

## MEMÒRIA DETALLADA DEL PROJECTE

### TÍTOL

PROVES DE PATERNITAT EN NUCLIS DE REPRODUCTORS EN CAPTIVITAT DE TORTUGUES AUTÒCTONES (*Emys orbicularis*, *Mauremys leprosa* i *Testudo hermanni*). IDENTIFICACIÓ DE NOUS MARCADORS, ANÀLISI DE DESCENDÈNCIA I ESTRATÈGIES DE REPRODUCCIÓ.

### PLA I PROGRAMA

El projecte té l'objectiu de desenvolupar proves de paternitat per establir les dinàmiques de reproducció en captivitat dels grups de reproductors de tortugues autòctones. En els tres centres de reproducció de tortugues més importants de Catalunya -el Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC), el Centre de Reproducció de Tortugues de l'Albera (CRT) i el Zoo de Barcelona- la reproducció de les tres espècies de tortugues autòctones (*Testudo hermanni*, *Mauremys leprosa* i *Emys orbicularis*) es fa en grups de normalment 2-3 mascles amb 6-7 femelles. Aquesta estratègia, però, no garanteix que tots els individus s'estiguin reproduint i no permet establir el grau de parentiu i de consanguinitat d els descendents que posteriorment s'utilitzen per a la reintroducció.

Mitjançant l'ús de marcadors moleculars polimòrfics és possible determinar quins adults de cada grup s'estan realment reproduint, fent proves de paternitat. Els marcadors més utilitzats en aquests casos són els microsatèl·lits, i si bé a totes tres espècies n'hi ha de descrits, cal comprovar que siguin informatius en els animals captius i/o descriure'n de nous per tal de fixar, a cada espècie, un panell d'anàlisi adequat.

Per tot això, el desenvolupament consta de diverses fases: recollida de mostres d'adults reproductors, genotipatge de microsatèl·lits prèviament descrits, descripció de nous marcadors, processament i interpretació de les dades, comprovació de panells i genotipatge de descendents i finalment el redactat i publicació d'articles i documents científics.

Tots tres centres de reproducció en captivitat de Catalunya (el CRT, el CRARC i el Zoo) han mostrat el seu interès en el desenvolupament d'aquest projecte i hi col·laboraran activament, per a la recollida de mostres d'adults (preferiblement, sang) i de descendents (saliva o altra mostra no invasiva) dels seus animals en captivitat. Aquest mostratge cal fer-lo a la primavera en els

adults que surten d'hivernació, i per això el projecte començaria amb la recollida de mostres a la primavera del 2018. Cal destacar que al nostre grup de recerca LIG ja s'estan fent anàlisis prèvies amb mostres d'adults d'*Emys orbicularis* del CRT, per tal d'assajar el protocol d'extracció de DNA i analitzar el polimorfisme de microsatèl·lits.

El genotipatge de microsatèl·lits es realitzarà íntegrament al grup de recerca LIG del Departament de Biologia de la Universitat de Girona. En el seu laboratori compta amb tot l'aparellatge necessari per portar a terme les diferents tècniques moleculars que es plantegen en aquest projecte i que són, a grans trets: extracció de DNA de tots els exemplars a analitzar, amplificació per PCR amb primers marcats i electroforesi d'alta resolució i lectura dels resultats. Aquestes anàlisis es poden anar fent paral·lelament a la recollida de mostres, durant la primavera del 2018.

En funció dels resultats obtinguts en el genotipatge d'adults, es farà una cerca de nous microsatèl·lits mitjançant l'amplificació creuada amb altres espècies i/o la seqüenciació parcial del genoma de l'espècie i la identificació bioinformàtica de regions candidates. Al LIG ja s'han desenvolupat nous marcadors microsatèl·lits per a les espècies *Dreissena polymorpha* i *Corbicula fluminea* amb aquesta estratègia. Els nous microsatèl·lits caldrà també genotipar-los en els adults dels grups reproductors per tal de valorar el seu grau de polimorfisme i la seva utilitat en un panell de paternitats.

