

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN LA POBLACIÓN DE NUTRIA EURASIÁTICA (*Lutra lutra*) REINTRODUCIDA EN EL **PARC NATURAL DELS AIGUAMOLLS DE L'EMPORDÀ** Y COMPARACIÓN CARIOTÍPICA CON OTROS MUSTÉLIDOS

G. GARRABOU¹, I. ROIG¹, D. SAAVEDRA², J. FERNÁNDEZ-MORAN³ Y M. PONSÀ¹

1. Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Univ. Autònoma Barcelona. 08193 Cerdanyola del Vallés (Barcelona). (gloria.garrabou@menta.net), (ignasi.roig@uab.es), (montse.ponsa@uab.es)

2. Fundació Territori i Paisatge. Barcelona (dsaavedra@airtel.net)

3. Parc Zoològic Barcelona, Parc de la Ciutadella. 08003 Barcelona. (fernandez@mail.cinet.es)

RESUMEN

En el seno del "Projecte Llúdriga" (Proyecto Nutria) se han reintroducido 41 ejemplares de nutria eurasiática *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) en el "Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà" (Girona, España) procedentes de distintas poblaciones de la Península Ibérica: Asturias (5), Extremadura (25), Portugal (10) y Pirineo de Lleida (1). En el presente trabajo se muestran los resultados del análisis citogenético practicado a 16 individuos de esta población, del estudio cualitativo de la heterocromatina y de la comparación del cariotipo de esta especie con el de otros mustélidos. El análisis citogenético de los fundadores no ha revelado la presencia de ninguna anomalía numérico-estructural ni de diferencias inter o intrapoblacionales en las bandas G. Su heterocromatina es escasa y se localiza en todos los centrómeros, hay heterocromatina p terminal en los pares 6, 8, 9 y 10 y constituyendo íntegramente el brazo p en los cromosomas acrocéntricos 11, 13 y 14. Los polimorfismos heterocromáticos de bandas C, no son asignables a las distintas poblaciones de origen de los ejemplares. La heterocromatina se comporta de manera uniforme en todos los cromosomas de los distintos individuos y poblaciones analizados siendo: AluI sensible, EcoRI y RsaI resistente, DA/DAPI negativa y Quinacrina positiva (con patrón de bandeo similar al G). La comparación cariotípica de *Lutra lutra* frente a otros mustélidos (*Eira barbara* Linnaeus, 1758; *Galicitis vittata* Schreber, 1776; *Melogale* sp. Geoffroy-Saint-Hilaire, 1831; *Mellivora capensis* Scherber, 1776 y *Lontra longicaudis longicaudis* Olfers, 1818) revela un elevado grado de homología a nivel de número cromosómico y de patrón de bandas G, mientras que el patrón de bandas C está menos conservado.

Palabras clave: Citogenética, heterocromatina, *Lutra lutra*, Mustelidae, Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà, patrones de bandas.

ABSTRACT

Cytogenetic studies in a population of Lutra lutra reintroduced in the "Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà (Girona, Spain)" and karyotypic comparison with other Mustelidae species

The Eurasian Otter Project has reintroduced 41 specimens of *Lutra lutra* in the "Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà" (Girona, Spain), from different Iberian populations: Asturias (5), Extremadura (25), Portugal (10) and Pirineo de Lleida (1). This paper shows the results of: a) the cytogenetic analysis of 16 of these reintroduced animals, b) a qualitative study of the heterochromatin, and c) the karyotype comparison of this species with other Mustelidae species. No numerical or structural chromosomal

anomalies and no G-band pattern differences among specimens or populations studied have been detected in the reintroduced animals. Heterochromatin polymorphisms have been found in C-banding patterns. These polymorphisms are not related to the animal geographic origin. Eurasian otter presents heterochromatin in the centromere in all chromosome pairs, at the terminal p arms in pairs 6, 8, 9 and 10 and in the p arms of the acrocentric chromosomes 11, 13 and 14. Heterochromatin behaviour after restriction enzymes digestion and fluorochromes staining is uniform in all the chromosomes of the distinct animals and populations analysed, being: AluI sensitive, EcoRI and RsaI resistant, DA/DAPI negative and Quinacrine positive (with a banding pattern similar to G-banding). *Lutra lutra* karyotypic comparison with other Mustelidae species (*Eira barbara*, *Galictis vittata*, *Melogale* sp., *Mellivora capensis* and *Lontra longicaudis longicaudis*) shows high homology in chromosome number and G-banding patterns, some differences are observed in the C-banding patterns.

