# Génétique : connaissances actuelles et réintroduction, relâcher d'individus erratiques, ...

Sylvain Ursenbacher<sup>1,2</sup> & Katherin Theissinger<sup>3</sup>

1 Universität Basel, Suisse 2 info fauna – karch, Suisse 3 University of Koblenz-Landau, Germany

### Phylogénétique et sous-espèces

Ha plocla de	Subspecies		
Ι	<i>E.o orbicularis</i> (+ <i>E.o. luteofusca</i> ) and E.o colchica		
II	E.o. orbicularis		
III	E. trinacris		
IV	E.o. hellenica		
V	E.o. galloitalica (E.o. galloitalica, E.o. lanzai, E.o. capolongoi)		
VĪ	E.o. occidentalis (E.o. occidentalis, E.o. hispanica, E.o. fritzjuergenobsti)		
VII	E.o. iberica and E.o. persica		
VIII	undescribed subspecies		
IX	one specimen from pet trade in Germany		
X	E.o. eiselti		

Lenk et al., 1999, Fritz et al., 2005, 2007, 2009



# différences mtDNA / nDNA

### *mtDNA*: ADN mitochondrial

- origine maternel seulement
- analyse par séquençage du cytochrome b
- comparaison avec une référence (p. ex: GenBank)
- grande répétabilité entre les laboratoires
- hybrides non détectés

### nDNA: ADN nucléaire

- origine maternel et paternel
- analyse par amplification de plusieurs marqueurs microsatellites (idem analyses de paternité)
- pas de base de données de comparaison (chaque étude est unique)
- lecture complexe et variable d'un laboratoire à l'autre, résultats difficilement transposables

Next Generation Sequecing (nDNA): pas encore apparue sur les cistudes grande couverture du génome, donc meilleure idée du niveau d'introgression/ hybridation; possiblement nouvelle espèces



**Fig. 4** Geographical distribution of 313 *Emys orbicularis* haplotypes. The numbers by the symbols indicate the frequencies of haplotypes per locality (symbols without numbers represent single specimens), symbols in boxes mark polymorphic populations, dashed circles denote inexact localities. Dashed lines mark the range partition according to hypothesis 4a used for AMOVA. The upper-left box indicates the haplotype symbols, the upper-right box shows the recent range of *E. orbicularis*. Apart from these 313 specimens data from another 110 specimens from localities of Spain: Menorca ( $V_{19}$ ), Mallorca ( $V_{12}$ , IIa<sub>8</sub>); Italy: Castel Porziano (IVa<sub>15</sub>,  $V_5$ ); France: Camargue (IIa), Lyon (IIa); Denmark, different localities (Ia<sub>6</sub>, Ib, IId); and Germany, different localities (Ia<sub>14</sub>, Ib, IIa<sub>10</sub>, IIIa, IIIb, IVa<sub>11</sub>,  $V_2$ , VIa) were obtained, but not usable for phylogeographical analyses (see Lenk *et al.* (1998)) and excluded.

LENK et al. (1998), Mitochondrial phylogeography of the European pond turtle, *Emys orbicularis* (Linnaeus 1758), Molecular Ecology



**Fig. 4** Left, sampling sites of subfossil *Emys orbicularis* used for ancient DNA haplotype determination (for details, see Table 1). Extant distribution of mitochondrial lineages and haplotypes of subfossil samples are colour coded; colours correspond to haplotype network on the right. Merging colours indicate hybrid zones; black bars, mountain barriers. Arrows indicate inferred Holocene colonization routes for mitochondrial lineages I and II. The other mitochondrial lineages occurring in the south of the distribution range did not contribute to the Holocene colonization of Central and northern Europe (Lenk *et al.* 1999; Fritz *et al.* 2007). Some lineages occur beyond the map sector. Right, median-joining network for haplotypes of extant European pond turtles (*E. orbicularis, E. trinacris*) based on data set from Fritz *et al.* (2007). Circle size is a rough approximation to haplotype frequency. Small black circles indicate missing node haplotypes. Each line joining haplotypes Ia, IIa, and IIb occurring in the north of the range of extant *E. orbicularis* indicated.

SOMMER et al. (2009) Unexpected early extinction of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) in Sweden and climatic impact on its Holocene range, Molecular Ecology

Fig. 1 Top: Geographical distribution of mitochondrial lineages of Emys orbicularis and E. trinacris (only native turtles considered). Cross symbol identifies E. trinacris lineage. A geographical distribution of *E. orbicularis* haplotypes in the Iberian Peninsula, southern France, the Balearic Islands and Morocco. **B** geographical distribution of E. orbicularis haplotypes in Austria, Denmark, Germany, Poland, Switzerland, southeastern France and northern Italy. Bottom: Additionally, for regions A and B records of wild-caught allochthonous turtles shown in boxes



VELO-ANTON et al. (2011) Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*), Conservation Genetics



Fig. 3 Genotypic structuring of 623 European and Sicilian pond turtles (*Emys orbicularis* and *E. trinacris*) from 50 pooled sampling sites for K = 3 using 15 microsatellite loci. For further explanation, see Fig. 2.

