

EVALUACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS EN PERDICES DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ARAGÓN

García, C.B., Monteagudo, L.V., Tejedor, M.T., Angulo, B., Gruas, C., Gómez, M.J., Marín, F., Arruga, M.V.

Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013. Zaragoza

E-mail de contacto: mvarruga@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es una especie muy apreciada por los cazadores y forma parte de numerosos ecosistemas naturales en nuestro país, aunque se distribuye también por Portugal y algunos puntos del Sur de Francia e Inglaterra y el Norte de Italia. El deterioro progresivo de su hábitat así como la presión ejercida por sus predadores naturales y por el hombre, entre otros factores, han sido los responsables de que, desde hace ya varios años, la perdiz roja se encuentre en una situación de descenso de sus poblaciones silvestres. Para solucionar este problema se comenzaron a criar perdices en cautividad, lo que ocasionó un grave problema para esta especie cuando algunos criadores decidieron cruzar los ejemplares de perdiz roja de sus granjas con los de otra especie, perdiz chukar (*A. chukar*) principalmente, que tienen unos mayores índices productivos y se adaptan mejor a este sistema de crianza. Los híbridos resultantes, tras varias generaciones de retrocruzamientos con perdiz roja, poseen un aspecto externo indistinguible del de una perdiz roja pura, aunque una vez soltado en el campo puede contaminar las poblaciones naturales con genes no propios de la especie en pureza y al cazador no le resulta tan desafiante su caza.

Para la detección del estado de hibridación de perdices aparentemente rojas se ha hecho necesario el desarrollo de pruebas genéticas, mediante el análisis directo del DNA de cada ejemplar. Dada la escasa información genética de la especie de que se disponía (Randi, 1996, Randi y Lucchini, 1998) se han realizado diferentes estudios con diversas metodologías (Arruga *et al.* 1996, 1998, García y Arruga 2003, 2005a, Saz *et al.* 1998) hasta desarrollar un método eficaz y fiable para la identificación de individuos híbridos de perdiz roja con perdiz chukar. Este método patentado incluye distintas metodologías genéticas de análisis como RAPD (Williams *et al.* 1990) y la caracterización de SNPs, como se ha realizado en otras especies aviares (Primmer *et al.* 2002, Shi *et al.* 2001, Smith *et al.* 2000). Dada la alta similitud de los genomas del pollo y la perdiz (García y Arruga 2002, Kasai *et al.* 2003), algunos marcadores son derivados de la información de partida de genes de pollo.

La Comunidad Autónoma de Aragón, desde el Gobierno de Aragón, es la pionera en la realización de un estudio del estado de hibridación de las granjas de perdiz roja aragonesas, así como en perdices cazadas en el territorio de su competencia. Esta Comunidad Autónoma es una gran productora de perdices, que se venden para cotos y repoblaciones en todo el territorio nacional. Aunque la legislación (Ley 4/89, de 27 de Marzo, de Conservación de los espacios naturales y de la flora y fauna silvestre) obliga a realizar las sueltas o repoblaciones con ejemplares puros de las especies, hasta que no se iniciaron los estudios en este Laboratorio no se disponía de una metodología capaz de detectar la hibridación, en este caso de perdiz roja con perdiz chukar. Con el método desarrollado, al analizar los ejemplares reproductores de las granjas se pueden eliminar de la producción los que resulten híbridos, asegurando que sus descendientes no lo sean. Del mismo modo el análisis de ejemplares silvestres nos da una idea del estado en el que se encuentra la especie en su medio natural, alertando de su deterioro si se detecta hibridación.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se han analizado 1698 perdices procedentes de 5 granjas y 30 perdices del medio natural. En los casos de las perdices criadas en cautividad se han tomado muestras de sangre en tarjetas FTA[®] (Gutierrez-Corchero, 2002) y en el caso de las perdices silvestres se han tomado plumas. A partir de las tarjetas y plumas se ha extraído el DNA usando procedimientos estándar.