Keywords: Aiguamolls de l'Empordà Natural Parc, banding patterns, cytogenetics, heterochromatin, *Lutra lutra*, Mustelidae.

INTRODUCCIÓN

La nutria eurasiática ha sido catalogada en su distribución global como *Especie Vulnerable* (VUA2cde) según la *Lista Roja de Especies Amenazadas* de la IUCN (Hilton-Taylor 2000), incluida en el Apéndice I de CITES del mismo año y declarada como *Especie Protegida* según el decreto ley 3/1988, se extinguió en el *Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà* en los años 80 (Saavedra y Sargatal 1997). En 1995 comienza una campaña de reintroducción titulada *Projecte Llúdriga* que en la actualidad ha liberado 41 individuos en la zona (16 machos y 25 hembras) procedentes de distintas poblaciones de la Península Ibérica.

Las evidencias fenotípicas indican que las distintas poblaciones de nutria eurasiática de la Península Ibérica pertenecen a la misma especie (Ruiz-Olmo y Delibes 1998). El objetivo de este estudio es caracterizar citogenéticamente la población fundadora, determinar si existen anomalías cromosómicas en los ejemplares reintroducidos y si existen diferencias interpoblacionales que pudieran afectar la viabilidad o el valor ecológico de la población reintroducida. Para ello se ha analizado las características citogenéticas de 16 individuos de la población fundadora, en representantes de ambos sexos y de las distintas poblaciones de procedencia de los animales reintroducidos, se ha analizado la variabilidad intra e interpoblacional, y se han realizado estudios cualitativos y de polimorfismos en la heterocromatina. Por otro lado se ha analizado las homologías cariotípicas que comparten la nutria eurasiática y otras especies de la familia Mustelidae.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las preparaciones cromosómicas se han obtenido mediante el cultivo de linfocitos de sangre periférica heparinizada, extraída en el Parque Zoológico de

Barcelona, usando el medio y condiciones estándar de cultivo, y phytohemaglutinina como estimulador mitótico. Se ha procesado muestras de 16 animales (procedentes de las campañas de captura realizadas en 1998 y 2000), estando representados ambos sexos y los distintos orígenes geográficos presentes en la población reintroducida, (Fernández-Morán et al. 2002) (Tabla 1).

TABLA 1
Nombre, sexo y procedencia geográfica de los 16 ejemplares estudiados
Name, sex and geographic origin of the 16 animals studied

Nombre	Sexo	Población
Mosquit	Macho	Extremadura
Esva	Hembra	Asturias
Xana	Hembra	Asturias
Rati	Hembra	Asturias
Berna	Hembra	Asturias
Petit	Macho	Portugal
Pinto	Macho	Portugal
Nano	Macho	Portugal
Teresa	Hembra	Portugal
Keta	Hembra	Portugal
Ribeira	Hembra	Portugal
Lauda	Hembra	Portugal
Fera	Hembra	Portugal
Garelo	Macho	Portugal
Julia	Hembra	Portugal
Carlitos	Macho	Portugal

La caracterización citogenética de los 16 ejemplares analizados se ha realizado aplicando tinciones secuenciales U-G-C (Uniforme, bandas G (Seabright 1971) y bandas C (Sumner 1972) (Figura 1). La tinción secuencial de la misma metafase con las diferentes técnicas permite identificar perfectamente cada par cromosómico. Los cariotipos se han ordenado siguiendo el modelo propuesto para *Lontra longicaudis longicaudis* por de Freitas et al. (1982).