VAMBERGER et al. (2015) Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*), Conservation Genetics



Fig. 4 Maximum-likelihood clines of the *Emys orbicularis/E. trinacris* contact zone for microsatellites and mtDNA over the associated fuzzy cline region (95% credible cline region, grey) as returned by the function *bzar.plot.fzCline* in HZAR. Above the curves are percentages for cluster assignment or mitochondrial lineages (using pooled sampling sites). For colour-coding, see Figs 1 and 2.



Fig. 5 Maximum-likelihood clines and of the *E. o. galloitalica/E. o. hellenica* contact zone for microsatellites and mtDNA. For colour-coding, see Figs 1 and 3; for further explanation, see Fig. 4.

VAMBERGER et al. (2015) Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*), Conservation Genetics

Fig. 1 Geographic extent of the contact zone between Emys orbicularis subspecies in France and levels of introgression in each population. Limits of catchment basins are indicated with a continuous line. **a** Proportions of individuals belonging to each subspecies determined by mitochondrial DNA: E. o. orbicularis are represented in light grey, E. o. galloitalica in black, and E. o. hellenica in dark grey (cf. Table 1); **b** proportions of introgressed and nonintrogressed individuals determined by the STRUCTURE analyses based on nuclear DNA: 'pure' E. o. orbicularis are represented in light grey, 'pure' E. o. galloitalica in dark grey and admixed individuals in *black* (cf. Table 1)



RAEMY et al. (2017) Hybridisation between turtle subspecies: a case study with the European pond turtle (Emys orbicularis), Conservation Genetics



**Figure 1.** Location of sampled populations (open circles: 1, Porriño; 2, Ourense; 3, Madrid; 4, Valencia and 5, Doñana) and Recovery Centres (closed circles: 1, Oleiros; 2, GREFA; 3, CRARC and 4, Valencia) on a map of the distribution of *E. orbicularis* in the Iberian peninsula ( $10 \times 10$  UTM squares). Distribution data for Spain are from Pleguezuelos et al. (2002), and for Portugal are provisional data from the "Projecto Atlas de Anfíbios e Répteis de Portugal" from the "Instituto da Conservação da Natureza".

Figure 3. Estimated population structure (from K = 2 to K = 5). Black lines separate individuals of different populations which are labeled bellow the figure, with regional affiliations above it. Individuals from three Recovery Centres are represented to show the high diversity of their location origin. Each individual is represented by a thin vertical line, which is partitioned into K colored segments that represent the individual's estimated membership fractions in K clusters.

VELON-ANTON et al. (2007) Assignment tests applied to relocate individuals of unknown origin in a threatened species, the European pond turtle (*Emys orbicularis*), Amphibia-Reptilia

### Génétique et conservation / réintroduction

- Phylogénétique: connaissance des populations "historiques"
- réintroduction de populations "proche des populations historiques"
- Connaissance de la génétique d'une population: assignement d'un individu erratique
- Impact de la génétique sur la survie Ducotterd et al. (in prep): population introduction à Genève

mtDNA	Ν	suvie	min-max
E. o. orbicularis	13	1.000	0.999-1.000
E. o. hellenica	179	0.923	0.691-1.000
E. o. galloitalica	17	0.891	0.474-1.000

• Statut groupe génétique/sous-espèces/espèce: peu changer...

## échantillonnage

- extraction d'ADN à partir
  - prise de sang
    - au niveau de la queue (le moins dangereux)
    - au niveau de la patte (ou jugulaire)
    - au niveau du sinus veineux
    - à faire en même temps que la pose d'un microchip
  - frottis buccal
    - attention: bien frotter sous la langue (min 10-15 secondes)
    - conservation pas optimale
  - (griffes)
    - difficulté à extraire l'ADN (faible quantité)



#### Abb. 30.21:

Blutentnahme aus der rechten V. jugularis einer Süßwasserschildkröte. Der Hals wird vollständig gestreckt und die Kanüle von kranial nach kaudal in die Vene eingeführt.



#### Abb. 30.22: Blutentnahme aus dem subkarapakialen Venensinus bei einer Süßwasserschildkröte.



#### Abb. 30.23:

Blutentnahme aus der V. cephalica. Das Vorderbein wird gestreckt und die Kanüle auf Höhe des Ellbogens in proximaler Richtung eingestochen. Der Kopf der Schildkröte liegt auf diesem Bild rechts.



