal local i internacional. L'anàlisi proporciona les proves de si les mostres forenses de les aus havien estat o no en captivitat.

El mateix passa a l'estudi de Rębała *et al.*, (2016) s'analitza l'ús de STR per a la identificació d'espècies salvatges i domèstiques de porc senglar i porc en diferents localitzacions. Conclou que els microsatèl·lits són una bona eina per a la diferenciació entre porcs domèstics i salvatges així com per verificar la identitat genètica d'espècimens amb el propòsit de dur a terme investigacions forenses de crims de vida salvatge, garantia de la salut pública, control de parentesc en ramaderia i gestió de la seguretat alimentaria.

7.5 SPInDel

La presència d'InDels (mutacions d'inserció/deleció) en el genoma s'ha considerat com un problema per a la seqüenciació de l'ADN i, per tant, aquestes regions s'han evitat a l'hora de desenvolupar tècniques d'identificació taxonòmica d'espècies (Santos i Pereira, 2018). Aleshores, es va desenvolupar l'SPInDel (*Species Identification by Insertions/Deletions*) el qual va demostrar que les regions genòmiques amb múltiples InDels poden ser utilitzades per a processos d'identificació d'espècies (Figura 6).

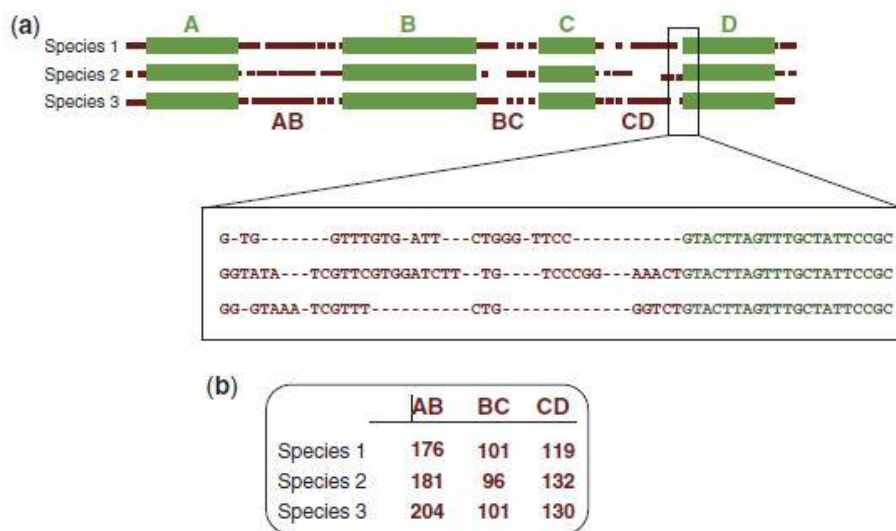


Figura 6. Il·lustració esquemàtica de les passes seguides per a la identificació d'espècies utilitzant l'SPInDel. (a) Il·lustració de la seqüència alineada de les espècies hipotètiques. Les quatre regions conservades (verd) defineixen els dominis hipervariables (línies marrons no contínues). Una secció de l'alineament és augmentat per ensenyar la presència de buits en les regions hipervariables. (b) Cada espècie és identificada per un perfil numèric resultat de la combinació de les longituds de les regions hipervariables (Pereira *et al.*, 2010).

L'SPInDel és un enfocament alternatiu per a la identificació taxonòmica basat en la longitud de sis regions del gen ARN ribosòmic (ARNr) (Alves *et al.*, 2015). En general, les alineacions de seqüències de gen d'ARNr de diferents espècies mostren una alternança entre regions conservades i variables, a causa de la presència de substitucions anomenades SNP i insercions/deleccions (InDels). La presència d'InDels provoca seqüències amb diferents longituds i introdueix espais durant l'alineació. El principi de la tècnica consisteix en el fet que cada fragment diferent estudiat és característic de cada espècie, per tant, cada taxó es defineix per un perfil numèric.

L'SPInDel PCR múltiple es basa en la metodologia de la PCR-*multiplex*, per tant, s'encarrega d'amplificar simultàniament en la mateixa reacció diversos fragments, marcats prèviament, per poder diferenciar-los mitjançant electroforesi capil·lar (Pereira *et al.*, 2008). Fou desenvolupat per a la identificació de mostres humanes i mostres provinents d'animals domèstics (Gonçalves *et al.*, 2015). Avui en dia presenta un alt potencial per a treballar en tots els grups taxonòmics,

ja que inclou una base de dades amb més de 1800 perfils específics per a espècies de 18 grups taxonòmics (Carneiro *et al.*, 2012).

La tècnica fou comprovada l'any 2014 per la Comissió de Treball de Parla Espanyola i Portuguesa de la Societat Internacional de Genètica Forense (GHEP-ISFG, *Working Commission of the Spanish and Portuguese-Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics*) (Alves *et al.*, 2017). Els 24 laboratoris de 10 països diferents varen identificar onze mostres proveïdes per la GHEP-ISFG usant SPinDel i 10 mostres control d'espècies objectiu. Es va proporcionar un *software* als participants per l'obtenció dels resultats. Totes les mostres foren correctament identificades per 22 dels 24 laboratoris, incloses les mostres amb poca quantitat d'ADN o mixtes. Posteriorment, per una segona comprovació, s'analitzaren 241 mostres de les quals 238 foren ben identificades. Es pot suggerir que SPInDel és un mètode vàlid per al reconeixement d'espècies fàcil de ser implementat als diferents laboratoris de Genètica Forense.