A partir de totes les dades de genotipatge obtingudes es pot establir quins són els microsatèl·lits més informatius per tal d'incloure'ls en un panell de marcadors de paternitat, que s'utilitzarà per al genotipatge dels descendents de cada grup reproductor, durant la tardor-hivern dels anys 2018 i 2019.

El processament i interpretació de les dades de genotipatge el durà a terme pel personal del LIG implicat en aquest projecte, que té àmplia i demostrada experiència en aquests tipus d'anàlisis. Per això s'utilitzaran els softwares específics per processar aquests tipus de dades, alguns de lliure accés i d'altres amb llicència del la qual disposa el LIG. Un cop processades les dades, s'interpretaran els resultats i es procedirà al redactat dels informes i articles científics pertinents.

## JUSTIFICACIÓ CIENTÍFICA DEL PROJECTE

La cria en captivitat de les tortugues autòctones del territori català (*Testudo hermanni*, *Mauremys leprosa* i *Emys orbicularis*) s'utilitza en la majoria de projectes de conservació que s'estan duent a terme (Vilardell-Bartino et al. 2011; Martínez-silvestre et al. 2009). Aquesta cria en captivitat es fa a partir de grups d'adults (de fins a 10 individus) mantinguts en tancats dels quals es recuperen les cries, que són traslladades a instal·lacions adequades per a la seva supervivència i creixement fins que poden ser alliberades al medi. En aquestes condicions, es desconeix quins individus adults s'han realment reproduït i estan realment contribuint a la diversitat genètica. Això pot causar una disminució de la diversitat genètica i un increment de la consanguinitat que podrien posar en perill la seva supervivència de les poblacions que reben individus reintroduïts (Scott Keogh 2009). Atès el menor nombre de mascles utilitzats en aquests grups reproductors i la possibilitat que s'estableixen jerarquies i/o competència per als aparellaments, pot ser que siguin molt pocs individus els que fecundin les femelles, i aquests efectes negatius podrien ser encara més importants. Això es podria solucionar amb estratègies de maneig que garantissin la reproducció de tots els adults.

El primer pas per optimitzar aquesta cria en captivitat es pot dur a terme mitjançant proves de paternitat que permetin determinar els progenitors (tant mascles com femelles) de les cries. La identificació dels parentals és una pràctica habitual a molts programes de cria en captivitat, incloent-hi altres rèptils (Pozarowski et al. 2013). En tortugues, el seu ús és especialment interessant si tenim en compte que alguns resultats previs que ja indiquen que la contribució dels adults reproductors pot estar molt esbiaixada. Per exemple, en tortugues gegants del gènere *Geochelone* criades en captivitat per a ser reintroduïdes, l'anàlisi de paternitats va demostrar que en el grup reproductor de 3 mascles i 12 femelles, un dels mascles gairebé no havia deixat descendents i 3 femelles havien produït 60 descendents d'un total de 132 (Milinkovitch et al. 2004). Aquesta informació ha permès introduir millores immediates en el programa de cria en captivitat.

Les proves de paternitat permeten, a més, detectar algunes pautes de comportament comunes en tortugues, com ara l'estacionalitat -per exemple mascles que no es reproduïxen cada any-, les paternitats múltiples i/o l'emmagatzemament d'esperma (Farke et al. 2015; Wright et al. 2012). Els marcadors genètics d'elecció per fer aquestes identificacions són els microsatèl·lits, perquè són molt informatius, tècnicament senzills de genotipar i barats. Actualment, un panell de 12 microsatèl·lits molt polimòrfics és la prova de paternitat habitual en totes les poblacions humanes (Thomson et al. 1999). En el cas de grups de tortugues en reproductors, com que el número de

parentals possibles és limitat, el número de microsatèl·lits que caldria analitzar i el seu grau de polimorfismes podria ser menor. A més, a diferència de les proves de paternitat en poblacions silvestres, ni les paternitats múltiples ni l'emmagatzematge d'esperma no suposen un problema significatiu.

Totes tres espècies incloses en aquest projecte tenen microsatèl·lits polimòrfics descrits, encara que no en tots els casos s'han fet servir per determinar paternitats.

