

DETECCIÓN DE INTROGRESIÓN DE GENES DE PERDIZ CHUKAR (*Alectoris chukar*) EN POBLACIONES SILVESTRES DE PERDIZ ROJA (*A. rufa*) DE LA PROVINCIA DE ÁLAVA

García, C.B., Bonafonte, J.I., Gálvez, A., Martínez-Sañudo, M.J., Graus, J. y Arruga, M.V. ¹

¹Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet, 177. 50013. Zaragoza (Spain). mvarruga@unizar.es

INTRODUCCIÓN.

La escasez de perdiz roja (*Alectoris rufa*) en los campos, debida principalmente a causas como la progresiva destrucción de su hábitat natural o una elevada presión de sus predadores antrópicos y silvestres, hizo necesario el desarrollo de granjas cinegéticas para criar esta especie. La perdiz roja en pureza es una especie que no se adapta bien a la cría en cautividad. Algunos criadores de perdiz comenzaron a hibridar la perdiz roja con otra especie de perdiz del mismo género, perdiz chukar (*A. chukar*), que se adapta mejor a la cría en cautividad y tiene mejores índices productivos. Un ejemplar híbrido entre ambas especies además de ser más productivo (Nadal, 1992), es fértil y, tras retrocruzamientos sucesivos con perdiz roja, su aspecto fenotípico es prácticamente indiferenciable del de una perdiz roja en pureza. La suelta en el campo y las repoblaciones con estos ejemplares híbridos tienen como resultado la introgresión de genes de perdiz chukar en la perdiz roja silvestre. Además, los cazadores reconocen que el comportamiento de estas perdices híbridas en el campo es distinto del de la perdiz roja, una de las razones por las que esta especie es tan apreciada en la caza menor. La legislación española, Ley 4/89 de Conservación de los espacios naturales y de la flora y fauna silvestre, así como la legislación europea, 79/409/EEC conocida como Directiva Aves, no permiten la introducción de especies foráneas que puedan contaminar el patrimonio genético de especies autóctonas, como es la perdiz roja.

Para la detección de ejemplares híbridos de perdiz roja y perdiz chukar se emplearon diferentes metodologías genéticas. Por una parte se analizó uno de los genes del DNA mitocondrial (Randi, 1996), y por otra se estudiaron diversos genes del DNA nuclear mediante el análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), metodología descrita por Williams *et al.* en 1990, y la búsqueda de polimorfismos de una única base nucleotídica (SNP), que es una metodología más apropiada para la diferenciación de especies que los microsatélites (Awise, 1994). La metodología RAPD ya ha sido empleada en estas especies para diferenciarlas e incluso para detectar sus híbridos (García y Arruga, 2005, Barbanera *et al.*, 2005), pero la identificación de híbridos mediante la caracterización de SNPs sólo ha sido desarrollada por el Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular de Zaragoza (García *et al.*, 2007). En las caracterizaciones de SNPs se emplea tanto el análisis por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Reilly y Thomas, 1980) como la discriminación alélica por PCR a tiempo real o RT-PCR (Johnson *et al.*, 2004). La complementariedad de los distintos marcadores genéticos permite una mayor potencia en la detección de ejemplares híbridos que la conseguida con cada una de las metodologías por separado. La aplicación de este tipo de análisis en el estudio de perdices silvestres de diferentes cotos de la provincia de Álava, permite estimar el estado genético de la perdiz roja en esta región. Con los resultados genéticos obtenidos en el muestreo se dispone de información necesaria para los planes de gestión de la especie.

MATERIAL Y MÉTODOS.

La Asociación de Cotos de Caza de Álava suministró las muestras de 54 perdices capturadas en 16 cotos de cuatro unidades de gestión para la caza menor de esa región (figura 1). Las muestras consistieron principalmente en plumas. Para el contraste de los resultados se emplearon 42 muestras de perdiz roja, procedentes de museos y colecciones privadas, 315 muestras de perdiz chukar de diferentes orígenes (Chipre, Grecia, Argentina y España) e híbridos F1 (*A. rufa* x *A. chukar*).

En la extracción de DNA se empleó el kit DNeasy Tissue (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El procedimiento de análisis de las muestras de perdiz consistió en la aplicación de las diferentes metodologías recogidas en la patente EP 1 865 069 A1, junto con otras que están en proceso de ser patentadas. El conjunto de metodologías abarca el análisis de DNA mitocondrial, varios RAPDs y la caracterización de diversos SNPs. El análisis de DNA mitocondrial consiste en la amplificación del fragmento de un gen mitocondrial y su posterior digestión con una enzima de restricción, tratándose por tanto de un RFLP. La enzima de restricción únicamente encuentra su secuencia específica de restricción en perdices chukar e híbridos de perdiz roja con chukar y se visualizan los resultados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los análisis tipo RAPD consisten en la amplificación de fragmentos al azar con cebadores de poca longitud y en unas condiciones inespecíficas de amplificación. La optimización con esta metodología permite que en la visualización de los productos de PCR, en geles de agarosa, se observen diferentes patrones de bandas, estables para las especies de perdiz y que contienen alguna banda diagnóstica diferente entre las especies. Los SNPs se analizaron con dos metodologías: amplificación de los genes y digestión con enzimas de restricción (RFLP) o discriminación alélica con sondas marcadas con fluorocromos diferentes para las secuencias de las dos especies (RT-PCR). La visualización de resultados de RT-PCR se hace directamente en la pantalla del ordenador conectado al termociclador a tiempo real sin necesidad de posterior manipulación de los productos de PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las diferentes metodologías demostraron ser efectivas en la detección de híbridos. Todas ellas identificaron las muestras control F1 como híbridos. También se obtuvieron patrones consistentes y estables en las muestras de perdiz roja y de perdiz chukar. La metodología RT-PCR es muy rápida ya que se obtienen los resultados a tiempo real cuando se desarrolla la amplificación y no se necesita ninguna manipulación posterior de los productos de PCR. Tanto la metodología RAPD como RFLP requieren una visualización de sus resultados de amplificación en geles de agarosa, además en el análisis con RFLPs se tiene que realizar un paso adicional de digestión con enzimas de restricción y son por lo tanto unas metodologías en las que se tarda más tiempo en obtener los resultados finales.