En Carneiro *et al.*, (2012) es defineixen els passos a seguir per a la realització de l'SPInDel (Figura 7). El primer que es fa és obtenir les seqüències d'ARNr mitocondrial del GenBank per posteriorment, elegir aleatòriament una seqüència representativa de cada espècie. Posteriorment, per a facilitar el maneig de dades s'ha dissenyat una plataforma computacional on a la finestra principal apareix la seqüència a estudiar amb un valor que s'assigna a cada nucleòtid depenent de la freqüència d'aparició en les seqüències alineades. En aquest moment, es dissenyen encebadors complementaris a regions altament conservades que delimiten els InDels (Gonçalves *et al.*, 2015). Per tant, cada espècie és identificada per un perfil numèric creat a partir de diversos fragments de longitud determinada com a resultat de la combinació de regions hipervariables (Santos i Pereira, 2018).

El perfil es produeix per electroforesis capil·lar amb l'ús d'escapes al·lèliques. En el cas que no es pugui determinar la longitud del fragment, la identificació encara és possible comparant el patró de bandes de la mostra objectiu amb les mostres de referència analitzades (Pereira *et al.*, 2010).

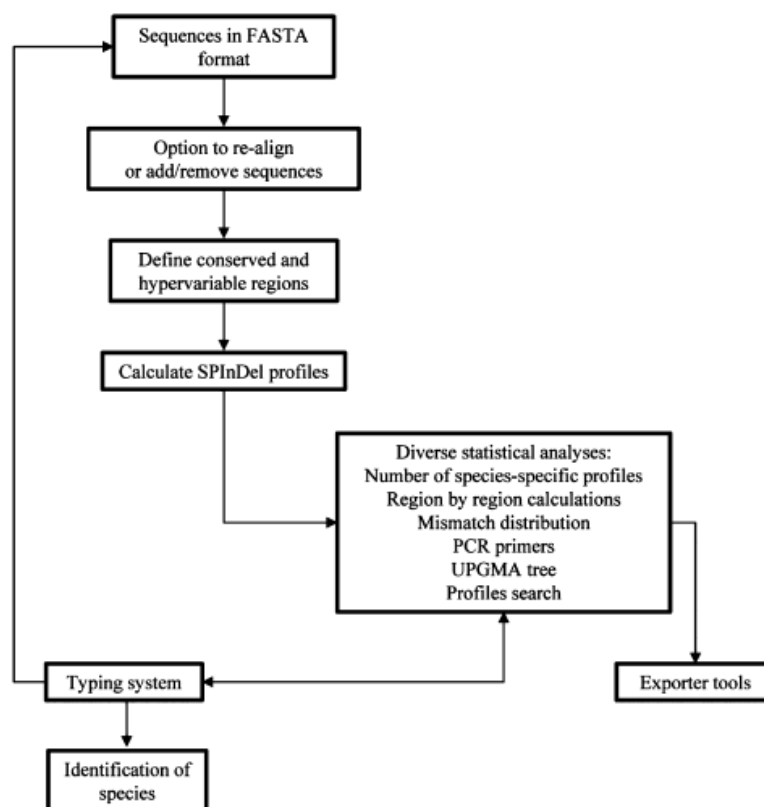


Figura 7. Diagrama de fluxe de les passes a seguir durant l'utilització de l'SPInDel per al processament de l'informació per la identificació d'espècies (Carneiro *et al.*, 2012).

Les espècies amb una línia evolutiva propera podrien obtenir un perfil de l'SPInDel molt similar. En Gonçalves *et al.*, (2015) s'explica que les espècies del gènere *Vulpes* presenten un perfil similar que amb altres taxons d'un gènere diferent. Tot i això, la coincidència dels perfils és molt estrany considerant l'alt nombre de possibles combinacions numèriques (Pereira *et al.*, 2010).

L'SPInDel s'ha aplicat per a la identificació de la subclasse dels Elasmobranquis (Amaral *et al.*, 2017). Aquest grup inclou els depredadors més grans que pateixen activitats de sobreexplotació per l'obtenció de la seva carn i aletes. A pesar dels mecanismes de conservació existents, cap mètode molecular està disponible per a mostres de ratjades i taurons en un context forense. El desenvolupament d'un sistema molecular basat en el fragment 16S ARN amb presència d'InDels permet la identificació de diversos taxons d'Elasmobranquis.

7.6 Espectrometria del Temps de Vol (TOFMS)

L'estudi dels composts orgànics volàtils (VOCs) va ser usada principalment per l'anàlisi de cossos en descomposició (Stefanuto *et al.*, 2015). En el camp forense, els VOCs són rellevants per entendre la detecció de drogues, explosius, etc. mitjançant l'olfacte dels cans.

Un mètode proposat recentment pel reconeixement taxonòmic d'espècies és la microextracció en fase sòlida (HS-SPME, *headspace solid phase microextraction*) acoblada a GCxGC-TOFMS (Gas Cromatography-time-of-flight mass spectrometry). La tècnica s'encarrega de detectar els volatils que desprèn la mostra. Els volatils és el conjunt de perfils de composts orgànics volàtils (VOCs) que es troben influenciats per factors primaris (genètics), secundaris (com la dieta o l'ambient) i terciaris (factors externs) (Curran *et al.*, 2005).

De la mateixa manera que cada espècie presenta una seqüenciació genòmica única que s'usa per a la identificació mitjançant el Codi de Barres, també produeix un volatiloma característic que permet la seva diferenciació (Ueland *et al.*, 2016).