### ***Testudo hermanni***

En aquesta espècie s'han utilitzat almenys 12 microsatèl·lits diferents per a caracteritzar la diversitat genètica (Perez et al. 2014) i per fer proves de paternitat (Farke et al. 2015), que han detectat tant paternitat múltiples com emmagatzemament d'esperma.

### ***Mauremys leprosa***

S'ha descrit l'amplificació creuada d'11 microsatèl·lits originalment descrits en altres espècies que es poden genotipar i són polimòrfics en la tortuga de rierol (Veríssimo et al. 2013). No s'han fet estudis poblacionals ni de paternitats utilitzant aquest tipus de marcadors nuclears.

### ***Emys orbicularis***

Dos estudis diferents han descrit 8 (Ciofi et al. 2009) i 15 (Pedall et al. 2009) microsatèl·lits polimòrfics. Els marcadors s'han utilitzat per descriure un ús freqüent de l'emmagatzemament d'esperma però una baixa incidència de paternitats múltiples (Portheault et al. 2005).

L'objectiu principal d'aquest projecte és dur a terme proves de paternitat en almenys 9 grups de reproductors (90 adults) de les espècies *Testudo hermanni*, *Mauremys leprosa* i *Emys orbicularis* per tal de determinar si la contribució genètica a la generació següent és similar per tots els adults reproductors. En el cas que això no sigui així, es proposaran alternatives de maneig (grups de mida més reduïda, alternança de mascles, etc.) per incrementar la diversitat genètica de les poblacions reintroduïdes.

Per això caldrà establir, en cadascuna de les espècies, un joc de microsatèl·lits polimòrfics que tingui prou resolució com per atribuir les paternitats amb la fiabilitat suficient, i posteriorment genotipar els descendents (aproximadament, 300). Per tant, es desenvoluparan tres subobjectius consecutius:

### 1.- Genotipatge d'adults reproductors pels microsatèl·lits ja descrits a cada espècie.

El genotipatge de microsatèl·lits és tècnicament senzill, i al grups de recerca LIG s'ha realitzat en d'altres espècies sense cap dificultat. Actualment ja s'estan realitzant les primeres proves per dos grups reproductors d'*E. orbicularis* del CRT de l'Albera.

### 2.- Identificació de nous marcadors microsatèl·lits per amplificació creuada i/o seqüenciació parcial del genoma.

La caracterització de nous marcadors es pot fer mitjançant l'anàlisi de marcadors descrits en altres espècies. En tortugues, s'ha utilitzat amplificació creuada per detectar microsatèl·lits en espècies de la mateixa família (Veríssimo et al. 2013; Perez et al. 2014). Aquest sistema funciona per la similitud entre els genomes d'espècies emparentades i és una opció senzilla d'intentar.

Si l'amplificació creuada no funciona, la caracterització de nous marcadors es pot fer mitjançant la seqüenciació d'una fracció petita del genoma, identificant bioinformàticament les regions amb estructura de microsatèl·lit (Peñarrubia et al. 2015). Aquest mètode ja s'ha utilitzat amb èxit al LIG. Atès el número relativament baix de marcadors disponibles en les espècies del projecte (i les relacionades), es preveu haver-lo d'utilitzar en almenys una de les tres.

### 3.- Disseny i optimització d'un panell de paternitats amb microsatèl·lits polimòrfics i genotipatge dels descendents de dos anys consecutius (2018 i 2019).

L'elecció dels microsatèl·lits més adequats per formar part del panell es fa a partir de les seves dades de polimorfisme. En general, els marcadors amb més número d'al·lels diferents (i amb freqüències intermèdies) són els preferits. Normalment això es valora amb el contingut polimòrfic que mesura l'índex PIC (Anderson et al. 1993; Botstein et al. 1980). Si hi ha pocs marcadors informatius, es poden dissenyar panells específics per a cada grup de reproductors utilitzant, per exemple, l'índex de Ron (Clop, 2002)

El genotipatge del panell de microsatèl·lits seleccionats en els descendents permetrà assignar correctament les paternitats de cada grup de reproductors i, per tant, establir la contribució genètica dels adults a la generació següent. La fiabilitat dels resultats es mesura mitjançant la probabilitat d'exclusió (Cifuentes et al. 2006). Per maximitzar les possibilitats de detectar comportaments estacionals dels mascles o l'emmagatzematge d'esperma, cal analitzar els descendents de dos anys consecutius intercanviant mascles de grups reproductors. Aquesta estratègia sembla freqüent almenys en el cas d'*Emys orbicularis* (Portheault et al. 2005), i atesa

la rellevància que pot tenir en la diversitat genètica de la descendència seria interessant poder-la valorar.

