

DETECCIÓN DE INTROGRESIÓN GENÉTICA EN LA PERDIZ ROJA (*Alectoris Rufa*), MEDIANTE ANÁLISIS DEL ADN MITOCONDRIAL.

DETECTION OF GENETIC INTROGRESSION IN THE RED PARTRIDGE (*Alectoris Rufa*) THROUGH THE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA.

Javier Ramiro García, Natalia Sevane Fernández, Isabel Tupac-Yupanqui Segastegui

Tutores: Susana Dunner Boxberger y Oscar Cortés Gardyn

Dpto. de Producción Animal. Fac. de Veterinaria. UCM

RESUMEN

El análisis del D-Loop u origen de replicación del ADNmt en individuos de distintas especies de perdiz (perdiz roja, griega y chúcar) ha evidenciado la existencia de diferentes haplotipos específicos. Utilizando esta información, hemos desarrollado una técnica que, mediante la amplificación y posterior secuenciación del D-Loop, nos permite detectar mutaciones específicas y analizar en la perdiz roja la posible existencia de introgresión con otras especies a través de la genealogía materna. Se han analizado un total de 1410 perdices agrupadas en 282 lotes formados, cada uno, por cinco individuos, obteniéndose como resultado que en 87 de estos lotes se encontraba al menos un individuo que presentaba introgresión genética de otra especie distinta a la roja.

PALABRAS CLAVE: *Alectoris*, D-Loop, introgresión, lote

ABSTRACT

The analysis of D-Loop, the source of mtDNA replication, in populations from different species of partridges, has proved the existence of differential haplotypes for the Red, Greek and Chuckar partridges. Based on this, we have used a technique using the mitochondrial D-Loop amplification and sequencing which allows the detection of specific mutations, so that inter-specific crossings in the maternal line can be traced. A total of 1410 partridges divided into 282 groups of 5 individuals have been analysed. Results show that in 87 of these groups, there is genetic introgression of partridge species different from the red in at least one individual.

INTRODUCCIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es una galliforme de tamaño medio perteneciente al genero *Alectoris* que habita en la Península Ibérica, Francia, Norte de Italia y algunas regiones de Inglaterra (Johnsgard, 1988). Esta especie ha sido tradicionalmente muy valorada por su alto valor cinegético, teniendo su caza unas características muy particulares, ya que es un ave que se camufla muy bien, y posee un vuelo corto pero muy rápido.

Dentro del genero *Alectoris* además de la perdiz roja nos encontramos otras especies como *Alectoris chukar* que se distribuye por el suroeste de Asia, *Alectoris graeca* que se puede encontrar en Grecia, Italia y los países bálticos, o *Alectoris barbara* que habita en el norte de África.

Hasta hace poco tiempo, el elevado censo de la perdiz roja permitía satisfacer la demanda generada por los cazadores. Pero en los últimos años el aumento de la presión cinegética, unido a la alteración y fragmentación de su hábitat han conducido a una disminución de su censo lo que dificulta satisfacer la demanda de una manera natural..

Ante esta situación y con los objetivos de no perder un patrimonio genético autóctono y cubrir la demanda cinegética, se han desarrollado diversas soluciones. Unas hacen referencia a la recuperación de su hábitat, mientras que otra solución ha sido la creación de granjas cinegéticas donde se desarrolla la cría en cautividad de la perdiz roja con el objetivo de utilizarlas en la repoblación de los cotos (Negro et al. 2001).

Esta última conlleva una serie de inconvenientes debido a que la perdiz roja, como cualquier especie salvaje, plantea dificultades en la cría en cautividad.

En este punto surgen también comentarios dentro de los círculos de cazadores (Nadal, 1992) que hacen referencia a una pérdida de las características de comportamiento cinegético de la perdiz roja.

Es posible pensar que, al menos cuando comienza el sistema de cría de esta especie, y para evitar los inconvenientes de la cría en cautividad de la perdiz roja, bien se introdujeran animales provenientes de granjas en otros países de nuestro entorno aparentemente de la

especie autóctona pero que portaban diversos grados de introgresión genética con otras especies, bien se utilizara algún sistema de cruzamiento que presentara ventajas desde el punto de vista productivo (Nadal, 1992). Un ejemplo sería cruzar una hembra chúcar, para aprovechar los mejores índices reproductivos de esta especie, con un macho de perdiz roja. Las hembras híbridas, que aun se pueden distinguir fenotípicamente de una perdiz roja se retrocruzan con un macho de perdiz roja obteniendo una descendencia muy difícil de diferenciar morfológicamente de la perdiz roja, a pesar de ser un híbrido. Y es precisamente esa descendencia la que se utilizaría para las repoblaciones, lo que podría llevar a la pérdida de las características genéticas de la perdiz roja, además de tratarse de una práctica ilegal.