Diversos articles investiguen l'aplicació de perfils de volatilomes utilitzant GCxGC-TOFMS per a la detecció de mostres forenses. És el cas de l'anàlisi d'exemplars que es requisaren en controls de fronteres on se sospitava que eren productes derivats de l'ivori dels elefants (Ueland *et al.*, 2020). Per això, a partir de mostres conegudes d'ivori d'elefant, dentina o os s'usaren per a realitzar un perfil de volatiloma de referència. L'assaig es dugué a terme comparant els perfils de volatilomes obtinguts amb els de referència. A més, per confirmar que el resultat fou correcte, es realitzaren anàlisis d'ADN i es va demostrar que GCxGC-TOFMS va identificar correctament sis de les vuit mostres procedents de l'ivori d'elefant.

GCxGC-TOFMS s'ha convertit en el mètode preferit per l'anàlisi de VOC. La unió d'ambdós protocols permet una sensibilitat de separació dels volatilomes superiors.

Per a la identificació taxonòmica d'espècies, TOFMS també es combina amb DART, sigles que provenen de l'anglès *Direct Analysis in Real Time*. A l'anàlisi de DART, l'espectròmetre de masses ràpidament identifica els compostos químics diferenciant la massa de la càrrega (m/z) (Paredes-Villanueva *et al.*, 2018). Com a resultat s'obté un espectre químic que pot ser incorporat a una base de dades per ajudar a la identificació de futures mostres.

El gènere *Pericopsis* inclou quatre espècies arbòries (Família Fabaceae) de les quals només una presenta interès comercial. La seva distinció és imprescindible perquè es tracta d'una espècie protegida per CITES. Per això, es varen recollir els perfils resultants utilitzant DART-TOFMS de les quatre espècies i servir com a referència discriminatòria per a les properes mostres (Deklerck *et al.*, 2017).

8. Discussió

A mesura que la tecnologia ha avançat també ho han fet els protocols per a la identificació taxonòmica de mostres forenses. El recorregut comença amb els mètodes clàssics, basats en el reconeixement de l'espècimen mitjançant caràcters morfològics, fins a arribar a tècniques més específiques basades en el genoma molecular o amb els compostos volàtils orgànics que desprèn la mostra.

El desenvolupament de noves tècniques sol ser una conseqüència de les limitacions que presenten els mètodes existents. Per exemple, com que els mètodes morfològics no poden arribar a reconèixer el taxó en casos on la mostra està degradada o incompleta, se cercaren altres vies de reconeixement.

L'anàlisi de les seqüències d'ADN mitocondrials i nuclears juntament amb els gens ARNr's han utilitzat com a eina fonamental per reconstruccions filogenètiques i com a punt de partida de les tècniques taxonòmiques moleculars. Es deu principalment al fet que es troben en tots els organismes, es troben funcionalment conservats i tenen una estructura en mosaic de regions conservades i variables (Pereira *et al.*, 2010). La PCR-*real time*, els microsatèl·lits, el Codi de Barres i l'SPInDel destaquen entre les proves moleculars utilitzades en el camp forense.

La discriminació taxonòmica mitjançant les tècniques moleculars citades sempre necessiten la comparació del resultat obtingut amb una base de dades de referència. La utilització de sistemes d'emmagatzematge de codi de barres proporcionen un gran avantatge sempre que les característiques genètiques intra e interespecífiques de l'espècie a estudiar hi estiguin guardades (Abd-Rabou *et al.*, 2012).

Barcode of Life Database (BOLD) és un dels principals sistemes d'emmagatzematge d'informació existents el qual emmagatzema una gran quantitat de marcadors d'espècies coneguts així com a informació taxonòmica i geogràfica de cada espècie, el problema resideix en què no conté tota la informació disponible sobre *Barcode* i llavors, els investigadors han de contrastar la informació a altres bases de dades com *GenBank* (Baek *et al.*, 2013).

És totalment imprescindible la creació d'una base de dades de codis de barres de DNA per a la determinació exacta d'espècies (Kundu *et al.*, 2018). Gràcies al desenvolupament d'una llibreria, el *Selangor State Forest Department* juntament amb *Institute Malaysia* varen ser capaços d'identificar i relacionar els tronc talats il·legalment amb la soca provinent mitjançant la utilització de codis de barres i una base de dades desenvolupada amb l'objectiu de frenar la desforestació (Tnah *et al.*, 2010).

Per altra banda, durant la inclusió de seqüències de referència a la base de dades es poden cometre errors (Belcaid i Poisson, 2017) de manera que s'han d'examinar totes les seqüències per una posterior correcta identificació. És el cas de Fields *et al.*, (2015) en el que s'identifiquen mostres de taurons que teòricament pertanyen al programa CITES però que en realitat la seqüència d'ADN és més propera a espècies no protegides.

En la comparació de resultats d'anàlisis taxonòmics mitjançant l'ús de DART-TOFMS també s'han trobat diversos errors. En Paredes-Villanueva *et al.*, (2018) es discuteix que les errades podrien ser causades pels següents motius: baix nombre de mostres de cada espècie, variació entre espècies, mala identificació per culpa de l'autor o variació del lloc on es troben les espècies. El clima, la caracterització del sòl, la presència de nutrients són factors determinants pel lloc on es localitza la mostra.

A conseqüència de les limitacions que presenta el *Barcoding*, BOLD té l'objectiu d'obtenir tres seqüències de cada espècie per tal de capturar la variació geogràfica de la web, ja que hi haurà alguna variació en la seqüència dintre una mateixa espècie. A més, d'incorporar fitxers amb informació complementaria. Aquestes mesures són per arribar a assegurar la qualitat de les dades enviades (Wilson-Wilde *et al.*, 2010).

