Com identificar un llop i el seu origen a partir de femtes

El creixent interès per la conservació de la biodiversitat juntament amb els avenços en la biologia molecular van donar una nova disciplina cap als anys 90, la genètica de la conservació. Aquesta nova eina de conservació ens aporta una nova visió per gestionar les poblacions d'animals salvatges i avaluar-ne el risc d'extinció, mitjançant l'estudi de la diversitat gènica. La diversitat gènica d'una espècie és la suma de la variació genètica entre les seves diferents poblacions i dins de cada població. La variabilitat entre poblacions ens indica com són de diferents les poblacions entre elles, i la variabilitat dins de cada població ens mostra com són de diferents els individus d'una mateixa població. Per calcular la diversitat gènica podem fer-ho a partir de les proteïnes (el producte dels gens) o mirant directament la variabilitat a la seqüència del DNA o genoma (actualment més utilitzat).

El genoma es podria comparar a un llibre on hi ha tota la informació per crear un nou individu. Aquest "llibre" utilitza com a llenguatge un codi de quatre lletres (Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) i Guanina (G)) amb el qual representem els quatre tipus de molècules diferents (anomenades nucleòtids) que formen el filament del DNA. En tots els animals trobem dos tipus de DNA: el nuclear i el mitocondrial, aproximadament 8.000 vegades més petit que un cromosoma nuclear mig. Cada cèl·lula presenta dues còpies del DNA nuclear (una d'origen patern i l'altra matern), mentre que la majoria de cèl·lules presenten centenars o milers de còpies de DNA mitocondrial, totes d'origen matern. L'existència d'aquest gran nombre de còpies per cèl·lula fa que el DNA mitocondrial sigui molt utilitzat per a l'estudi de mostres no invasives, com femtes, pèl, o fins i tot saliva, de les quals s'obtenen poques cèl·lules. L'avantatge de treballar amb mostres no invasives és que no s'ha d'entrar en contacte directe amb l'animal, i s'eviten així les captures. Per tant, el DNA mitocondrial és ideal per a estudis amb espècies difícils de capturar i per eliminar les possibles conseqüències negatives d'una captura (estrès, anestèsia, lesions...) sobretot si es tracta d'espècies en perill d'extinció.

Per aquesta raó, quan en Josep M. López, tècnic del Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, ens va preguntar si al Servei Veterinari de Genètica Molecular (SVGM) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) podíem determinar si dues mostres de femtes eren de gos o de llop, vam decidir treballar amb la regió control del DNA mitocondrial. Estudis genètics, morfològics i de comportament han demostrat que el gos s'originà a partir de la domesticació del llop, fa entre uns 15.000 i 100.000 anys (Vila et al. 1997; Savolainen et al. 2002 i Leonard et al. 2002). Evolutivament, 15.000 anys són un període molt curt que no ha permès una gran diferenciació; de fet, el gos i el llop són dues espècies molt properes que es poden encreuar i produir descendència fèrtil. En voler diferenciar dues espècies molt properes necessitem una regió de DNA molt variable, que presenti una alta taxa d'evolució. La taxa d'evolució en l'àmbit nucleotídic és el nombre de canvis (substitucions o addicions/delecions) en la seqüència de DNA per unitat de temps. La taxa d'evolució del DNA mitocondrial és entre una i deu vegades més alta que la del DNA nuclear (Avise et al. 1987). Dins del DNA mitocondrial, la regió control és la que presenta una major taxa d'evolució i, per tant, la que presenta un major nombre de canvis (Aquadro i Greenberg 1983). Vilà et al. (1997), va utilitzar un fragment de 261 nucleòtids de la regió control, i va descriure 27 seqüències diferents (haplotips) en 162 llops de 27 poblacions diferents i 25 haplotips en 140 gossos de 67 races diferents. Només una seqüència de gos (D6) es va trobar també en alguns llops de Rússia i Romania (W6); totes les altres eren específiques de gos o de llop. Totes aquestes seqüències (Figura 1) es poden trobar a una base de dades de lliure accés, el *GenBank* www.ncbi.nlm.nih.gov/. Si a partir de les mostres de femtes d'origen desconegut (gos o llop) podíem extreure DNA mitocondrial i seqüenciar la mateixa regió, podríem comparar les nostres seqüències amb les ja descrites prèviament per determinar el seu origen, gos o llop.