#### Protocole de prélèvements d'ADN sur des Cistudes d'Europe (Emys orbicularis L. 1758)

Les analyses génétiques, portant sur l'ADN mitochondrial (détermination de l'haplotype) et sur l'ADN nucléaire (détermination du statut hybride des individus) peuvent être réalisées à partir de plusieurs types d'échantillons:

#### 1. griffes

- 2. frottis buccal
- 3. prise de sang
- 4. frottis cloacal

Actuellement, nous sommes capable d'analyser les 3 premiers types d'échantillons, le frottis cloacal n'ayant pas été testé dans nos laboratoires. Vous trouverez ci-dessous les protocoles de prélèvements détaillés pour chacun des types d'échantillons. Nous pouvons vous mettre à disposition gratuitement le matériel pour effectuer les prélèvements (tube étanche, produits de conservation, écouvillons, seringues, ...), n'hésitez pas à nous contacter pour l'envoi du matériel nécessaire (s.ursenbacher@unibas.ch) ou pour tout renseignement concernant les techniques de prélèvements.

- ariffes
- 1. Coupez la griffe à mi-longueur et placez-la dans un tube fermé hermétiquement.
- 2. Si la griffe est envoyée dans les 2 jours suivant le prélèvement, il n'est pas nécessaire de lui ajouter un moyen de conservation. Si la griffe est envoyée après ce délai, il est préférable de lui ajouter de l'alcool non-dénaturé (sans cétone) à 75-100%.
- 3. Il est très important de bien **désinfecter les ciseaux** ayant servi à couper la griffe entre chaque prélèvement, afin d'éviter toute contamination entre les individus. Pour ce faire, nettoyez les lames à l'alcool et brûlez soigneusement les lames pendant 10 secondes sur une flamme de bougie ou d'un briguet.

L'utilisation de griffes permet d'obtenir facilement de l'ADN mais sa qualité est aléatoire. De plus, il est primordial de respecter scrupuleusement le protocole cidessus afin d'éviter toute contamination entre les individus. Cette méthode peut sembler rapide et facile, mais il nécessite un strict

respect de la procédure; c'est pourquoi il peut être préférable de réaliser un frottis buccal.

- frottis buccal
- 1. Ouvrez la bouche de l'animal et tournez l'écouvillon sous sa langue pendant minimum 15 secondes. Il est également possible d'utiliser des cotons tiges non-stériles (à acheter au supermarché) à placer individuellement dans un tube.

Pour le prélèvement, tenez fermement l'animal, maintenez sa tête hors de la carapace, pressez la jugulaire entre le pouce et l'indexe jusqu'à ce que la



cistude ouvre sa mâchoire (voir photos). Cette méthode peut sembler brutale mais elle est très rapide (cette méthode est également utilisée lors de la vermifugation des tortues), mais permet de limiter le temps de manipulation et ainsi limite le stress pour l'individu (le stress étant plus lié au temps de manipulation qu'au type de manipulation).



1. La prise de sang peut être réalisée au niveau de la veine iugulaire, de la veine caudale ou dans le sinus veineux.

Un volume de 50-100 µl (0.05-0.1 ml) est suffisant pour réaliser les analyses. Il faut au préalable bien désinfecter l'endroit où l'aiguille sera plantée.

2. Placez le volume de sang dans la solution tampon et mélangez le tout.

#### Remarques générales:

sèche complètement.

prise de sang

(vétérinaire, ...)

- 1. Il est primordial de bien noter le numéro de l'individu sur le tube et de marquer l'animal individuellement, soit par coupe d'écailles, soit par implantation d'un microchip/transpondeur passif. La reconnaissance individuelle peut aussi se faire par photo de la tête et du plastron, pour autant que le nombre d'animaux à reconnaître soit limité.
- 2. Les délais et les coûts des analyses dépendent du projet dans leguel l'animal est analysé, du type d'analyses effectuées (détermination de l'haplotype et/ou du statut hybride de l'individu) et du personnel à disposition pour effectuer les analyses. Vous pouvez nous contacter à l'adresse ci-dessous pour toute éventuelle auestion.
- 3. Un envoi par courrier postal normal est suffisant. Pour les envois depuis l'étranger, mentionner une valeur de CHF 0.- et la présence de "matériel scientifique".

#### adresse d'envoi:

Sylvain Ursenbacher	ou	Sylvain Ursenbacher
NLU, Universität Basel		karch
St. Johanns-Vorstadt 10		Passage Maximilien-de-Meuron 6
CH-4056 Basel		CH-2000 Neuchâtel
(Switzerland)		(Switzerland)

version 0.4 - 18 mars 2015 10:51