L'establiment del fragment Citocrom Oxidasa I (COI) com a codi de barres animal en BOLD ha permès la resolució taxonòmica en molts estudis forenses, però també ha causat el desplaçament del citocrom b, cosa que era un dels marcadors més atractius per a estudis filogenètics i filogràfics a causa de l'elevada variació interespecífica (D'Amato *et al.*, 2013). Llavors, anàlisis de mostres basades en el Cít b d'alguns grups en els quals s'inclouen els nematodes, cnidaris, gasteròpodes i equinodermes, són més difícils de realitzar-se per culpa de la manca de seqüències de referència dipositades en les bases de dades.

COI es tracta d'un codi de barres extret de l'ADN mitocondrial, el qual presentarà una major taxa de mutació que l'ADN nuclear. Per aquesta raó, serà necessari una seqüència nucleotídica de major longitud per la diferenciació taxonòmica. A més, cada cèl·lula conté diversos mitocondris i aquest conté diverses molècules circulars de DNA (Waugh, 2007). És per aquest motiu que es destaca l'ús del DNA mitocondrial per sobre de l'ADN nuclear perquè presenta un major nombre de còpies i és més fàcil d'extreure en mostres processades (Rasmussen i Morrissey, 2008).

Tot i que la utilització tant de l'ADN nuclear com ADN mitocondrial per a la identificació de mostres animals hauria d'arribar al mateix punt final, diversos autors han conclòs que l'ús d'ADN mitocondrial i d'ADN nuclear en el mateix estudi taxonòmic pot provocar diferents assignaments d'espècimens (Marie-Stephane *et al.*, 2012).

En el món vegetal no s'ha arribat a establir cap codi de barres estàndard per a la resolució de totes les plantes. Per això, cada cop que es fa una anàlisi taxonòmic s'ha de fer un estudi previ de quin marcador és el més òptim. Entre els marcadors vegetals es destaquen els nuclears i els cloroplàstics.

El codi de barres basat en el cloroplast presenten un dèficit d'informació genètica que propicia una baixa resolució per a la identificació d'espècimens, en concret, per aquells taxons que pertanyen al mateix gènere (Chen *et al.*, 2015). Per altra banda, la seqüència cloroplàstica és difícil d'obtenir a partir de teixits de fusta però l'obtenció d'aquesta a partir de material fresc com fulles o brots és rutina (Jiao *et al.*, 2019). En el cas contrari, l'ADN cloroplàstic presenta altres avantatges: a) una alta taxa de mutació, b) un elevat nombre de còpies per cèl·lula, c) les seqüències analitzades se solen trobar en bases de dades públiques, d) conté regions conservades adequades pel disseny de *primers* universals i e) és heretat uniparentalment, per tant, no pateix recombinació (Olmstead i Palmer, 1994). En el cas dels codis de barres nuclears en el que destaca ITS sol presentar contaminació per fongs dificultant la seva recuperació (Jiao *et al.*, 2014).

La majoria de mostres que arriben al laboratori són productes que han estat prèviament manipulats per a la seva comercialització o que han estat exposats a condicions que propicien el degradat de l'ADN. Amb la PCR-*real time* és possible sabre amb quina quantitat d'ADN objectiu s'inicia l'estudi i quina quantitat s'ha amplificat (Pereira *et al.*, 2008).

Per altra banda, les seqüències que s'utilitzaran quan les mostres es troben degradades són de menor longitud. Per aquest motiu, s'han dissenyat mini codis de barres i microsatèl·lits que augmenten el poder resolutiu quan les mostres es troben en mal estat. La identificació taxonòmica d'aquest tipus de mostres també és possible gràcies a l'SPInDel, ja que inclou encebadors que actuen sobre tres regions més curtes (<200 pb) (Gonçalves *et al.*, 2015). Així doncs, tant el *mini-barcoding* com l'SPInDel són capaços de determinar mostres degradades o que contenen poc material genètic.

Les espècies properes evolutivament presentaran una seqüència gènica molt similar. Llavors, les tècniques moleculars basades en l'estudi de la seqüència, com el Codi de Barres, permetran diferenciar entre espècies provinents de la mateixa línia evolutiva. La discriminació d'espècies molt properes també és possible amb la tècnica SPInDel, la qual utilitza les regions amb InDels per a la correcta identificació, sense la necessitat de seqüenciar la mostra. D'aquesta manera, aprofita el que és una limitació per a les altres tècniques com un avantatge. A més a més, realitza una anàlisi simultani de múltiple loci (Santos i Pereira, 2018) amb l'objectiu de disminuir el nombre de resultats de falsos positius. Aquest fet s'explica en què la probabilitat que les sis regions d'ARNr utilitzat fallin durant l'amplificació dels polimorfismes és molt baixa, fins i tot menor que en els mètodes en què només s'usa un parell d'encebadors.

Els mètodes per a la identificació taxonòmica d'espècies basats en caràcters morfològics i anàlisis d'ADN presenten diverses restriccions: llarg període de temps, inversió monetària, experiència per al maneig de la tècnica i en el cas de les proves genètiques destrucció de la mostra (Ueland *et al.*, 2020). I a part, com és evident en qualsevol mostra en què l'ADN estigui totalment degradat, no es pot realitzar cap prova gènica (Coghlan *et al.*, 2012). Tot i això, el material necessari per dur a terme les proves estan a l'abast de qualsevol laboratori molecular.