Para el estudio de todas ellas se han empleado diferentes metodologías genéticas siendo la base la técnica de PCR. En cada caso se han empleado diferentes condiciones de PCR, para los marcadores RAPDs la temperatura de hibridación es baja (García y Arruga 2005b, 2006a) y para la caracterización de SNPs la temperatura es diferente para cada gen en cuestión (García y Arruga 2006b).

Los productos de PCR de RAPD se visualizan en geles de agarosa al 1% de concentración y teñidos con bromuro de etidio, detectando las bandas diagnósticas que nos indican la hibridación.

Para la caracterización de SNPs se emplea la digestión con enzimas de restricción específicas para cada gen (RFLP) (Kiko *et al.* 1979, Reilly y Thomas 1980) y en caso de no haber enzimas de restricción que sean capaces de diferenciar perdiz roja de perdiz chukar o híbridos de ambas especies, se emplea la metodología RT-PCR o PCR a tiempo real mediante un termociclador a tiempo real usando sondas Taqman[®] marcadas con fluorocromos diferentes para los alelos de las distintas especies (Johnson *et al.* 2004, Llambí *et al.* 2006).

Igualmente y en una de las granjas analizadas, 45 individuos, tomados al azar, se han analizado para 7 marcadores microsatélites, todos ellos de localización autosómica y de herencia codominante (MCW135, MCW295, MCW225, MCW276, MCW280, LEI31, ADL0142).

El programa GENETIX se ha utilizado para la estimación de diversos parámetros de genética de poblaciones: heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y F_{IS} con su intervalo de confianza al 95% de seguridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los porcentajes de hibridación obtenidos se indican en la tabla 1.

Procedencia	Porcentaje de hibridación
Granja 1	45,99 %
Granja 2	65,67 %
Granja 3	43,62 %
Granja 4	22,12 %
Granja 5	32,71 %*
Coto 1	23,33 %

Tabla 1. Porcentajes de hibridación resultantes de los análisis de detección de híbridos de perdiz roja con perdiz chukar.

Como se observa en la Tabla 1, se ha detectado hibridación en las cinco granjas de perdices analizadas. En cada una se ha obtenido un porcentaje diferente que oscila entre 22,12% y 65,67%, siendo éste un rango muy amplio. Por lo tanto no se puede extrapolar la información encontrada en una granja al resto. Para conseguir obtener las granjas libres de hibridación es necesario analizar todos los animales reproductores de la granja y eliminar los individuos híbridos para obtener todos los descendientes libres de hibridación. También es necesario analizar la reposición en los siguientes años para evitar la introducción de ejemplares híbridos de nuevo en los ciclos productivos.

En cuanto a las perdices silvestres analizadas igualmente se ha encontrado hibridación. Este resultado obtenido recalca la importancia que tienen los estudios en esta especie para evitar la contaminación del patrimonio genético de la perdiz roja pura. Controlando la ausencia de hibridación en las granjas cinegéticas y realizando chequeos en los lotes de sueltas y repoblaciones se puede contribuir a disminuir el impacto de la hibridación en los espacios naturales, además de cumplir la legislación vigente.

La tabla 2 muestra la variabilidad genética de la explotación analizada para cada marcador y globalmente, considerando todos los marcadores conjuntamente. La población muestra una buena variabilidad genética, con un valor de $H_{(E)}$ cercano al 50%. No se detecta la existencia de consanguinidad significativa en la población, dado que el valor de F_{IS}

estimado conjuntamente a partir de todos los marcadores analizados no es significativamente distinto de 0.

