

INFORME DE RESULTATS DEL PROJECTE ZOO 9117099:

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.

MEMÒRIA ECONÒMICA

Les despeses assignades al projecte es detallen en l'Annex 1. S'han dut a terme totes les activitats previstes, amb les despeses associades. S'han ampliat els objectius del projecte, i això ha implicat una desviació respecte de la previsió econòmica. Així, s'ha incrementat la despesa per a la seqüenciació massiva, i tota aquesta partida s'ha carregat en el cofinançament. Com comentarem més endavant, les anàlisis previstes al projecte s'han realitzat igualment totes, i atesos els resultats de *Testudo hermanni* s'ha decidit realitzar una anàlisi més gran (RADseq) per tal d'abordar línies d'acció prioritàries en la població de l'Albera.

MEMÒRIA CIENTÍFICA

La cria en captivitat de les tortugues autòctones del territori català (*Testudo hermanni*, *Mauremys leprosa* i *Emys orbicularis*) és una de les estratègies que s'utilitza en els seus plans de conservació. Aquesta cria es produeix en centres autoritzats, que tenen grups captius d'adults reproductors. Aquests grups captius poden arribar a ser de molts individus. Per exemple, el Centre de Reproducció de Tortugues de l'Albera (CRT) té tots els individus de *Testudo hermanni* (més de 100) en un sol tancat. 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).

L'objectiu principal d'aquest projecte era avaluar l'ús de marcadors moleculars per dur a terme proves de paternitat en grups de reproductors de les espècies *Testudo hermanni*, *Mauremys leprosa* i *Emys orbicularis*. Aquestes proves de paternitat generalment es fan amb marcadors moleculars microsatèl·lits. En el projecte, es va plantejar l'ús de microsatèl·lits ja descrits, així com la descripció d'altres marcadors en cas de no aconseguir prou resolució. Els resultats de les proves de paternitat indicarien de la idoneïtat de fer canvis en els grups reproductors en captivitat.

Atesa l'envergadura del projecte, en la memòria científica de la sol·licitud ja es va indicar la conveniència d'allargar el projecte dos anys (2018 i 2019), i l'any passat es va demanar la pròrroga corresponent, que va ser concedida. Els objectius del projecte s'han assolit, tot i que amb algunes limitacions. A més, per *Testudo hermanni* hi ha pendent l'anàlisi bioinformàtica d'uns resultats de genotipatge massiu que es va incloure en el projecte atesa la necessitat de trobar nous marcadors en aquesta espècie.

Mostratge i extracció de DNA

S'ha obtingut mostra de sang dels individus reproductors dels tres centres implicats en el projecte: el Centre de Reproducció de Tortugues de l'Albera (CRT), el Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC) i del Zoo de Barcelona (Zoo). En total, han estat 104 *T. hermanni* adultes de 4 grups reproductors (de les poblacions de l'Albera, de Mallorca i de Menorca), 21 *M. leprosa* adultes de 2 grups reproductors, i 18 *E. orbicularis* adultes de 2 grups reproductors.

A més, també s'ha fet extracció de sang de 57 cries de *T. hermanni* (de 3 dels grups reproductors), 12 cries de *M. leprosa* i 12 cries de *E. orbicularis*. De totes aquestes mostres (224) se n'ha fet

extracció de DNA. En 50 cries de *T. hermanni* i 12 cries d'*E.orbicularis* s'ha obtingut mostra no invasiva a partir d'un hisop anal.

En totes tres espècies, els primers resultats van indicar una resolució adequada però limitada dels marcadors microsatèl·lits per fer l'assignació de paternitats, especialment en l'espècie *T. hermanni*. Atesos aquests resultats, es va decidir prioritzar la cerca de nous marcadors a *T. hermanni*, l'espècie més amenaçada a la Península, que compta només amb la població de l'Albera. Amb aquesta finalitat es va realitzar un mostreig addicional d'individus salvatges de l'Albera (32), Mallorca (71) i Menorca (29). En les campanyes de mostreig dutes a terme gràcies a la col·laboració amb el CRT i amb en Samuel Pina de la UIB, es van capturar els individus per obtenir-ne sang i extreure'n el DNA.