## **PRESENTACIÓ DELS TÈCNICS, INVESTIGADORS I INSTITUCIONS PARTICIPANTS**

El projecte que es proposa es portarà a terme al Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona per part dels investigadors Oriol Vidal, Rosa Maria Araguas, Núria Sanz, i Jordi Viñas, tots ells doctors i amb vinculació contractual amb la Universitat de Girona. N. Sanz, R.M. Araguas i J. Viñas són doctors en Biologia i O. Vidal és veterinari i doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona dins el programa de Ciència Animal.

El LIG és un grup de recerca amb continuïtat des de la seva formació, l'any 1988, quan va rebre el reconeixement de Grup de Recerca de Qualitat, en la primera convocatòria de la Direcció General de Recerca, renovada en la convocatòria de 1996 (referència SGR 00032). Posteriorment, el LIG ha estat considerat Grup de Recerca Consolidat per la Generalitat de Catalunya, reconeixement obtingut en la convocatòria de 2005 (referència 2005SGR 01065) i renovat fins l'actualitat (referència 2014 SGR 1334). Així mateix, el grup està reconegut com a grup de recerca per la Universitat de Girona en el seu catàleg de grups consolidats d'investigació (referència GRCT 001)

La principal línia de recerca del LIG s'emmarca en l'estudi de la diversitat biològica de les poblacions i la seva conservació a partir de l'avaluació genètica. Des de la seva creació, el LIG ha estat treballant en temes d'identificació genètica i estructura de poblacions de peixos de diferents espècies: protegides i amenaçades, com el fartet (*Aphanius iberus*), el samaruc (*Valencia hispanica*) i l'espínós (*Gasterosteus aculeatus*); o explotades com la truita comuna (*Salmo trutta*), l'anxova (*Engraulis encrasicolus*) i diferents espècies de túnids. Durant els darrers anys, el LIG ha realitzat també treballs de recerca en poblacions de mamífers com la llúdriga (*Lutra lutra*), la rata almesquera (*Galemys pyrenaicus*) o l'eriçó (*Erinaceus europaeus*) i amb races domesticades de cabra (*Capra hircus*) i ovella (*Ovis aries*). També s'han desenvolupat projectes de recerca sobre espècies invasores com la gambúsia (*Gambusia holbrooki*), el musclo zebrat (*Dreissena polymorpha*) o la cloïssa asiàtica (*Corbicula fluminea*).

En una primera etapa, la metodologia d'anàlisi utilitzada va ser l'electroforesi de proteïnes, que actualment ha estat totalment reemplaçada pels estudis basats en l'anàlisi de DNA. Mitjançant l'estudi d'al·lozims es van portar a terme diversos treballs, entre els quals cal destacar la recerca realitzada amb la truita comuna i els ciprinodòntids ibèrics (fartet i samaruc). La recerca amb

aquestes espècies va permetre identificar el patrimoni genètic de les poblacions ibèriques natives i millorar-ne la seva gestió. A més de les contribucions científiques, els resultats dels treballs realitzats amb la truita comuna s'han contemplat per establir les figures de protecció definides a l'Avantprojecte de la Llei de Pesca Continental de Catalunya i han estat claus per a la definició i el seguiment de la figura de gestió de 'Reserva Genètica', creada amb l'objectiu de protegir els endemismes moleculars d'aquesta espècie.