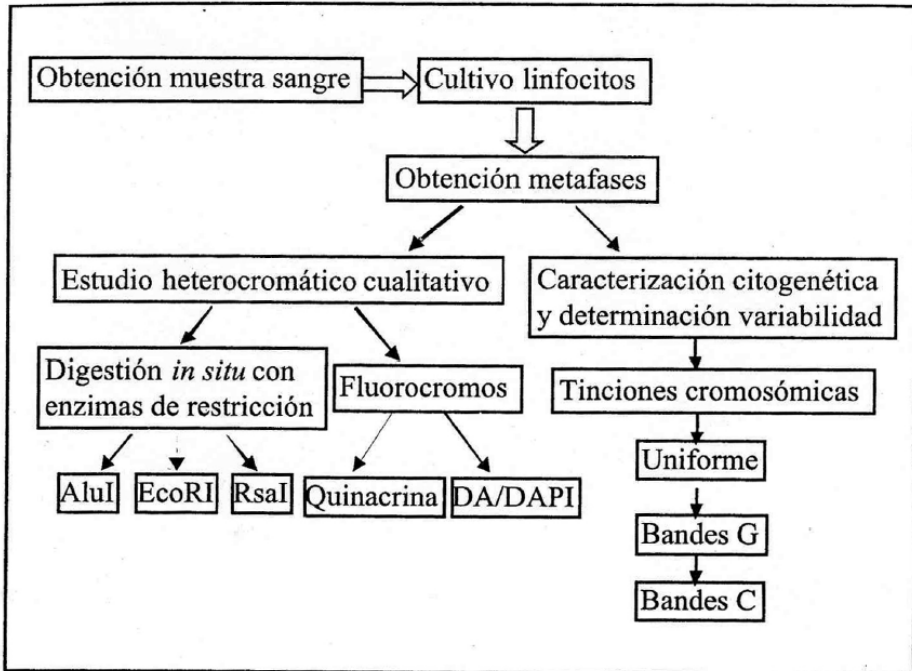


Figura 1. Metodología utilizada en el estudio citogenético para la caracterización de los ejemplares y para el estudio cualitativo de la heterocromatina

Methodology used in the cytogenetic study to characterise the specimens and for the heterochromatin qualitative study

La determinación de la variabilidad intra e interpoblacional se ha realizado comparando los patrones de bandas G y C entre los individuos procedentes de una misma población y entre las distintas poblaciones.

La identificación de las homologías cariotípicas interespecíficas entre la nutria eurasiática y las otras cinco especies de mustélidos (*Eira barbara*, *Galictis vittata*, *Melogale* sp., *Mellivora capensis* y *Lontra longicaudis longicaudis*) se ha llevado a cabo analizando los cromosomas con bandeado G en los trabajos publicados.

El estudio cualitativo de la heterocromatina se ha realizado mediante tinción con fluorocromos (Quinacrina y DA/DAPI) y digestión *in situ* con enzimas de restricción (EcoRI, AluI y RsaI) siguiendo el protocolo establecido en García et al. (1999). (Figura 1)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización citogenética de *L. lutra* con tinción uniforme (U) (Figura 2).

Todos los individuos analizados presentan $2n=38$ cromosomas, organizados morfológicamente en dos grupos ordenados según tendencia decreciente de tamaño; el primer grupo incluye 5 pares de cromosomas metacéntricos (1-5), el segundo grupo 13 pares de submetacéntricos y acrocéntricos (6-18), y el par de cromosomas sexuales; el X es submetacéntrico y de tamaño medio y el Y es metacéntrico y el de menor tamaño del cariotipo. No existen variaciones numéricas ni estructurales en los individuos de la población estudiada.

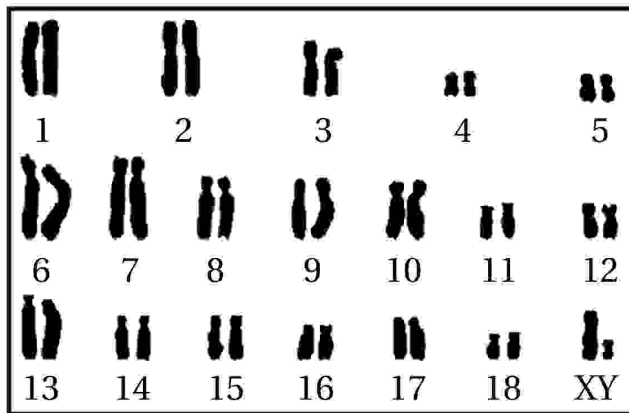


Figura 2. Cariotipo de un macho de nutria eurasiática *Lutra lutra* con tinción uniforme
Giemsa stained karyotype of an eurasian male otter (Lutra lutra)

2. Caracterización citogenética de *L. lutra* con la tinción de bandas G (Figura 3).

Todos los individuos estudiados presentan idéntico patrón de bandas G, de manera que no existen reorganizaciones cromosómicas que pudieran dificultar el apareamiento meiótico de los cromosomas homólogos, disminuir la fertilidad y/o comprometer la viabilidad de los descendientes en la población reintroducida.