Los ejemplares muestreados en la provincia de Álava se consideraron híbridos cuando se detectaron como tales en cualquiera de las metodologías, incluso cuando la detección fue sólo con una de ellas.

Se identificaron perdices híbridas en tres de las cuatro unidades de gestión de caza menor de la provincia de Álava (tabla 1). Se debe tener en cuenta que en la unidad de gestión en la que no se detectó ningún híbrido, fue aquella en la que un menor número de cotos se muestrearon y menos ejemplares se analizaron. Los porcentajes de hibridación en las otras tres unidades de gestión fueron variables oscilando de 5,9% a 30%. Se obtuvo una media de 16,67% de hibridación para el total de muestras de la región de Álava, aunque las grandes diferencias observadas en las muestras, dependiendo de su origen, sugieren tomar este dato con cautela.

Se estima conveniente el análisis genético de los reproductores de las granjas cinegéticas que suministran las perdices para ser soltadas o repoblar las áreas cinegéticas de la provincia de Álava. Adicionalmente, también convendría hacer controles genéticos periódicos de las perdices a soltar en el campo, mediante muestreos, para comprobar el correcto funcionamiento de todas las partes implicadas en el proceso de producción y análisis de las perdices criadas en cautividad. Con estas medidas de gestión se puede reducir paulatinamente la hibridación de la perdiz roja en los campos alaveses, así como en el resto de regiones, asegurando el cumplimiento de la legislación vigente y colaborando en el mantenimiento de esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Avise, J. C. 1994. Chapman & Hall, New York.
- Barbanera, F., Negro, J. J., Di Giuseppe, G., Bertocini, F., Capelli, F. & Dini, F. 2005. *Biol Conserv* 122: 275–287.
- García, C. B. & Arruga, M. V. 2005. *Avian Poult. Biol. Rev.* 16(2): 81-86.
- García, C. B., Monteagudo, L. V.,

Tejedor, M. T., Angulo, B., Gruas, C., Gómez, M. J., Marín F. & Arruga, M. V. 2007. ITEA extra 28 (II): 429–431. • Johnson, V. J., Yucesoy, B. & Luster, M. I. 2004. Cytokine 27: 135-141. • Nadal, J. 1992. Fundación La Caixa, Barcelona: 87–100. • Randi, E. 1996. Mol. Phylogenet. Evol. 6: 214–227. • Reilly, J. G. & Thomas, C. A. Jr. 1980. Plasmid 3(2):109-115. • Williams, J. G. W., Kubelik, A. R., Livak, K. F., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. Nucleic Acids Res. 18: 6531- 6535.

Tabla 1. Resultados de hibridación de perdiz roja con perdiz chukar en las diferentes unidades de gestión de caza menor de la provincia de Álava.

Unidades de gestión para la caza menor	Nº cotos muestreados	Nº ejemplares perdiz muestreados	Nº híbridos	% hibridación
Valles Norte	2	20	6	30
Valles Sur	6	17	1	5,9
Rioja Alavesa	7	14	2	14,29
Llanada Occidental	1	3	0	0

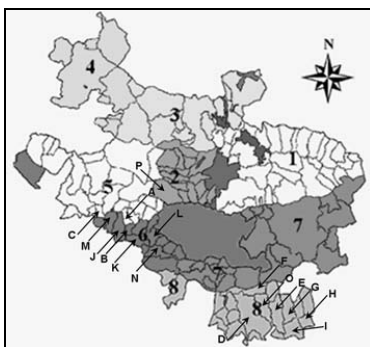


Figura 1. Mapa de la provincial de Álava con localización por flechas de los puntos de recogida de las muestras de perdiz. Las distintas unidades de gestión para la caza menor son representadas por números y los cotos analizados con letras (de A a P).

Agradecimientos: Los autores desean agradecer a la Asociación de Cotos de Caza de Álava su colaboración en la recogida de muestras. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA-CICYT (RZ2004-00011-00-00).

DETECTION OF INTROGRESSION OF CHUKAR PARTRIDGE (*ALECTORIS CHUKAR*) GENES INTO THE RED-LEGGED PARTRIDGE (*A. RUFA*) IN THE WILD IN ÁLAVA REGION (SPAIN)

ABSTRACT. The genetic status of the red-legged partridge (*A. rufa*) has been checked in the Alava region of Spain (North). Detection of hybridisation of this species with chukar partridge (*A. chukar*) has been developed by the use of different genetic methods: analysis of mitochondrial DNA, use of random amplified polymorphic DNA (RAPDs) and analysis of nuclear single nucleotide polymorphisms (SNPs). Some hybrid individuals have been identified among the wild birds by the different procedures. The hybrids were distributed in different hunting areas.

Keywords: hybridisation, SNPs, RADPs, mit-DNA