L'inici de l'aplicació de tècniques moleculars a partir de DNA al LIG fou l'any 1996, amb l'anàlisi genètic de poblacions mediterrànies de tonyina dins el projecte europeu 15/010, finançat per la CE i del que a més el LIG en va ser el coordinador general. L'investigador J. Viñas va participar com a investigador en aquest projecte, i continua liderant el treball que es segueix fent al LIG amb aquesta espècie. L'anàlisi molecular s'ha aplicat també en la caracterització genètica d'estocs d'anxova (projecte AMB95-0339 ), portada a terme pels investigadors J. Viñas i N. Sanz, i la identificació de recursos genètics de la truita (projectes CICYT AGF98-0636, REN2000-0740-CO2 i REN2003-05931/GLO, finançats pel MCyT), portada a terme per les investigadores R.M. Araguas i N. Sanz, entre d'altres.

Amb la incorporació de l'investigador O.Vidal l'any 2005, el grup del LIG s'ha consolidat en l'anàlisi genètic molecular de DNA mitjançant l'ús de marcadors tipus microsatèl·lits, SNPs i seqüenciació de gens nuclears i mitocondrials (projectes CGL2004-04368/BOS; CTM2006-00785; CGL2006-11652-C02-02/BOS), així com també ha aplicat noves tècniques de seqüenciació massiva per la identificació de polimorfismes nuclears en musclo zebra (projecte CGL2009-09407). L'anàlisi genètic a partir de microsatèl·lits amb l'espínol portada a terme per R.M. Araguas, N. Sanz i O. Vidal ha donat lloc al primer treball publicat sobre la genètica de les poblacions ibèriques d'aquesta espècie. Els estudis d'identificació i conservació de recursos genètics en espècies amenaçades, han permès també especialitzar-nos en la metodologia d'obtenció de DNA mitjançant tècniques no invasives en organismes amb dificultats de mostrejar com són els mamífers semi aquàtics: llúdriga (conveni 58/01 amb el DMAH, període 2000-2003) i rata almesquera (projecte MEC CGL2004-04368/BOS) i en espècies ovines i caprines (INIA RZ2007-00005-C02-02, INIA RZ2011-00015-C03-03). L'investigador O. Vidal ha liderat gran part dels treballs realitzats amb aquestes espècies. Cal destacar, a més, que durant la realització del seu doctorat al grup de Genètica i Millora del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària, a la UAB, va participar també en els serveis que des d'allà s'ofereixen i que inclouen la determinació de paternitats.

Per últim, pel que fa les tortugues autòctones, el nostre grup en col·laboració amb el Centre de Recuperació de Rèptils de l'Albera està realitzant anàlisis genètiques dels dos grups de reproductors de l'espècie *Emys orbicularis* per tal de determinar-ne la dinàmica de reproducció. Aquest treball inicial permet confirmar la viabilitat del projecte que es proposa.

En resum, tal i com es demostra pel número de projectes i de publicacions de qualitat realitzades pel nostre equip, el grup de recerca del LIG té prou experiència en l'estudi del DNA de diferents espècies per poder desenvolupar adequadament i amb èxit el projecte que es proposa. Pel que fa a la infraestructura, el laboratori del LIG està dotat de tot l'equipament necessari per portar a terme un projecte d'aquestes característiques: campanyes d'extracció i amplificació per PCR, termocicladors, centrífugues i seqüenciador automàtic de quatre capil·lars (ABIPRISM 3130, *Applied Biosystems*).

Cal destacar també que l'equip sol·licitant compta amb el suport logístic i la col·laboració del Centre de Reproducció de Rèptils de l'Albera, el Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya de Masquefa i el Zoo de Barcelona.

Més informació del LIG a:

<http://www.udg.edu/grupsrecerca/LaboratoriIdctiologiaGenetica/Inici/tabid/12885/language/ca-ES/Default.aspx>.

## **PREVISIÓ DE COSTOS**

Tot l'aparellatge necessari per a l'amplificació (PCR) i el genotipatge dels microsatèl·lits (campanyes, centrífugues, termocicladors i seqüenciador) es troba a disposició en el nostre laboratori. L'amortització i el manteniment de tot aquest aparellatge, així com el cost de la mà d'obra necessària pel desenvolupament de l'estudi, tant de la feina experimental com de processament de dades i elaboració d'informes i articles, representaria el finançament propi que aportariem al projecte. Per a la presa de mostres comptem amb la col·laboració del CRT, el CRARC i el Zoo de Barcelona.