En seqüenciar les dues mostres problema i comparar-les amb les 52 seqüències descrites prèviament, vam veure que una era

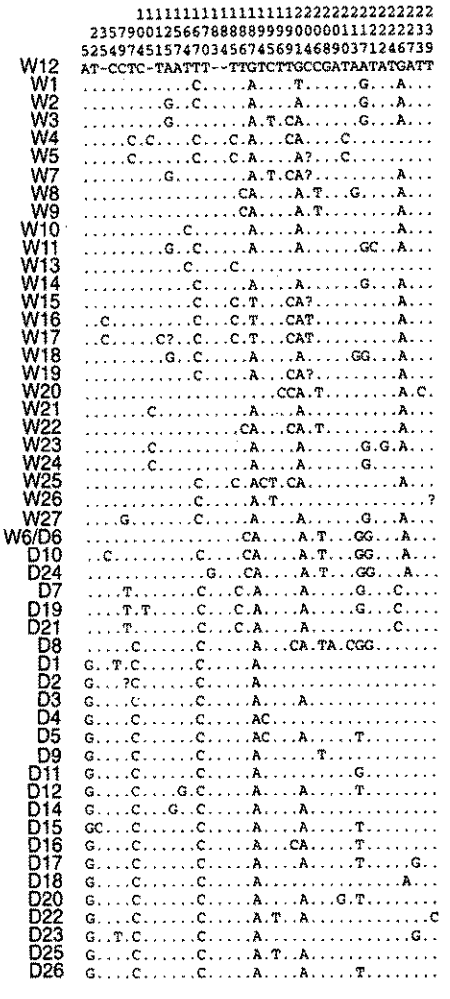


Figura 1. Alineament de les posicions variables del fragment de 261 nucleòtids de la regió control del DNA mitocondrial de llops i gossos. En aquesta figura (obtinguda de Vilà et al. 1997) podem observar les diferències entre les 27 seqüències diferents (haplotips) de la regió control del DNA mitocondrial descrites en llops (W) i les 25 trobades en gos (D). Els punts indiquen que una seqüència determinada comparteix el mateix nucleòtid amb la seqüència de referència (W12).

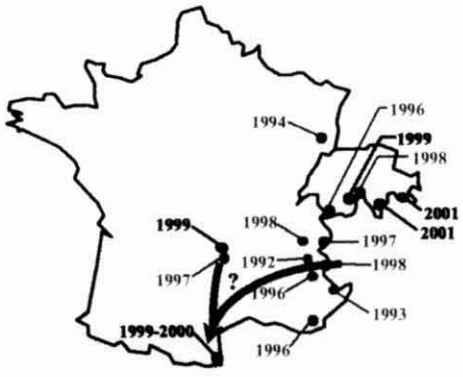


Figura 2. Seguiment genètic del llop a França i Suïssa entre els anys 1992 i 2001. Amb un punt negre marquem la primera detecció genètica d'un llop d'origen italià (tots presentaven la seqüència W4) en diferents regions de França i Suïssa. Les fletxes indiquen les possibles vies de colonització de l'àrea pirinenca (modificat de Valière *et al.* 2003).

```
                                  1   2   3   4   5   6
tctcacccttccgatcattaagtcTAAATAAATAAATAAATAAATAAA
  6   7   8   9  10
TAAATAAATAAATAAATAAAtgcaaattgcgatgactacgggattcgg
```

Figura 3. Microsatèl·lits. Seqüència d'un microsatèl·lit tetranucleòtid, on es repeteix el motiu format pels quatre nucleòtids TAAA 10 vegades. El fet que el nombre de repeticions que trobem en un mateix microsatèl·lit sigui molt variable fa que sigui un marcador genètic molt utilitzat en conservació.

idèntica a la D11 (seqüència trobada en diferents races de gos) mentre que l'altraa mostra va resultar ser idèntica a una seqüència de llop, la W4. Aquesta seqüència la mostraven únicament les poblacions de llop italianes i franceses, i és diferent a les quatre seqüències trobades en llops ibèrics. Entre els anys 1930 i 1960 el llop va desaparèixer d'Europa occidental a excepció de les penínsules Ibèrica, Itàlica, Balcànica i Escandinava a causa d'una forta persecució per part de l'home. A Itàlia es va arribar, als anys 70, a una població mínima d'uns 100 individus (Lucchini et al. 2004). Aquesta dràstica disminució i el fet que les poblacions italianes es van quedar aïllades van produir una pèrdua de la variabilitat genètica, fet que explicaria que tots els llops italians presentin la mateixa seqüència de DNA mitocondrial (W4). La conscienciació ambiental de finals dels anys 60 va provocar la protecció legal del llop, un augment de la recerca científica i la cobertura favorable dels mitjans de comunicació amb aquesta espècie. Això va permetre un augment general, tant a Europa com a Nord-Amèrica, de les poblacions de llop (Mech 1995). En el cas de les poblacions italianes es va estimar un augment anual del 7% des de 1973 fins a 1988 (Ciucci i Boitani 1991) i s'ha arribat a una població actual d'uns 600 llops (Lucchini et al. 2004). Aquest augment en el nombre d'individus també va portar un augment en la seva àrea de distribució, i es van recolonitzar els Alps italians, suïssos i francesos (Figura 2). La població actual de llops francesos, estimada en uns 40 individus i els llops suïssos, provenen de llops italians i per això comparteixen la mateixa