GCXGC-TOFMS presenta el potencial de proveir una anàlisi taxonòmic utilitzant el perfil del volatiloma per a la identificació de l'organisme del qual prové la mostra sense necessitat de la seva destrucció. A més, podria arribar a constituir la base d'un dispositiu industrial portàtil basat en la detecció de composts orgànics volàtils. Aquests instruments poden ser considerablement més barats que mètodes actuals (Ueland *et al.*, 2016; 2020).

En síntesi, sigui quin sigui el mètode utilitzat, tots depenen d'una base de dades de referència i una taxonomia robusta per millorar l'assignació de les espècies (Coghlan *et al.*, 2012). A més, al no existir la tècnica idònia per l'assignació de totes les mostres, la millor manera és una combinació de les tècniques proposades amb el fi d'augmentar la correcta resolució de l'espècie.

9. Conclusions

La millora de les tècniques taxonòmiques d'identificació d'espècimens amb interès forense ha permès una millor i major resolució dels conflictes casuístics. Des d'un primer moment, la identificació taxonòmica es basava amb la utilització dels caràcters morfològics característics de cada taxó.

La manca de trets diferencials en mostres degradades, la presència d'espècies críptiques i el reconeixement dels individus en un estadi evolutiu concret impossibiliten la tècnica per al reconeixement de mostres en certs casos.

Com a alternativa, els protocols basats en l'ADN són una bona opció perquè tots els organismes disposen d'aquesta molècula. Es destaca el Codi de Barres, els microsatèl·lits i la PCR-*real time*. Els tres permeten obtenir un resultat més fiable i precís, ja que no és necessari tenir cap coneixement previ al taxó a estudiar. Tot i que es redueix el temps d'estudi, els perfils obtinguts de cada taxó s'han de dissenyar i comparar amb una base de dades de referència, ja que si no no s'assegura la correcta identificació.

Per altra banda, les mostres obtingudes d'organismes sense vida es solen trobar en condicions nefastes per culpa d'un processament prèvi. Llavors, en mostres en què encara es conservi l'ADN, les cadenes de nucleòtids seran més curtes i en conseqüència, s'utilitzaran Mini Codis de Barres, microsatèl·lits i l'SPInDel.

La presència d'InDels en el genoma és considerat un problema per a la seqüenciació de l'ADN, i per tant és un inconvenient per a aquestes tècniques. Però el que resulta una limitació, per a l'SPInDel és un avantatge, ja que desenvolupa perfils numèrics a partir d'aquestes regions.

Aquestes tècniques no es poden usar quan les mostres que arriben al laboratori han patit processos químics o físics molt forts que han degradat completament l'ADN. En aquest cas s'han de fer servir tècniques com TOFMS les quals es basen en la detecció dels volatíls que després la mostra.

Tot i que l'avanç de la tecnologia ha permès una millora en els protocols de reconeixement taxonòmic d'espècies amb interès forense encara queda molta feina a fer, ja que s'haurien de completar les bases de dades existents per una major eficàcia. Una combinació de les tècniques per al reconeixement de les mostres forenses permet una comparació dels resultats i una major precisió a l'hora d'especificar de quin taxó es tracta.

10. Referències

- Abd-Rabou, S., Shalaby, H., Germain, J. F., Ris, N., Kreiter, P., & Malausa, T. (2012). Identification of mealybug pest species (Hemiptera: Pseudococcidae) in Egypt and France, using a DNA barcoding a approach. *Bulletin of Entomological Research*, 102(5), 515-523.
- Ahmed, Y. A., Ali, S., & Ghallab, A. (2018). Hair histology as a tool for forensic identification of some domestic animalspecies. *EXCLI Journal*, 17, 663.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Alves, C., Pereira, R., Prieto, L., Amorim, A., & Pereira, F. (2015). Results of the GHEP-ISFG collaborative exercise for the taxonomic identification of forensic samples using the SPInDel method. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e184-e185.
- Alves, C., Pereira, R., Prieto, L., Aler, M., Amaral, C. R., Arévalo, C., ... & Catelli, L. (2017). Species identification in forensic samples using the SPInDel approach: a GHEP-ISFG inter-laboratory collaborative exercise. *Forensic Science International: Genetics*, 28, 219-224.
- Amorim, A. (2019). Nonhuman forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7, 44-46.
- Amaral, C. R. L., Bitencourt, A., Teixeira, C., Pereira, F., Silva, D. A., Amorim, A., & Carvalho, E. F. (2017). Probing the potential of the Shark Panel InDel multiplex v2. 0 on the forensic identification of batoid elasmobranchs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e221-e223.
- Arenas, M., Pereira, F., Oliveira, M., Pinto, N., Lopes, A. M., Gomes, V., ... & Amorim, A. (2017). Forensic genetics and genomics: much more than just a human affair. *PLoS Genetics*, 13(9), e1006960.
- Baek, S., Ha, I., Kim, S., Lee, S. H., Oh, H. H., Moon, D. C., ... & Kim, Y. (2013). Construction of an integrated barcode database for the molecular identification of species. *BioChip Journal*, 7(3), 242-246.
- Belcaid, M., & Poisson, G. (2017, April). A profile-based probabilistic approach for the detection of anomalies in the cytochrome C oxidase I amplicon sequences. In *Proceedings of the Symposium on Applied Computing* (pp. 11-17).
- Botti, S., & Giuffra, E. (2010). Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products. *BMC Biotechnology*, 10(1), 1-7.
- BOLD Systems* (2014-2020). Barcode of life Data System. <https://www.boldsystems.org/index.php>
- Breton, S., Beaupre, H. D., Stewart, D. T., Hoeh, W. R., & Blier, P. U. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. *Trends in Genetics*, 23(9), 465-474.
- Carvalho, D. C., Guedes, D., da Gloria Trindade, M., Coelho, R. M. S., & de Lima Araujo, P. H. (2017). Nationwide Brazilian governmental forensic programme reveals seafood mislabelling trends and rates using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 191, 30-35.
- Cardeñosa, D., Quinlan, J., Shea, K. H., & Chapman, D. D. (2018). Multiplex real-time PCR assay to detect illegal trade of CITES-listed shark species. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
- Carneiro, J., Pereira, F., & Amorim, A. (2012). SPInDel: a multifunctional workbench for species identification using insertion/deletion variants. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 1190-1195.
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., & Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889-1895.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... & Luo, K. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 5(1), e8613.