La despesa que es proposa cobrir amb la beca PRIC és un 25% del total del pressupost i inclou el mostratge i la compra dels reactius necessaris per a l'extracció de DNA, el genotipatge dels *loci* microsatèl·lit (material fungible) i la seqüenciació parcial del genoma d'una de les espècies. En total es preveuen analitzar tres grups reproductors de cada espècie: 90 adults i 300 cries (en total 390 individus).

## PLANIFICACIÓ DETALLADA

Les tasques del projecte es desenvoluparan a partir dels tres subobjectius consecutius indicats anteriorment.

1.- Genotipatge d'adults reproductors pels microsatèl·lits ja descrits a cada espècie.

A partir de la primavera del 2018 es procedirà al mostratge i anàlisi dels adults reproductors per tal d'obtenir el genotipus de tots els microsatèl·lits descrits a cadascuna de les espècies. Per tal de dur-ho a terme, els passos són:

- Mostratge: en col·laboració amb els tres centres de cria (CRT, CRARC i Zoo) s'obindrà DNA a partir de sang dels 90 adults inclosos en el projecte mitjançant una extracció amb fenol-cloroform. La quantificació de l'extracció es realitza mitjançant l'aparell Nanodrop disponible al laboratori del LIG.
- Genotipatge per PCR amb marcatge fluorescent de 12 microsatèl·lits en *Testudo hermanni*, 11 microsatèl·lits en *Mauremys leprosa* i 23 microsatèl·lits en *Emys orbicularis*. Aquest procés implica l'ús d'un seqüenciador amb electroforesi capil·lar d'alta resolució ABI3130 (Applied Biosystems), disponible al LIG. La lectura de resultats es realitza amb el programa Genemapper (Applied Biosystems).
- Anàlisi de polimorfisme amb l'índex PIC (Botstein et al. 1980) per tal de determinar quants marcadors presenten prou informativitat a cada espècie.

En humans i altres espècies domèstiques es considera que calen almenys 12 microsatèl·lits per arribar a proves de paternitat amb fiabilitats adequades.

2.- Identificació de nous marcadors microsatèl·lits per amplificació creuada i/o seqüenciació parcial del genoma.

A partir dels primers resultats del subobjectiu 1 (estiu del 2018) i si no s'arriba a prou marcadors polimòrfics, es durà a terme l'amplificació creuada a partir d'una cerca actualitzada de microsatèl·lits disponibles en espècies relacionades. Es procedirà a l'amplificació per PCR i a l'anàlisi de polimorfisme tal com s'ha indicat prèviament.

Paral·lelament, es valorarà la idoneïtat de fer una seqüenciació massiva parcial del genoma (un pas probable en l'espècie *M. leprosa*, atès el reduït número de microsatèl·lits descrits que té) per

tal d'identificar i validar nous marcadors tal com ja hem realitzat anteriorment en el nostre grup (Peñarrubia et al. 2015). Aquest procés consta de:

- Seqüenciació parcial del genoma amb un mètode MPS. Per aquest pas es compta amb col·laboracions amb el Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG) per fer la seqüenciació amb algun sistema de *Massive Parallell Sequencing* que té disponibles.
- Identificació de regions amb repeticions en tàndem tipus microsatèl·lit amb el programa *Tandem Repeats Finder* (Benson 1999).
- Disseny de *primers* i validació dels microsatèl·lits candidats per PCR
- Anàlisi del polimorfisme en els adults del projecte.

3.- Disseny i optimització d'un panell de paternitats amb microsatèl·lits polimòrfics i genotipatge dels descendents de dos anys consecutius (tardor 2018 i tardor 2019).