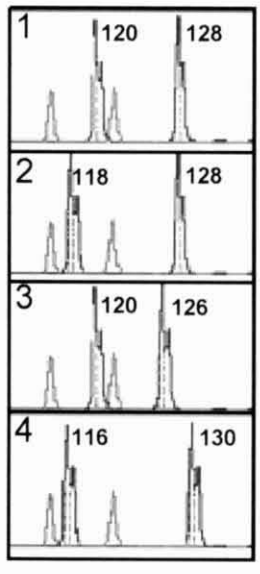


Figura 4. Genotipat de microsatèl·lits. Una vegada aïllades i marcades amb una molècula fluorescent, aquestes seqüències de DNA es fan córrer en un seqüenciador automàtic el qual en detecta el senyal i en calcula la mida del fragment a partir d'un patró conegut. El resultat és un pic en un gràfic anomenat 'electroferograma'. Com es pot observar en aquests electroferogrames, els 4 llops presenten un genotip diferent per al mateix microsatèl·lit.

seqüència W4, que no s'ha trobat en cap altra població de llop ni en cap gos (Valière et al. 2003).

Posteriorment al SVGM es van analitzar 16 mostres més, enviades pel Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, seguint el mateix protocol. Vuit d'aquestes mostres varen presentar la mateixa seqüència de llop W4, mentre que les altres vuit varen presentar seqüències de gos. Com que totes les mostres analitzades que tenien un origen de llop, fins al moment, presentaven la seqüència W4, varem poder determinar que els llops provenien de França i eren d'origen italià.

El fet, però, que les nou mostres que s'han identificat de llop presentin totes la mateixa seqüència de DNA mitocondrial, la W4, no ens permet discriminar si provenen d'un únic animal o no. Es per això que actualment al SVGM estem treballant per posar a punt un protocol d'identificació individual per DNA mitjançant 12 marcadors de tipus microsatèl·lit. Els microsatèl·lits són seqüències de DNA de 2 a 5 parells de bases repetides en tàndem que es troben als genomes de tots els organismes (Figura 3). Aquests marcadors nuclears són molt polimòrfics, o sigui, que presenten una gran variabilitat d'al·lels dins de cada població. Com que cada animal presenta únicament dos al·lels (un d'origen matern i un d'origen patern) i a la població hi ha diversos al·lels, podem trobar diferents combinacions entre els diferents individus (Figura 4). Si analitzem un nombre suficient de microsatèl·lits, la probabilitat que dos animals comparteixin tots els al·lels per a cadascun dels marcadors és pràcticament menyspreable, i es pot arribar a un codi d'identificació únic per a cada animal. Aquests 12 microsatèl·lits ja han estat utilitzats per identificar i certificar paternitats amb una probabilitat d'exclusió superior a 0.995 en gossos de diferents races (Altet et al. 2001) i en poblacions de llop ibèric (Ramírez 2005). Esperem poder mostrar aquests resultats en breu.

Bibliografia

Altet L, Francino O, Sánchez A (2001) Microsatellite polymorphism in closely related dogs. Journal of Heredity 92, 276-279.

Aquadro CF, Greenberg DB (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution; análisis of nucleotide séquense from seven individuals. Genetics, 103: 211-220.

Avise JC, Arnold J, Ball MB, Bermingham E. Lamb T, Neigel JE, Reb CA, Saunders NC (1987). Intraespecific phylogeography: the mitocondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Reviews Ecological Systematic, 18: 459-522.

Ciucci P, Boitani L (1991). Viability assessment of the Italian wolf and guidelines for the management of the wild and a captive population. Ric. Biol. Selvaggina 89: 1-58.

Leonard J, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillén S, Vilà C (2002). Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. Science 298: 1613-1616.

Lucchini V, Galov A, Randi E (2004) Evidence of genetic distinction and long term population decline in wolves (Canis lupus) in the Italian Apennines. Molecular Ecology 13, 523-536.

Mech LD (1995). The challenge and opportunity of recovering wolf populations. Conservation Biology 9:270-278.

Ramírez O, Altet L, Enseñat C, Vilà C, Sanchez A, Ruiz A (2005) Genetic assessment of the Iberian *wolf Canis lupus signatus* captive breeding program. Conservation Genetics, en premsa.

Savolainen P, Zhang Y, Luo J, Lundeberg J, Leither T (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. Science 298: 1610-1613.

Valière N, Fumagalli L, Gielly L, Miquel C, Lequette B, Poulle ML, Webwe JM, Arlettaz R, Taberlet P (2003). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. Animal Conservation 6: 83-92.

Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, *et al.* (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. Science, 276, 1687-1689

Oscar Ramírez Bellido
Biòleg del SVGM.