Anàlisi de marcadors

A petició dels centres de cria, hem posat a punt la identificació de l'haplotipus mitocondrial per les tres espècies de tortuga. Tal com estava previst en el projecte s'han analitzat marcadors microsatèl·lits descrits en l'espècie o en espècies similars, per tal de trobar-ne que s'amplifiquin correctament per PCR i que siguin polimòrfics. Una part significativa dels marcadors específics no han funcionat. Això segurament reflecteix l'existència de diferenciació genètica entre els individus d'aquest projecte i els individus que es van utilitzar per a la identificació dels marcadors publicats.

A partir dels jocs de marcadors polimòrfics hem calculat, per a cada grup reproductor, la *combined non-exclusion probability* (NE-1P) amb el programa Cervus (www.fieldgenetics.com), que indica la probabilitat que un individu agafat a l'atzar no sigui descartat com a parental. Idealment, aquest valor hauria de ser molt proper a 0.

Resultats en *Emys orbicularis*

En total s'han provat 19 marcadors microsatèl·lits prèviament descrits (Ciofi et al. 2009, King & Julian 2004) dels quals només 5 han funcionat. El baix rendiment es produeix per dos motius: (1) per la no variabilitat del marcadors i (2) per la no amplificació del marcadors. Tots dos casos es podria explicar per la diferenciació genètica que pot haver-hi entre les poblacions que es van fer servir per trobar els marcadors amb les poblacions ibèriques.

Els 5 microsatèl·lits que han funcionat correctament (Taula 1) tenen bon rendiment en diferents espècies de tortugues d'aigua (King & Julian 2004), i també els hem fet servir en *M. leprosa*. Els valors de NE-1P són 0.104 i 0.165 en els dos grups reproductors d'*E. orbicularis* (Taula 2). Com comentarem ara mateix, aquesta resolució permet la identificació de paternitats amb algunes limitacions, i seria interessant trobar nous marcadors per incrementar-la. En aquests moments, i com a continuació del projecte, estem en procés d'obtenir nous marcadors en aquesta espècie mitjançant la tècnica de RADseq (Baird et al. 2008).

Taula1. Microsatèl·lits de cada espècie, amb la mida dels al·lels a la bibliografia, el fluorocrom, el número d'al·lels, les condicions de PCR i la referència.

Espècie	Marcador	Mida	Color	Temperatura d'annealing	Referència
<i>Testudo hermanni</i>	Ther23	89-107	VIC	60 → 50 °C	Zenboudji, et al. (2016)
	Ther110	81-108	PET		
	Ther17	100-196	6-FAM		
	Ther48	116-192	PET		
	Ther20	109-169	VIC		
	Ther51	181-205	NED		
	Ther40	100-136	NED		
<i>Mauremys leprosa</i>	B08	205-215	VIC	65 → 55 °C	King & Julian. (2004)
	D16	165-220	NED	65 → 55 °C	
	D87	215-220	6-FAM	65 → 55 °C	
	D88	125-155	PET	56,5 °C	
	D114	90-115	VIC	59,2 °C	
<i>Emys orbicularis</i>	B08	185-205	VIC	65 → 55 °C	King & Julian. (2004)
	D16	160-225	NED	65 → 55 °C	
	D87	185-260	6-FAM	65 → 55 °C	
	D88	135-185	PET	56,5 °C	
	D114	110-165	VIC	59,2 °C	

Taula 2. Marcadors utilitzats en *E. orbicularis*. S'indica el nombre d'al·lels observats, l'heterozigosi observada, l'heterozigosi esperada i el valor de contingut de d'informació del polimorfisme (PIC), el valor de probabilitat de no exclusió combinada (NE) pel primer parental i pel segon parental

Grup reproductor	Microsatèl·lit	Nº al·lels observats	Ho	He	PIC	NE-1P	NE-2P
Riudarenes	B08	3	1,000	0,642	0,516	0,104	0,021
	D16	8	0,750	0,892	0,816		
	D87	5	0,571	0,802	0,704		
	D88	7	0,750	0,850	0,770		
	D114	6	0,750	0,767	0,680		
Baix Ter	B08	3	0,400	0,611	0,492	0,165	0,040
	D16	8	0,700	0,816	0,751		
	D87	5	0,500	0,721	0,635		
	D88	7	0,800	0,800	0,730		
	D114	6	0,800	0,684	0,620		

Aquest joc de microsatèl·lits indica que a cada grup d'adults hi ha hagut només una parella reproductora. Aquesta situació és la que ja s'havia descrit abans en altres espècies de tortugues mantingudes en captivitat (Milinkovitch et al. 2004), i arran d'aquests resultats, el CRT ha canviat la distribució d'individus en tríos reproductors, amb un mascle i dues femelles (Joan Budó, comunicació personal). Els individus que té el CRT són els últims de la població del Baix Ter, i la seva cria és d'especial importància.