3. Caracterización citogenética de *L. lutra* con tinción de bandas C (Figura 4).

Se ha encontrado variabilidad en la cantidad y presencia de la heterocromatina entre los diferentes individuos, pero no existe ningún polimorfismo asignable a ninguna población de origen específica. La heterocromatina es escasa en el cariotipo de *L. lutra*, como en el resto de Carnívoros (Pathak y Wurster-Hill 1977). Se localiza en todos los centrómeros, en posición terminal en los pares 6, 8, 9 y 10, y constituyendo

íntegramente el brazo p en los cromosomas acrocéntricos con satélites (pares 11 y 14) y en el mayor de los cromosomas acrocéntricos (par 13).

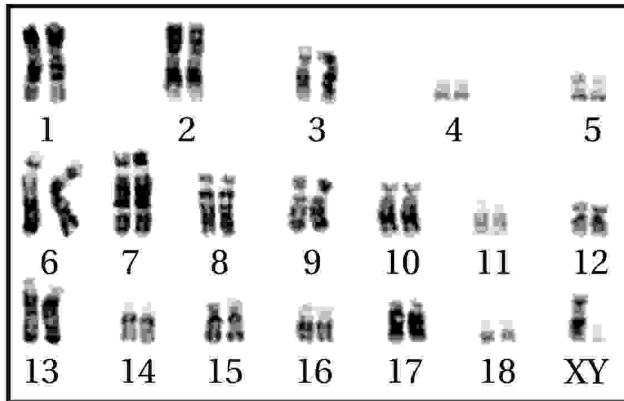


Figura 3. Cariotipo de un macho de nutria eurasiática (*Lutra lutra*) con tinción de bandas G
G-banded karyotype of an eurasian male otter (Lutra lutra)

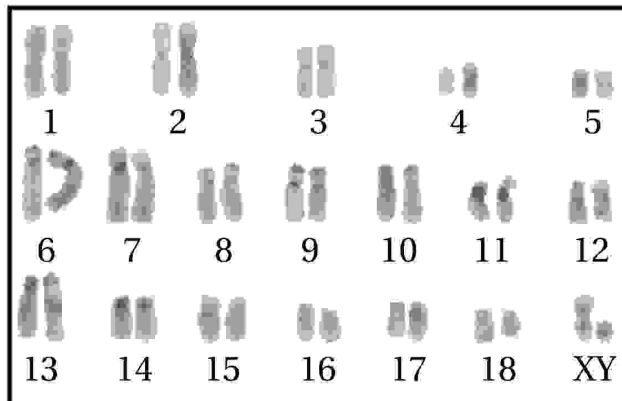


Figura 4. Cariotipo de un macho de nutria eurasiática (*Lutra lutra*) con tinción de bandas C+.
Obsérvese las bandas C+ no centroméricas en los pares 6,8,9,10,11,13 y 14

C-banded karyotype of an eurasian male otter (Lutra lutra). See non centromeric C+ bands in 6,8,9,10,11,13 and 14 chromosome pairs

Los polimorfismos observados corresponden a variaciones del tamaño de la banda C+ centromérica en los pares 1,2,4,6,7,8,10,12,15,16,17,18 y X; variaciones en la cantidad de heterocromatina en los brazos p de los pares 11,13 y 14; y variaciones en el tamaño de las bandas terminales en los pares cromosómicos 6,8,9 y 10.