Per poder caracteritzar la descendència de dos anys consecutius i establir les paternitats, cal optimitzar l'amplificació conjunta en PCR múltiplex dels microsatèl·lits que hagin presentat un índex de polimorfisme adequat. Per això, els passos a seguir en aquest subobjectiu són:

- Optimització de les PCR múltiplex en cada espècie, per a l'amplificació conjunta d'almenys 4 microsatèl·lits (fins a 3 multiplex per espècie).
- Mostratge de cries de dos anys consecutius per mètodes no invasius (saliva, descamacions de closca) i obtenció de DNA (tardor de 2018 i tardor de 2019). Per a les mostres no invasives l'extracció de DNA sol requerir protocols que maximitzin la quantitat de DNA obtinguda, i per això proposem l'ús de la reina Chelex100 (Biorad).
- Genotipatge dels microsatèl·lits tal com s'ha descrit anteriorment.

Finalment, l'assignació de paternitats es fa mitjançant diferents programes informàtics, com per exemple el Colony (Wang & Santure 2009) que permet tant l'assignació de parents com la identificació de grups de germans a partir de les dades dels microsatèl·lits.

## RELACIÓ DE MATERIALS

- Material necessari pel desenvolupament del projecte:

- Presa de mostres
  - agulles, xeringues i hisops
  - eppendorfs
  - alcohol de 70°
- Extracció de DNA
  - proteinasa K
  - resina Chelex 100
  - fenol
  - cloroform-isoamil
  - alcohols (70°, absolut)
  - tampó TE
- Genotipatge de microsatèl.lits
  - reactius de PCR (tampó, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, *primers*, Taq polimerasa, H<sub>2</sub>O milliq)
  - formamida
  - reactius pel manteniment del seqüenciador (tampons i polímer)

Gran part del material fungible necessari es preveu cobrir amb el finançament sol·licitat a la beca PRIC.

-Equipament necessari

- Campana d'extracció i de PCR
- Vòrtem
- Vòrtex
- Centrífuga d'eppendorfs i de plaques
- Nanodrop
- Termocicladors

- Seqüenciador automàtic ABIPRISM 3130 (*Applied Biosystems*)

Tot l'equipament necessari es troba a la nostra disposició al Laboratori d'Ictiologia Genètica de la UdG. També tenim llicència dels softwares GeneMapper (*Applied Biosystems*) i Geneious per la lectura de microsatèl·lits. La resta de programes informàtics que s'utilitzaran pel processament de les dades són d'accés lliure.

## **POSSIBLES PUBLICACIONS**

Es preveu la publicació d'almenys tres articles en revistes científiques internacionals, preferentment d'elevat índex d'impacte al *Science Citation index*, en els camps de la genètica de la conservació o la biodiversitat. En concret, aquests articles podrien centrar-se en (1) la possible detecció d'emmagatzemament d'esperma i/o paternitats múltiples en *M.leprosa*, (2) la caracterització de nous marcadors microsatèl·lits en les tres espècies del projecte, i (3) els resultats de les proves de paternitat i la proposta de noves mesures de gestió dels grups reproductors.

## **PLA ESPECÍFIC DE COMUNICACIÓ I DIFUSIÓ DELS RESULTATS**

A part de les publicacions en revistes internacionals, els resultats del projecte seran difosos en tres àmbits diferents per tal d'arribar als científics i als professionals però també a la ciutadania en general. En concret, aquests àmbits es corresponen a:

1.- Congressos científics en finalitzar el projecte (almenys un, depenent dels resultats):

- Congrés anual de la Sociedad Española de Biología Evolutiva
- Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución de la SEG

2.- Reunions de professionals, durant el primer any del projecte:

- Congreso Anual de la Asociación Ibérica de Zoos y Acuarios (AIZA)

3.- Xerrades de divulgació en tots els centres interessats, que podrien incloure:

- Càpsules de Ciències de la UdG
- Sessions de divulgació organitzades pels centres col·laboradors i d'altres interessats (per exemple, el Centre de Fauna dels Aiguamolls de l'Empordà o el Consorci de l'Estany de Banyoles)

A més, el Gabinet de Comunicació de la UdG dóna suport per a la comunicació amb els mitjans de comunicació i la realització de notes de premsa, i també gestiona el web de la UdG, que publicarà les notícies relacionades amb els resultats del projecte.