Resultats en *Mauremys leprosa*

En total s'han analitzat 16 microsatèl·lits, dels quals han funcionat els mateixos 5 microsatèl·lits que en *E. leprosa* (Taula 1), amb uns valors de NE-1P de 0.159 0.172 en els dos grups reproductors (Taula 3). Després d'analitzar els juvenils aquest joc de cinc marcadors no identificava cap parental compatible. Atès que en els grups de reproductors del Zoo la mare de cada cria està identificada, hem pogut detectar que els problemes estan relacionats amb la gran mobilitat dels al·lells durant l'electroforesi, especialment en el marcador D16. Sense aquest marcador, resultats indiquen contribució de més d'una femella en la reproducció anual, però molt possiblement d'un sol mascle. Tot i això, la cria en captivitat d'aquesta espècie té poca importància en els plans de conservació i els centres no han redistribuït els seus grups d'adults.

Taula 2. Marcadors utilitzats i anàlisi en *M. leprosa*. S'indica el nombre d'al·lells observats, l'heterozigosi observada, l'heterozigosi esperada i el valor de contingut de d'informació del polimorfisme (PIC) , el valor de probabilitat de no exclusió combinada (NE) pel primer parental i pel segon parental.

Grup reproductor	Microsatèl·lit	N al·lells observats	Ho	He	PIC	NE-1P	NE-2P
Zoo de Barcelona	B08	3	0,500	0,530	0,424	0,159	0,044
	D16	7	0,833	0,909	0,812		
	D87	2	0,500	0,530	0,368		
	D88	8	0,833	0,924	0,830		
	D114	4	0,667	0,561	0,476		
C.R.A.R.C.	B08	4	0,556	0,575	0,480	0,172	0,047
	D16	8	0,667	0,856	0,786		
	D87	2	0,333	0,503	0,362		
	D88	7	0,714	0,813	0,730		
	D114	5	0,375	0,775	0,682		

Per incrementar la potència del joc de marcadors, especialment després d'eliminar el D16, es va realitzar l'anàlisi de 4 microsatèl·lits més (MR9, MC20, MC3 i MC18) de l'espècie *Mauremys caspica* (Vamberger et al. 2011). Aquests marcadors amplifiquen correctament i són polimòrfics, però tal com el D16, la mobilitat dels al·lells durant l'electroforesi és molt alta i apareixen molts errors de lectura que fan impossible l'assignació parental. En aquests moments, i com a continuació del projecte, estem en procés d'obtenir nous marcadors tipus SNP mitjançant la tècnica de RADseq (Baird et al. 2008).

Resultats en *T. hermanni*

S'han provat 20 marcadors. La majoria han amplificat, però només 7 (Taula 1) han presentat bona amplificació i/o polimorfisme a la població de l'Albera, tal com ja s'havia descrit (Zenboudji et al. 2016, i comunicació personal). Cal destacar que els 13 marcadors restants no s'havien provat mai en aquesta població.

A més, la variabilitat dels 7 loci polimòrfics és molt baixa. La majoria del marcadors tenen només 2 al·lells, i en alguns casos un d'aquests dos al·lells es troba a freqüències molt baixes. Amb aquest joc de marcadors, la NE-1P més baixa és 0.381 (Taula 4). Aquest valor no és suficient per permetre la identificació de parentals, però sí que s'han utilitzat per detectar possibles híbrids entre la subespècies autòctona, *T. h. hermanni* i la subespècie oriental *T. h. boettgeri*.

Taula 4. Marcadors utilitzats en *T. hermanni*. S'indica el nombre d'al·lells observats, l'heterozigosi observada, l'heterozigosi esperada i el valor de contingut de d'informació del polimorfisme (PIC), el valor de probabilitat de no exclusió combinada (NE) pel primer parental i pel segon parental.