Con el objetivo de identificar la presencia de híbridos en una población se han desarrollado diversas metodologías moleculares basadas en el estudio del ADN nuclear (Randi et al. 2003) o mitocondrial. El análisis de la secuencia del origen de replicación o D-Loop del ADN mitocondrial de individuos pertenecientes a diferentes especies, *Alectoris rufa*, *Alectoris chukar* y *Alectoris graeca* ha permitido determinar posiciones especie específicas en todas ellas y por lo tanto la posibilidad de analizar la existencia de introgresión por vía materna.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Para este estudio se han recogido sangres de 1410 perdices procedentes de diversas granjas cinegéticas distribuidas por toda la geografía española que se han conservado en DNA Solution™. Las muestras se agruparon en lotes de cinco individuos, donde cada uno de ellos contribuía con un volumen concreto en función de su hematocrito, que fue previamente determinado mediante el recuento de eritrocitos en cámaras de Neubauer. Al volumen final obtenido se le realizó una extracción con fenol-cloroformo mediante un protocolo estándar (Sambrook y col., 1989).

Se amplificó un fragmento de 947 pb (del nt. 16731 al nt. 892) (Desjardins *et al.*, 1990) en un volumen de 25 µl con 0.75 U de Taq Gold Polymerasa, 2 mM de MgCl₂, 12.5 pmol de cada uno de los cebadores (Dloop-for 5'AGGACTACGGCTTGAAAAGC; Dloop-rev: 5'TATGTCCGACAAGCATTAC3'), 200 µM dNTPs, y 25 ng de ADN en un termociclador (PTC-100 M. J: Research), siguiendo un protocolo a 30 ciclos y con una

temperatura de annealing de 55 °C. Los productos de la PCR fueron purificados mediante un kit de purificación de Roche (High PCR Sequenciation Kit) y sometidos a una reacción de secuenciación con un kit de Applied Biosystems (Big Dye terminator v.1.1 cycle sequencing kit), que después de purificada se secuenció en un secuenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). La lectura de la secuencia se realizó mediante el programa Sequencing Analysis (Applied Biosystems) y se alinearon con ClustalW (Higgins y col., 1994) verificando las posiciones diagnósticas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Es importante tener en cuenta que mediante el análisis de ADN mitocondrial, tan solo podemos advertir la existencia de introgresión por vía materna, por lo cual es necesario ser extremadamente cauteloso a la hora de interpretar los resultados (Barbanera *et al.*, 2004; Martínez-Fresno *et al.*, 2006). De esta manera, un resultado negativo significa que dicho individuo presenta ADN mitocondrial propio de perdiz roja, pero en ningún momento podemos afirmar que no presente introgresión de otras especies, que bien pudiera quedar reflejado en su ADN genómico.

Por el contrario, un resultado positivo determinaría sin género de dudas la existencia de la participación a través de la genealogía materna de hembras de otras especies, sin que esto quiera indicar que el porcentaje del genoma que proviene de la especie foránea sea significativo, ni en que momento se produjo dicha aportación.

Para llevar a cabo este análisis hemos comparado las secuencias correspondientes al D-Loop de diferentes especies del género *Alectoris* obtenidas de GenBank (Y08555, AY190657) que nos permitieron identificar posiciones especie-específicas, esto es, posiciones en las que la presencia de uno u otro nucleótido determina la pertenencia de dicha secuencia a una u otra especie. Así, se establecieron tres posiciones diagnósticas dentro del fragmento amplificado perteneciente al D-Loop. Al verificar las secuencias de los 282 lotes analizados se encontró un total de 87 lotes (un 31 %) con un haplotipo propio de una especie distinta a la roja, es decir, al menos un individuo de ese lote estaba afectado de cierto grado de introgresión genética.

CONCLUSIÓN

Este tipo de análisis presenta algunas desventajas ya que un resultado negativo no implica que la perdiz sea pura, y ante un resultado positivo, no tendríamos información acerca del grado de introgresión. Sin embargo presenta una serie de ventajas como la de detectar animales híbridos, que por su bajo grado de introgresión escaparían a otros tipos de análisis basados en marcadores del ADN genómico y que permite detectar la presencia genética de otras especies. Además, es una técnica que resulta poco onerosa al analizar de una sola vez los cinco individuos que forman el lote y puede utilizarse en combinación con otros tipos de marcadores nucleares como los de tipo microsatélites (Randi *et al.*, 2003; Baratti *et al.*, 2004) o RAPDs (Cortés *et al.*, 2001; Negro *et al.*, 2001; Barbanera *et al.*, 2004; Sevane *et al.*, esta publicación) para detectar una posible introgresión por parte de otras especies del género *Alectoris*.