- Coetzer, W. G., Downs, C. T., Perrin, M. R., & Willows-Munro, S. (2017). Testing of microsatellite multiplexes for individual identification of Cape Parrots (*Poicephalus robustus*): paternity testing and monitoring trade. *PeerJ*, 5, e2900.
- Coghlan, M. L., Haile, J., Houston, J., Murray, D. C., White, N. E., Moolhuijzen, P., ... & Bunce, M. (2012). Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns. *PLoS Genetics*, 8(4), e1002657.
- Curran, A. M., Rabin, S. I., Prada, P. A., & Furton, K. G. (2005). Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using SPME-GC/MS. *Journal of chemical ecology*, 31(7), 1607-1619
- 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*, 4(1), 6.
- De Boer, H. J., Ghorbani, A., Manzanilla, V., Raclariu, A. C., Kreziou, A., Ounjai, S., ... & Gravendeel, B. (2017). DNA metabarcoding of orchid-derived products reveals widespread illegal orchid trade. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1863), 20171182.
- Deklerck, V., Finch, K., Gasson, P., Van den Bulcke, J., Van Acker, J., Beeckman, H., & Espinoza, E. (2017). Comparison of species classification models of mass spectrometry data: Kernel Discriminant Analysis vs Random Forest; A case study of Afrormosia (*Pericopsis elata* (Harms) Meeuwen). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(19), 1582-1588.
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., & Moens, T. (2010). Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS One*, 5(10), e13716.
- Dubey, B., Meganathan, P. R., & Haque, I. (2011). DNA mini-barcoding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 181-184.
- Eurlings, M. C., Lens, F., Pakusza, C., Peelen, T., Wieringa, J. J., & Gravendeel, B. (2013). Forensic identification of Indian snakeroot (*Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz) using DNA barcoding. *Journal of Forensic Sciences*, 58(3), 822-830.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., ... & Barrett, S. C. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One*, 3(7), e2802.
- Fei, J., Yang, J., Zhou, H., Tang, M., Lu, W., Yan, A., ... & Zhang, S. (2014). A novel method for identifying shahtoosh. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 723-728.
- Felix, G. A., Soares Fioravanti, M. C., Cassandro, M., Tormen, N., Quadros, J., Soares Juliano, R., ... & Piovezan, U. (2019). Bovine Breeds Identification by Trichological Analysis. *Animals*, 9(10), 761.
- Fields, A. T., Abercrombie, D. L., Eng, R., Feldheim, K., & Chapman, D. D. (2015). A novel mini-DNA barcoding assay to identify processed fins from internationally protected shark species. *PLoS One*, 10(2), e0114844.
- Gathier, G., van der Niet, T., Peelen, T., van Vugt, R. R., Eurlings, M. C., & Gravendeel, B. (2013). Forensic identification of CITES protected slimming cactus (*Hoodia*) using DNA barcoding. *Journal of Forensic Sciences*, 58(6), 1467-1471.
- Gill, P., Kimpton, C., D'Aloja, E., Andersen, J. F., Bar, W., Brinkmann, B., ... & Nellemann, L. (1994). Report of the European DNA profiling group (EDNAP)—towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Science International*, 65(1), 51-59.
- Garofalo, L., Mariacher, A., Fanelli, R., Fico, R., & Lorenzini, R. (2018). Hindering the illegal trade in dog and cat furs through a DNA-based protocol for species identification. *PeerJ*, 6, e4902.
- Gonçalves, J., Marks, C. A., Obendorf, D., Amorim, A., & Pereira, F. (2015). A multiplex PCR assay for identification of the red fox (*Vulpes vulpes*) using the mitochondrial ribosomal RNA genes. *Conservation genetics resources*, 7(1), 45-48.

- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(4), 968-971.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(suppl_1), S96-S99.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(41), 14812-14817.
- Hilu, K. W., & Liang, G. (1997). The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*, *84*(6), 830-839.
- Hoareau, T. B., & Boissin, E. (2010). Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: addressing the need for efficient COI amplification in the Echinodermata. *Molecular Ecology Resources*, *10*(6), 960-967.
- Iyengar, A. (2014). Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: a review. *Journal for Nature Conservation*, *22*(3), 195-205.
- Jan, C., & Fumagalli, L. (2016). Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). *PeerJ*, *4*, e2416.
- Jogayya, K. N., Meganathan, P. R., Dubey, B., & Haque, I. (2013). Mitochondrial 16S ribosomal RNA gene for forensic identification of crocodile species. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, *20*(4), 334-338.
- Jiao, L., Yin, Y., Cheng, Y., & Jiang, X. (2014). DNA barcoding for identification of the endangered species *Aquilaria sinensis*: comparison of data from heated or aged wood samples. *Holzforchung*, *68*(4), 487-494.
- Jiao, L., Lu, Y., He, T., Li, J., & Yin, Y. (2019). A strategy for developing high-resolution DNA barcodes for species discrimination of wood specimens using the complete chloroplast genome of three *Pterocarpus* species. *Planta*, *250*(1), 95-104.
- Karlsson, A. O., & Holmlund, G. (2007). Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International*, *173*(1), 16-20.
- Kitpipit, T., & Thanakiatkrai, P. (2013). Tiger hair morphology and its variations for wildlife forensic investigation. *Maejo International Journal of Science and Technology*, *7*(3), 433.
- Kobayashi, O., & Kondo, T. (2007). Comparative morphology of glochidia and juveniles between two species of freshwater pearl mussel Margaritifera (Bivalvia: Margaritiferidae) from Japan. *Venus (Japan)*, *65*(4), 355-363.
- Kress, W. J. (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*, *55*(4), 291-307.
- Klippel, A. H., Oliveira, P. V., Britto, K. B., Freire, B. F., Moreno, M. R., dos Santos, A. R., ... & Paneto, G. G. (2015). Using DNA barcodes to identify road-killed animals in two atlantic forest nature reserves, Brazil. *PloS One*, *10*(8), e0134877.
- Kolmann, M. A., Elbassiouny, A. A., Liverpool, E. A., & Lovejoy, N. R. (2017). DNA barcoding reveals the diversity of sharks in Guyana coastal markets. *Neotropical Ichthyology*, *15*(4).
- Kumar, V. P., Shukla, M., Rajpoot, A., Thakur, M., Nigam, P., Kumar, D., ... & Goyal, S. P. (2018). DNA barcoding as a tool for robust identification of cervids of India and its utility in wildlife forensics. *Mitochondrial DNA Part B*, *3*(1), 250-255.

- Kundu, S., Kumar, V., Laskar, B. A., Tyagi, K., & Chandra, K. (2018). Pet and turtle: DNA barcoding identified twelve Geomyid species in northeast India. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(2), 513-518.
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., ... & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in zoology*, 10(1), 34.
- Linacre, A., & Tobe, S. S. (2011). An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investigative Genetics*, 2(1), 2.
- Littlefair, J. E., & Clare, E. L. (2016). Barcoding the food chain: from Sanger to high-throughput sequencing. *Genome*, 59(11), 946-958.
- Lodge, D. M., Turner, C. R., Jerde, C. L., Barnes, M. A., Chadderton, L., Egan, S. P., ... & Pfrender, M. E. (2012). Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2555-2558.
- Mandoreba, T. Y., Cloete, K. J., Minnis-Ndimba, R., & Kupika, O. L. (2019). A Novel Application of a Cryosectioning Technique to Aid Scat Hair Microanalysis. *Journal of Forensic Sciences*, 64(4), 1181-1186.
- Mariacher, A., Garofalo, L., Fanelli, R., Lorenzini, R., & Fico, R. (2019). A combined morphological and molecular approach for hair identification to comply with the European ban on dog and cat fur trade. *PeerJ*, 7, e7955.
- Marie-Stephane, T., Mireille, O., & Serge, K. (2012). An integrative morphological and molecular diagnostic for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae). *Zoologica Scripta*, 41(1), 68-78.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422.
- Murphy, R. W., Crawford, A. J., Bauer, A. M., Che, J., Donnellan, S. C., Fritz, U., ... & Wang, W. Z. (2013). Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 161-167.
- Ogden, R., Dawnay, N., & McEwing, R. (2009). Wildlife DNA forensics—bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*, 9(3), 179-195.
- Olmstead, R. G., & Palmer, J. D. (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American journal of botany*, 81(9), 1205-1224. Santos, C., & Pereira, F. (2017). Design and evaluation of PCR primers for amplification of four chloroplast DNA regions in plants. *Conservation Genetics Resources*, 9(1), 9-12
- Orgiazzi, A., Dunbar, M. B., Panagos, P., de Groot, G. A., & Lemanceau, P. (2015). Soil biodiversity and DNA barcodes: opportunities and challenges. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 244-250.
- Paredes-Villanueva, K., Espinoza, E., Ottenburghs, J., Sterken, M. G., Bongers, F., & Zuidema, P. A. (2018). Chemical differentiation of Bolivian *Cedrela* species as a tool to trace illegal timber trade. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 91(5), 603-613.
- Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmao, L., & Amorim, A. (2010). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Research*, 38(22), e203-e203.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2(3), 187-200.
- Piganeau, G., Gardner, M., & Eyre-Walker, A. (2004). A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Molecular Biology and Evolution*, 21(12), 2319-2325.