Grup reproductor	Microsatèl·lit	Nº al·lells observats	Ho	He	PIC	NE-1P	NE-2P
Mallorca	Ther20	1	0	0	0	0,712	0,503
	Ther23	2	0,75	0,536	0,359		
	Ther40	2	0,5	0,429	0,305		
	Ther48	1	0	0	0		
	Ther51	3	0,5	0,607	0,468		
	Ther110	1	0	0	0		
Menorca	Ther20	2	0,143	0,538	0,375	0,381	0,167
	Ther23	2	0,429	0,495	0,354		
	Ther40	5	0,857	0,769	0,666		
	Ther48	3	0,286	0,275	0,240		
	Ther51	4	0,429	0,758	0,655		
	Ther110	1	0	0	0		
Catalunya (inclou Albera)	Ther20	2	0,136	0,274	0,232	0,385	0,161
	Ther23	4	0,550	0,558	0,473		
	Ther40	5	0,560	0,629	0,571		
	Ther48	2	0,042	0,042	0,040		
	Ther51	8	0,708	0,795	0,749		
	Ther110	1	0	0	0		

El que indiquen aquests resultats és que la població de *T. hermanni* de l'Albera té molt poca variabilitat genètica, possiblement pels diferents colls d'ampolla que ha patit. És important destacar que aquesta població està tenint problemes de reproducció (Joan Budó, comunicació

personal) que podrien estar relacionats precisament amb els alts nivells de consanguinitat relacionats amb aquesta poca variabilitat genètica.

Unes línies d'acció prioritàries en aquesta població haurien de ser (1) controlar la consanguinitat perquè no s'intensifiqui més i (2) incrementar, si és possible, els nivells de diversitat. Per una banda, per controlar la consanguinitat és necessari fer una bona identificació de quins individus han estat els reproductors per garantir contribucions similars de tots els adults captius. Això implica aconseguir proves de paternitat fiables i adequades, que difícilment es podran fer amb marcadors microsatèl·lits.

Per l'altra banda, aconseguir incrementar la diversitat només és possible amb la introducció d'animals d'origens diferents. Aquesta idea genera polèmica, atès que la població de l'Albera presenta un fenotipus fosc característic i que no es troba en cap altra població. La introducció d'individus d'altres poblacions podria fer desaparèixer el fenotipus. Aquesta estratègia es va presentar i discutir al Mediterranean Workshop to Develop Tortoise Conservation Strategies, a Alacant l'Octubre de 2019.

Per tal de dur a terme aquesta introducció primer cal caracteritzar genèticament molts individus, per tal de valorar quines poblacions són les més properes. La introducció d'individus així podria ajudar a la conservació de la població de l'Albera sense que això signifiqui l'extinció dels genotipus peninsulars autòctons, tot i que pugui disminuir la freqüència del fenotipus fosc. Les poblacions que possiblement compleixen aquests requeriments són a Menorca i a Mallorca, atès que ja s'ha descrit que les tortugues d'algunes de les localitats d'aquestes dues illes estan més relacionats amb l'Albera que amb qualsevol altra població (Bertolero & Petrus, 2015).

Aquestes dues accions s'han volgut encara ja en el marc d'aquest projecte, i per això ja s'ha realitzat l'anàlisi amb RADseq (Baird et al. 2008). Els nostres resultats amb microsatèl·lits i els resultats previs de Zenboudji et al. (2016), indiquen la poca idoneïtat d'aquests marcadors per treballar amb aquesta població. Per tant, hem dirigit el projecte cap als polimorfismes d'un sol canvi nucleotídic, els SNP. Aquests polimorfismes són molt abundants en el genoma i són més fàcils d'analitzar amb tècniques de seqüenciació massiva. Concretament, amb RADseq el que s'aconsegueix és fer seqüenciació massiva d'una mateixa fracció del genoma en tots els individus analitzats. El resultat d'aquesta tècnica és, habitualment, la descripció i caracterització de milers de marcadors SNP. Aquests marcadors, tot i que presenten molt menys polimorfisme que els microsatèl·lits, es poden genotipar fàcilment en quantitats elevades en estudis posteriors.

Les proves de paternitat amb xips de 90 – 100 SNP han substituït, en algunes espècies domèstiques, les assignacions que es feien amb microsatèl·lits perquè aconseguen més fiabilitat, especialment en poblacions consanguínies (Anna Mercadé, comunicació personal), i

també perquè l'anàlisi és més fàcil d'automatitzar. RADseq en *T. hermanni* ha de permetre obtenir un joc de SNP similar que serveixi per identificar els individus reproductors en els grups captius.