Las técnicas empleadas para la caracterización cualitativa de la heterocromatina de *L. lutra* muestran una respuesta homogénea que contrasta con la variabilidad observada en otros grupos taxonómicos (García et al. 2003). Presenta el mismo patrón de comportamiento para todas las bandas C positivas. Respecto a la actuación de enzimas de restricción, la heterocromatina de los individuos de *L. lutra* analizados es sensible a la digestión con AluI, resistente a la acción enzimática de EcoRI y RsaI, y en relación a la tinción con fluorocromos es DA/DAPI negativa y Quinacrina positiva con un bandeo similar al bandeo G. La uniformidad en el patrón de comportamiento de la heterocromatina en *L. lutra* parece indicar un único origen evolutivo para la heterocromatina de esta especie.

Se ha comparado el cariotipo de *L. lutra* con el de otras especies de mustélidos (*Eira barbara*, *Galicitis vittata*, *Melogale* sp., *Mellivora capensis* y *Lontra longicaudis longicaudis*). En la Tabla 2 se resumen las homologías y las reorganizaciones encontradas para cada uno de los 19 pares de cromosomas de nutria eurasiática. La nomenclatura cromosómica utilizada corresponde a la de los cariotipos publicados para las demás especies de mustélidos (Wurster-Hill y Centerwall 1982 y de Freitas et al. 1982).

Cabe destacar el elevado grado de homología cariotípica observado entre las especies de esta familia tanto en el número cromosómico como en el patrón de bandas G. El número cromosómico es $2n=38$ para todas las especies estudiadas excepto para *Mellivora capensis*, que presenta un número diploide de cromosomas $2n=40$. El patrón de bandas G es distinto y característico para cada especie. Hemos hecho una estimación del grado de homología cariotípica calculando el porcentaje del número de brazos cromosómicos para los que se ha encontrado homología en el cariotipo de la especie de referencia con respecto al número total de brazos cromosómicos del cariotipo. Así se han podido ordenar en sentido decreciente de similitud cariotípica las 5 especies de la familia con respecto a la nutria eurasiática: *Eira barbara* con homología total entre los cariotipos de las dos especies (100%), *Galicitis vittata*, con homología del 80% de los brazos cromosómicos de *Lutra lutra*, *Melogale* sp. con el 70% de homología, *Mellivora capensis* con el 60% y *Lontra longicaudis longicaudis* con el 35%.

La respuesta homogénea de la heterocromatina a los diferentes tratamientos con fluorocromos y enzimas de restricción, junto con la poca variabilidad cromosómica en el grupo de los mustélidos, indicaría que los cambios cariológicos han tenido muy poco papel en la especiación de este grupo (García et al. 2003).

TABLA 2

Homologías cromosómicas y reorganizaciones detectadas al comparar el cariotipo con bandeado G de *Lutra lutra* con los de otras cinco especies de la familia Mustelidae: *Eira barbara*, *Galicitis vittata*, *Melogale* sp., *Mellivora capensis* y *Lontra longicaudis longicaudis*. La nomenclatura de los cromosomas corresponde a la utilizada por (*) Wurster-Hill and Centerwall (1982), (**) de Freitas et al. (1982). inv.= inversión, del.= deleción, p= brazo pequeño del cromosoma, q= brazo mayor del cromosoma, term.= localización terminal

Chromosomal homologies and rearrangements detected when comparing Lutra lutra G banded karyotype with Eira barbara, Galicitis vittata, Melogale sp., Mellivora capensis y Lontra longicaudis longicaudis karyotypes. Nomenclature of chromosomes corresponds to () Wurster-Hill and Centerwall (1982), (**) de Freitas et al. (1982). inv.= inversion, del.= deletion, p= short chromosome arm, q= long chromosome arm, term.= terminal*

2n=38	2n=38	2n=38	2n=38	2n=40	2n=38
<i>Lutra lutra</i>	<i>Eira barbara</i> *	<i>Galicitis vittata</i> *	<i>Melogale</i> sp.*	<i>Mellivora capensis</i> *	<i>Lontra longicaudis longicaudis</i> **
1	22	22	22	22	
2	25inv.	C1inv.	25inv.	25inv.	1
3	109	A3		119	
4	116		112		
5	59	E4	113	E3	
6	20	20	A1	6q=20	3
7	21	21	7q=21	21inv.	2
8	35	35del.p.term	35	35	5
9	111	B3	108	111	6
10	110	65	110	110	
11	D3				
12	D4	D4			
13	62	62	106p	120	4
14	115				
15	D1	D1	15q=D1		
16	117	D3	D3		
17	64	64	64	64	
18	E2		114		
XY	XY	XY	XY	XY	XY
%Homología	100	80	70	60	35

CONCLUSIONES

El número ($2n=38$) y la morfología cromosómica son constantes para todos los individuos y poblaciones de la especie en estudio. No se ha encontrado ninguna anomalía numérica ni estructural en los individuos fundadores analizados.