## REQUERIMENTS SOL·LICITATS AL ZOO

Aquest projecte inclou el mostratge dels exemplars de *T.hermannii* i *M.leprosa* del Zoo, i per tant es requereix la col·laboració del personal del Zoo per a la presa d'aquestes mostres. Dins aquesta convocatòria, també es sol·licita a la Fundació del Zoo el finançament parcial del mostratge i del material fungible necessari pel desenvolupament d'aquest projecte, que representa el 25% del pressupost total.

## REFERÈNCIES CITADES

Anderson, J.A. et al., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome Dynamics*, 36(i), pp.181–186.

Benson, G., 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, 27(2), pp.573–578.

Botstein, D. et al., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), pp.314–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686077&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Cifuentes, L.O. et al., 2006. Probability of exclusion in paternity testing: Time to reassess. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), pp.349–350.

Ciofi, C. et al., 2009. Characterization of microsatellite loci in the European pond turtle *Emys orbicularis*. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), pp.189–191.

Clop, A., 2002. Detecció de QTLs d'interès econòmic en un encreuament experimental de tipus F2 entre Porc Ibèric i Landrace (tesi doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona.

Farke, C.M. et al., 2015. Multiple paternity and sperm storage in captive Hermann's tortoises, *Testudo hermanni boettgeri* determined from amniotic fluid adhering to the eggshell. *Molecular and Cellular Probes*, 29(4), pp.254–257. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2015.05.009>.

- Martínez-silvestre, A., Bertolero, A. & Soler, J., 2009. Programa de conservació de les tortugues de rierol (*Mauremys leprosa*) i d'estany (*Emys orbicularis*) i de control de la tortuga de Florida (*Trachemys scripta* sp.) i d'altres quelonis al·lòctons al Parc del Foix. // *Monografies del Foix*, pp.213–223.
- Milinkovitch, M.C. et al., 2004. Genetic analysis of a successful repatriation programme: giant Galápagos tortoises. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 271(1537), pp.341–5. Available at: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/271/1537/341.short>.
- Pedall, I. et al., 2009. Isolation of microsatellite markers in the *Emys orbicularis* complex and development of multiplex PCR amplification. *Conservation Genetics*, 10(3), pp.725–727.
- Peñarrubia, L. et al., 2015. Using massive parallel sequencing for the development, validation, and application of population genetics markers in the invasive bivalve zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *PLoS ONE*, 10(3), pp.1–14.
- Perez, M. et al., 2014. Genetic variation and population structure in the endangered Hermann's tortoise: The roles of geography and human-mediated processes. *Journal of Heredity*, 105(1), pp.70–81.
- Portheault, A. et al., 2005. Sperm storage and low incidence of multiple paternity in the European pond turtle, *Emys orbicularis*: A secure but costly strategy? , 9, pp.0–7.
- Pozarowski, K., Ivy, J. & Herrmann, H.W., 2013. Using rattlesnake microsatellites to determine paternity in captive bushmasters (*Lachesis muta*). *Zoo Biology*, 32(4), pp.454–456.
- Scott Keogh, J., 2009. Evolutionary, behavioural and molecular ecology must meet to achieve long-term conservation goals. *Molecular Ecology*, 18(18), pp.3761–3762.
- Thomson, J.A. et al., 1999. Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. *Forensic Sci Int*, 100(1–2), pp.1–16. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10356771](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10356771).
- Veríssimo, J. et al., 2013. Cross-amplification of microsatellite loci for the Mediterranean stripe-necked terrapin (*Mauremys leprosa*). *Amphibia-Reptilia*, 34, pp.259–262. Available at: <http://booksandjournals.brillonline.com/content/10.1163/15685381-00002888>.
- Vilardell-Bartino, A. et al., 2011. El programa de recuperació de la tortuga mediterrània, *Testudo hermanni hermanni*, a la serra de l'Albera. In *La Conservación de las Tortugas de Tierra en España*. pp. 1–5.

Wang, J. & Santure, A.W., 2009. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, 181(4), pp.1579–1594.

Wright, L.I. et al., 2012. Reconstruction of paternal genotypes over multiple breeding seasons reveals male green turtles do not breed annually. *Molecular Ecology*, 21(14), pp.3625–3635.