De la mateixa manera, les anàlisis de poblacions amb centenars d'SNP estan substituint els estudis amb microsatèl·lits. Com abans, tot i el menor polimorfisme dels SNP, la possibilitat de genotipar-ne centenars o milers en un sol estudi RADseq, aconsegueix afinar molt millor les relacions entre individus i caracteritzar més bé la distància entre poblacions. En el cas de *T. hermanni*, amb poblacions de la mateixa subespècie *T. h. hermanni* a l'Albera, Mallorca i Menorca (Bertolero & Petrus, 2014) serà possible identificar si realment existeix una diferenciació genètica rellevant entre totes aquestes poblacions, i si és el cas, quin origen haurien de tenir els individus d'una hipotètica introducció a la població peninsular.

En aquest anàlisi RADseq s'hi han inclòs 95 individus de les poblacions de l'Albera, del nord i del sud de Menorca i de diverses poblacions de Mallorca. La part de tècniques moleculars ja s'ha realitzat, queda pendent l'anàlisi bioinformàtica dels resultats que permetrà (1) identificar els marcadors idonis per incloure en el test de paternitats i (2) completar l'anàlisi de genètica de poblacions.

Difusió de resultats

En el marc del projecte s'han dut a terme dos Treballs Final de Grau de Biologia (Annex 2, pàgines 1 i 31), dels alumnes Fernando Yelamo (defensat a la Universitat de Girona el Juliol del 2018) i Marc Palmada (defensat a la Universitat de Girona el Juliol del 2019). Molts dels resultats d'aquesta memòria han estat també presentats en aquests TFG.

La durada limitada del projecte i la progressió dels resultats no ha permès acabar el projecte amb publicacions científiques. N'hi ha dues de previstes en el futur proper, (1) els resultats del joc de cinc microsatèl·lits en *E. orbicularis* i *M. leprosa* i (2) els resultats de RADseq en *T. hermanni*.

A més, tal com s'establia en el projecte, s'ha presentat una comunicació en format pòster al congrés internacional organitzat conjuntament per les societats herpetològiques d'Espanya i Portugal, el XV Congreso Luso-Español de Herpetología a Salamanca el setembre de 2018. Aquesta comunicació porta per títol "Parental assessment in captive breeding groups of *Mauremys leprosa* and *Emys orbicularis*" (Annex 2, pàgina 60) i s'hi han detallat els resultats de l'ús dels 5 microsatèl·lits compartits entre *M. leprosa* i *E. orbicularis*. A més, durant aquest congrés es van explicar els resultats preliminars de *T. hermanni* en la reunió del grup de treball de tortugues de terra de l'Associación Herpetológica Española.

També, tal com estava previst, s'ha presentat una comunicació oral a la reunió d'experts l'octubre de 2019 a Alacant, el Mediterranean Workshop to Develop Tortoise Conservation Strategies. Aquesta xerrada es va titular "Population genetics tools for conservation of Mediterranean tortoises" (Annex 2, pàgina 61), i estava centrada en l'ús de RADseq en programes de conservació, i específicament l'ús que se'n pot fer en espècies de tortuga amenaçades.

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

ORIOL VIDAL i FÀBREGA



Referències

- Baird N.A., Etter P.D., Atwood T.S., Currey M.C., Shiver A.L., Lewis Z.A., et al. (2008) Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3, e3376.
- Bertolero A. & Petrus J.L. (2015) La tortuga mediterránea (Testudo hermanni) en las islas Baleares. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp*, 26.
- Ciofi, C. et al., 2009. Characterization of microsatellite loci in the European pond turtle *Emys orbicularis*. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), pp.189–191.
- FORLANI, A. et al., 2005. Identification and characterization of microsatellite markers in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*, Testudinidae). *Molecular Ecology Notes*, 5(2), pp.228–230.
- Scott Keogh, J., 2009. Evolutionary, behavioural and molecular ecology must meet to achieve long-term conservation goals. *Molecular Ecology*, 18(18), pp.3761–3762.
- King, T.L. & Julian, S.E., 2004. Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 Emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*, 5(5), pp.719–725.
- 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
- Vamberger, M., Stuckas, H. & Fritz, U., 2011. Fifteen microsatellite markers for the stripe-necked terrapin *Mauremys caspica* (Testudines: Geoemydidae) and cross-amplification tests in *M. rivulata*. *Conservation Genetics Resources*, 3(1), pp.87–89.
- Zenboudji, S. et al., 2016. Conservation of the endangered Mediterranean tortoise *Testudo hermanni hermanni*: The contribution of population genetics and historical demography. *Biological Conservation*, 195, pp.279–291.