Sería recomendable, antes de llevar a cabo sueltas y repoblaciones, algún tipo de control genético del material que se va a reintroducir o de los reproductores que han dado lugar a esos animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Barbanera F, Negro JJ, Di Giuseppe G, Bertoncini F, Cappelli F, Dini F. (2005) Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes) populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: a study from central Italy. *Biological Conservation*, 122, 275-287.
- Desjardins P., Morais R. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212 (4), 599-634.
- Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680
- Johnsgard P.A., 1988. The Quails, Partridges, and Francolins of the world. Oxford University Press, New York.
- Martínez-Fresno M, Junco E, Arana P, Henriques-Gil N (2006) Mitochondrial DNA variability in populations of *Alectoris rufa*: a single-stranded conformation polymorphism (SSCP) approach. *Wildlife Biology Pract.*, 2(1): 1-7.
- Nadal J., 1992. Problemática de las poblaciones de perdiz roja, bases ecoetológicas para tener éxito en las repoblaciones. In: La perdiz roja. Gestión del hábitat. Fundación la Caixa, editorial Aedos, Barcelona, p.p. 87-100.

Negro JJ, Torres MJ, Godoy JA. 2001. RAPD Analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* x *Alectoris graeca*) in Spain. Biol Conserv. 98:19-24.

Randi E., Tabarroni C., Rimondi S., Lucchini V., Sfougaris A. 2003. Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). Mol Ecol. 12:2201-2214.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Apéndice E.3.

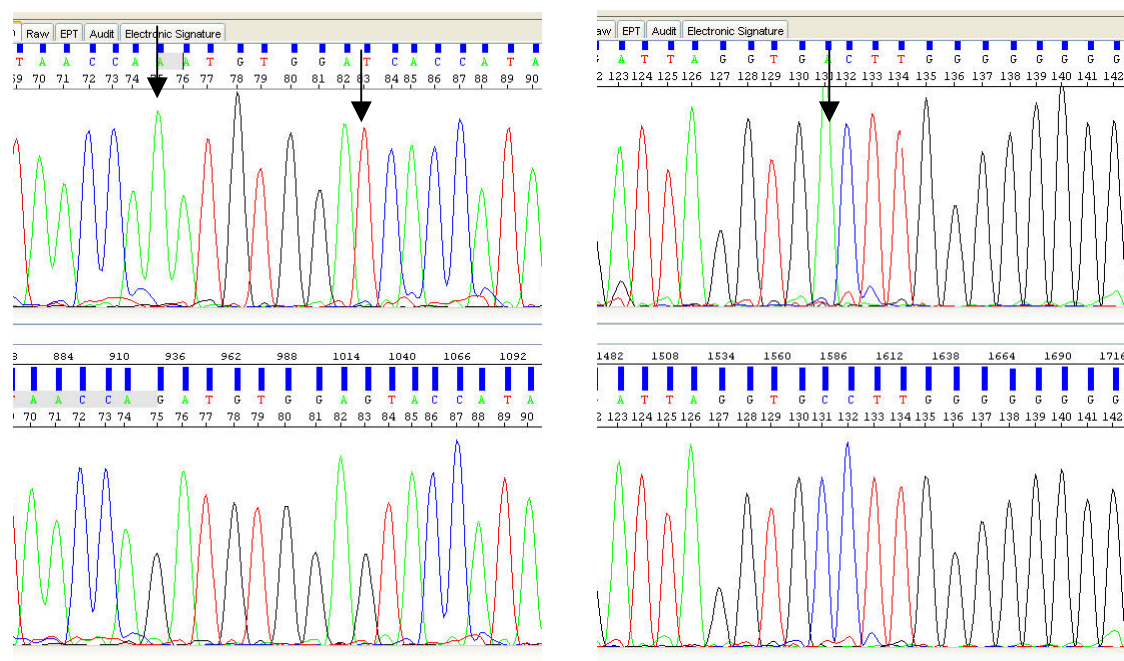


Figura 1: Electroferograma correspondiente a la secuencia parcial del D-Loop de *A. rufa* (arriba) y *A. chuckar* (abajo) con indicación de las tres mutaciones diagnósticas de especie.