- Rajpoot, A., Kumar, V. P., Bahuguna, A., Singh, T., Joshi, S., & Kumar, D. (2018). Wildlife forensics in battle against veneration frauds in Uttarakhand, India: identification of protected Indian monitor lizard in items available in the local market under the name of Hatha Jodi. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(2), 925-932.
- Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 280-295.
- Rębała, K., Rabtsava, A. A., Kotova, S. A., Kipen, V. N., Zhurina, N. V., Gandzha, A. I., & Tsybovsky, I. S. (2016). STR Profiling for discrimination between wild and domestic swine specimens and between main breeds of domestic pigs reared in Belarus. *PLoS One*, 11(11), e0166563.
- Reier, S., Sattmann, H., Schwaha, T., Harl, J., Konecny, R., & Haring, E. (2019). An integrative taxonomic approach to reveal the status of the genus *Pomphorhynchus* Monticelli, 1905 (Acanthocephala: Pomphorhynchidae) in Austria. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8, 145-155.
- Remigio, E. A., & Hebert, P. D. (2003). Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 641-647
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 245(2), 154-160.
- Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *Journal of heredity*, 97(6), 581-594.
- Salvetti, M., Bianchi, A., Marangi, M., Barlaam, A., Giacomelli, S., Bertoletti, I., ... & Giangaspero, A. (2020). Deer keds on wild ungulates in northern Italy, with a taxonomic key for the identification of *Lipoptena* spp. of Europe. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(1), 74-85.
- Santos, C., & Pereira, F. (2018). Identification of plant species using variable length chloroplast DNA sequences. *Forensic Science International: Genetics*, 36, 1-12.
- Sarma, K. K., Bhattacharjee, P. C., & Dey, S. (2014). Microscopical Analysis of Guard Hair of Tiger, *Panthera tigris*, with Reference to Wildlife Forensic Applications. *Journal of Advanced Microscopy Research*, 9(3), 199-205.
- Sarri, C., Stamatis, C., Sarafidou, T., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., ... & Mamuris, Z. (2014). A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, 43, 35-41
- Sato, I., Nakaki, S., Murata, K., Takeshita, H., & Mukai, T. (2010). Forensic hair analysis to identify animal species on a case of pet animal abuse. *International Journal of Legal Medicine*, 124(3), 249-256.
- Sedghiani, S., Raboudi, F., Bouktila, D., Makni, H., & Makni, M. (2017). A practical molecular diagnostic tool of the date moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) in Tunisia. *Journal of the Entomological Research Society*, 19(1), 81-90.
- Shokralla, S., Zhou, X., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Landry, J. F., Jacobus, L. M., & Hajibabaei, M. (2011). Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One*, 6(7), e21252.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794-1805.
- Shokralla, S., Gibson, J. F., Nikbakht, H., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hajibabaei, M. (2014). Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources*, 14(5), 892-901.
- Sims, M. E. (2012). Cranial morphology of five felids: *Acinonyx jubatus*, *Panthera onca*, *Panthera pardus*, *Puma concolor*, *Uncia uncia*. *Russian Journal of Theriology*, 11(2), 157-170.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486-13491.

- Staats, M., Arulandhu, A. J., Gravendeel, B., Holst-Jensen, A., Scholtens, I., Peelen, T., ... & Kok, E. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17), 4615-4630.
- Stefanuto, P. H., Perrault, K. A., Lloyd, R. M., Stuart, B., Rai, T., Forbes, S. L., & Focant, J. F. (2015). Exploring new dimensions in cadaveric decomposition odour analysis. *Analytical Methods*, 7(6), 2287-2294.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 21(8), 2045-2050.
- Tnah, L. H., Lee, S. L., Ng, K. K. S., Faridah, Q. Z., & Faridah-Hanum, I. (2010). Forensic DNA profiling of tropical timber species in Peninsular Malaysia. *Forest Ecology and Management*, 259(8), 1436-1446.
- The CITES species* (2017). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. <https://www.cites.org/eng/disc/species.php>
- Ueland, M., Ewart, K., Troobnikoff, A. N., Frankham, G., Johnson, R. N., & Forbes, S. L. (2016). A rapid chemical odour profiling method for the identification of rhinoceros horns. *Forensic science international*, 266, e99-e102.
- Ueland, M., Brown, A., Bartos, C., Frankham, G. J., Johnson, R. N., & Forbes, S. L. (2020). Profiling Volatilomes: A Novel Forensic Method for Identification of Confiscated Illegal Wildlife Items. *Separations*, 7(1), 5.
- Yan, D., Luo, J. Y., Han, Y. M., Peng, C., Dong, X. P., Chen, S. L., ... & Xiao, X. H. (2013). Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine. *PLoS one*, 8(2), e55854.
- Yang, F., Ding, F., Chen, H., He, M., Zhu, S., Ma, X., ... & Li, H. (2018). DNA barcoding for the identification and authentication of animal species in traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18.
- Yu, M., Jiao, L., Guo, J., Wiedenhoef, A. C., He, T., Jiang, X., & Yin, Y. (2017). DNA barcoding of vouchered xylarium wood specimens of nine endangered Dalbergia species. *Planta*, 246(6), 1165-1176.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... & Gaboriaud, C. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 25(4), 929-942.
- Vanden Abeele, S., Hardy, O. J., Beeckman, H., Ilondea, B. A., & Janssens, S. B. (2019). Genetic Markers for Species Conservation and Timber Tracking: Development of Microsatellite Primers for the Tropical African Tree Species *Prioria balsamifera* and *Prioria oxyphylla*. *Forests*, 10(11), 1037.
- Vartak, V. R., Narasimalu, R., Annam, P. K., Singh, D. P., & Lakra, W. S. (2015). DNA barcoding detected improper labelling and supersession of crab food served by restaurants in India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 359-366.
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2010). DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current science*, 1530-1541.
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29(2), 188-197.
- Wilson-Wilde, L., Norman, J., Robertson, J., Sarre, S., & Georges, A. (2010). Current issues in species identification for forensic science and the validity of using the cytochrome oxidase I (COI) gene. *Forensic science, medicine, and pathology*, 6(3), 233-241.
- Zhang, Z. L., Song, M. F., Guan, Y. H., Li, H. T., Niu, Y. F., Zhang, L. X., & Ma, X. J. (2015). DNA barcoding in medicinal plants: testing the potential of a proposed barcoding marker for identification of *Uncaria* species from China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 60, 8-14.