Locus	k	N	H _O	H _E	F _{IS} (95%IC)	PIC
MCW135	4	36	0,722	0,676	- 0,070 ^{NS} (-0,300 - 0,130)	0,602
MCW295	6	45	0,511	0,494	- 0,034 ^{NS} (-0,162 - 0,082)	0,468
MCW225	4	44	0,182	0,172	- 0,055 ^{NS} (-0,112 - -0,015)	0,165
MCW276	3	45	0,311	0,278	- 0,121 ^{NS} (-0,196 - 0,062)	0,257
MCW280	5	39	0,590	0,539	- 0,096 ^{NS} (-0,281 - 0,083)	0,484
LEI31	3	45	0,489	0,514	0,049 ^{NS} (-0,252 - 0,331)	0,390
ADL0142	6	44	0,705	0,697	- 0,011 ^{NS} (-0,184 - 0,139)	0,641
GLOBAL	-	45	0,501	0,481	- 0,042 ^{NS} (-0,125 - 0,017)	-

Tabla 2. Variabilidad genética de la explotación analizada. k: número de alelos detectados; N: efectivo analizado; H_O: frecuencia observada de heterocigotos; H_E: frecuencia esperada de heterocigotos; F_{IS} (95% IC): estimación de la consanguinidad, con su intervalo de confianza al 95% de seguridad; NS: no significativo (p>0,05); PIC: contenido informativo del polimorfismo.

La Comunidad Autónoma de Aragón ha sido la primera en realizar este tipo de estudios, analizando tanto las granjas que crían en cautividad perdiz roja como ejemplares cazados en el campo, convirtiéndose de esta manera en modelo a seguir por el resto de Comunidades Autónomas dada la importancia de la especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruga, M. V.; Tejedor, M. T.; Villaruel, M. R.; Heriz, A.; Ferreira, E.; Abenia, F. J. 1996. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 74: 228.
- Arruga, M.V.; Tejedor, M.T.; Saz, J.; Monteagudo, L.V.; Villaruel, M. 1998. *Expoaviga*, 98: 9-14.
- García, C. B.; Arruga, M. V. 2006a. *Wildlife Biology in Practice*, Vol 2, No 1: 13-16.
- García, C. B.; Arruga, M. V. 2006b. *Animal Research*, 55: 335-342.
- García, C. B.; Arruga, M. V. M. V. 2005a. *ITEA*, Extra Vol. 26, Tomo I: 69-71.
- García, C. B.; Arruga, M. V. 2005b. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 16(2): 81-86.
- García, C. B.; Arruga, M. V. 2003. *ITEA*, Vol. 24, Tomo II: 543-545.
- García, C. B.; Arruga, M. V. 2002. *Chromosome Research*, 10(Supp.1): 41.
- Gutiérrez-Corchero, F.; Arruga, M. V.; Sanz, L.; García, C. B.; Hernández, M. A.; Campos, F. 2002. *Molecular Ecology Notes*, 2 (1): 75.
- Johnson, V. J.; Yucesoy, B.; Luster, M. I. 2004. *Cytokine*, 27: 135-141.
- Kasai, F.; García, C. B.; Arruga, M. V.; Ferguson-Smith, M. 2003. *Cytogenetic and Genome Research*, 102: 326-330.
- Kiko, H.; Niggermann, E.; Ruger, W. 1979. *Molecular and General Genetics*, 172(3): 3003-3012.
- Llambí, S.; García, C. B.; Arruga, M. V. 2006. *Albéitar*, 93: 32-34.
- Primmer, C. R.; Borge, T.; Lindell, J.; Saetre, G. P. 2002. *Molecular Ecology*, 11: 603-612.
- Randi, E.; Lucchini V. J. 1998. *Molecular Evolution*; 47: 449-462.
- Randi, E. 1996. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 6(2): 214-227.
- Reilly, J. G.; Thomas C. A. Jr. 1980. *Plasmid*, 3(2): 109-115.
- Saz, J.; Arruga, M. V.; Tejedor, M. T.; Villaruel, M.; Savva, D. 1998. *Hungarian Journal of Animal Production*, 48(1): 86-89.
- Shi, L.; Drummond, P.; De Kloet, S.; Pimentel-Smith, G.E.; Smith, E.J. 2001. *Genetica*, 110: 227-230.
- Smith, E.; Shi, L.; Drummond, P.; Rodriguez, L.; Hamilton, R.; Powell, E.; Nahashon, S.; Ramlal, S.; Smith, G.; Foster, J. 2000. *Animal Genetics*, 31: 62-67.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1990. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.