El patrón de bandas G es constante para todos los individuos de las distintas poblaciones de origen. Todos los individuos analizados son normales, no se ha detectado ninguna reorganización cromosómica que pueda disminuir la viabilidad de la descendencia ni la eficacia de los individuos de la población reintroducida.

Se ha observado variabilidad en cuanto a posición y cantidad de heterocromatina. Los polimorfismos observados no pueden relacionarse con una u otra de las poblaciones de procedencia de los individuos. Se trata de una variabilidad intraespecífica que no permite diferenciar poblaciones.

El comportamiento de la heterocromatina frente a enzimas de restricción y fluorocromos es uniforme en los distintos cromosomas, individuos y poblaciones, siendo: sensible a la digestión con AluI, resistente a la acción enzimática de EcoRI y RsaI, DA/DAPI negativa y Quinacrina positiva. Ello parece indicar un origen evolutivo común para toda la heterocromatina.

Existe un elevado grado de homología, entre los cariotipos de las seis especies de mustélidos analizados, en cuanto a número cromosómico y patrón de bandas G. *L. lutra* y *Eira barbara* presentan idéntico cariotipo. Esto parece indicar que los cambios cromosómicos no han contribuido de forma importante en la especiación del grupo taxonómico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al Parque Zoológico de Barcelona su colaboración en la obtención y el suministro de las muestras y a la *Fundació Territori i Paisatge* de Barcelona la financiación del proyecto.

REFERENCIAS

- FREITAS, T. R. O. DE, M. S. MATTEVI Y L. F. B. OLIVEIRA (1982). Karyotype characterisation of Lontra *Lutra longicaudis longicaudis*. *Mam. Chrom. Newslett.*, 23 (3): 91-96.
- FERNÁNDEZ-MORÁN, J., D. SAAVEDRA Y X. MANTECA-VILANOVA (2002). Reintroduction of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in northeastern Spain: trapping, handling and medical management. *J. Zool. Wildl. Med.*, 33 (3): 222-227.
- GARCÍA, F., C. NOGUÉS, M. GARCIA, J. EGOZCUE Y M. PONSÀ (1999). Characterisation of constitutive heterochromatin in *Cebus apella* (F. Cebidae, Primates) and *Pan troglodytes* (F. Hominidae, Primates). Comparison with human chromosomes. *Am. J. Primatol.*, 49: 205-221.

- GARCÍA, F., M. GARCIA, L. MORA, L. ALARCÓN, J. EGOZCUE Y M. PONSÀ (2003). Qualitative analysis of constitutive heterochromatin and primate evolution. *Biol. J. Linn. Soc.*, 79.
- HITON-TAYLOR, C. (Compiler) (2000). *2000 IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 61pp.
- PATHAK, S. Y D. H. WURSTER-HILL (1977). Distribution of constitutive heterochromatin in carnivores. *Cytogenet. Cell Genet.*, 18: 245-254.
- RUIZ-OLMO, J. Y M. DELIBES (1998). *La nutria en España ante el horizonte del año 2000*. SECEM. Malaga. 300 pp.
- SAAVEDRA, D. Y J. SARGATAL (1997). Reintroduction of the otter (*Lutra lutra*) in the Northeast of Spain (Girona province). *Galemys*, 10 (NE): 191-199.
- SEABRIGHT, M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet II*, (7731): 971-972.
- SUMNER, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75 (1): 304-306.
- WURSTER-HILL, D. H. Y W. R. CENTERWALL (1982). The interrelationship of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena and felids. *Cytogenet. Cell Genet.*, 34: 178-192.