

DETECCIÓN DE INTROGRESIÓN GENÉTICA EN LA PERDIZ ROJA (*Alectoris rufa*), MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE TIPO RAPD
RAPD MARKERS ANALYSIS FOR DETECTION OF GENETIC INTROGRESSION
IN RED-LEGGED PARTRIDGE (*Alectoris rufa*)

Natalia Sevane Fernández, Javier Ramiro García y María Asunción García-Atance
Fatjó

Tutores: Susana Dunner Boxberger y Francisco Javier Canón Ferreras

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

RESUMEN

La explotación cinegética de la perdiz roja (*Alectoris rufa*) ha experimentado un gran auge en los últimos años, siendo necesario recurrir a repoblaciones y sueltas con ejemplares criados en granjas. El problema aparece cuando en esas granjas cinegéticas los reproductores están hibridados con otras especies de perdiz más adaptadas a la cría en cautividad, como la perdiz *Alectoris chukar*. En este trabajo se utilizan ocho marcadores tipo RAPD para determinar la presencia o ausencia de hibridación con perdiz *A. chukar* en los ejemplares estudiados. Se han analizado 1510 individuos, agrupándolos en lotes de cinco aves, y se ha obtenido una frecuencia de introgresión genética en la perdiz roja en torno a un 50%. Estos resultados arrojan un porcentaje de hibridación preocupante en las poblaciones cautivas de perdices españolas, por lo que sería conveniente establecer un sistema de control exhaustivo de los reproductores utilizados en granjas cinegéticas antes de realizar sueltas y repoblaciones.

ABSTRACT

In recent years, the use of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) for cynegenetic purposes has increased dramatically, and captive-bred individuals are released to reinforce wild populations. A problem appears at the farm level where partridges can be crossed with non-native species that are better adapted to captivity, like *Alectoris chukar*. In this study we use a set of eight RAPD markers to identify a possible hybridization of *A. rufa* with *A. chukar* partridges. A total of 1510 individuals were analysed, grouped into pools of five birds each. We obtained a frequency of genetic introgression in red-legged partridge near to 50%. These results show that a high percentage of hybridization in captive populations of Spanish partridges is present, and that more thorough control systems should be established in breeding farms for re-stocking purposes.

Palabras clave: *Alectoris*, introgresión genética, RAPD.

INTRODUCCIÓN

La explotación cinegética de la perdiz roja (*Alectoris rufa*) ha experimentado un gran auge en los últimos años como consecuencia del aumento de la demanda por parte de los cazadores. Unos años atrás, las parejas reproductoras en su hábitat natural eran capaces de satisfacer esa demanda, pero actualmente no es suficiente y es necesario recurrir a métodos alternativos, como es el caso de las repoblaciones y sueltas con ejemplares criados en granjas. El paso de la vida en libertad a la cautividad de la perdiz roja ha planteado serias dificultades, siendo una de las más importantes la reducción de la capacidad reproductiva. Esta es una de las principales razones esgrimidas para realizar cruces con otras especies como la perdiz chúcar (*Alectoris chukar*). Las diferencias morfológicas entre individuos híbridos se van diluyendo a medida que aumenta el porcentaje de genes de la perdiz autóctona en sucesivos cruzamientos, de tal manera que un retrocruzamiento con perdiz roja de híbridos de *A. rufa* y *A. chukar* es prácticamente indistinguible morfológicamente de una perdiz roja. Las repoblaciones y sueltas de estos híbridos producen una difusión de genes entre la población salvaje que puede provocar la pérdida de este patrimonio genético autóctono (Negro *et al.*, 2001).

Por lo tanto, un paso necesario en el proceso productivo de las granjas cinegéticas de perdices es el control genético de los reproductores, detectando los individuos híbridos antes de realizar sueltas y repoblaciones. Para ello, es necesario disponer de un sistema que nos permita la identificación individual basada en la información genética de cada animal. En el caso del género *Alectoris*, el conocimiento de su genoma es escaso en comparación con otras especies de interés productivo. Los primeros estudios se basaban en polimorfismos bioquímicos (Randi *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1993), cuya variabilidad es escasa en comparación con los marcadores moleculares actuales. El conocimiento del genoma de una especie cercana filogenéticamente a la perdiz como es la gallina, permitió la utilización con éxito de algunos marcadores tipo microsatélites de esta última especie en la perdiz (Randi *et al.*, 2003; Baratti *et al.*, 2004). También se ha utilizado el análisis de secuencias mitocondriales cuyo principal problema es que se obtiene información únicamente de la línea materna (Barbanera *et al.*, 2004; Martínez-Fresno *et al.*, 2006).

En este trabajo se emplean marcadores de tipo RAPDs (Cortés *et al.*, 2001; Negro *et al.*, 2001; Barbanera *et al.*, 2004), basados en la amplificación al azar de ADN genómico

polimórfico, para determinar la presencia o ausencia de hibridación con perdiz chúcar en los ejemplares analizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se han recogido muestras de sangre de 1510 perdices en granjas cinegéticas de diferentes puntos de la Península Ibérica que se han conservado en DNA Solution™. Las muestras se han mezclado en lotes de cinco individuos después de su cuantificación individual por contaje celular en cámaras de Neubauer con el objetivo de establecer la contribución equivalente de cada individuo en la formación de lotes. Después de mezclar muestras de sangre perteneciente a cinco individuos en una misma proporción de acuerdo al contaje celular, se extrajo el ADN genómico siguiendo un protocolo estándar con fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989).

Amplificación PCR

Los cebadores utilizados en este estudio se detallan en la Tabla 1. Se llevaron a cabo las amplificaciones en un termociclador PTC-100 (MJ Research) en un volumen de 25 µl utilizando 0.3 U de Taq Polimerasa (Biotools), 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 12 pmol de cada cebador y 50 ng de ADN siguiendo el mismo protocolo para los 8 marcadores que consiste en 44 ciclos (94° C, 1 minuto, 36° C 1 minuto, 72° C 2 minutos) precedidos de 5 minutos a 94° C y con 5 minutos de extensión final a 72° C. Los productos de la PCR se sometieron a una electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida 29:1 al 6% (400V; 20mA; 10W) y se visualizaron después de teñir con NO₂Ag. Se identificó la eventual presencia de bandas marcadoras de la especie *Alectoris chukar* para realizar un diagnóstico sobre la introgresión por parte de esta especie (Figura 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la técnica de RAPDs se han analizado un total de 302 lotes de cinco individuos cada uno, hallándose una frecuencia de introgresión genética en la perdiz roja de un 49,7 %. De estos lotes con algún ejemplar híbrido, un 48% fueron diagnosticados con un solo marcador, un 32% con dos marcadores, un 16% con 3 y un 4% con 4 (Tabla 2). El grado de

información de los distintos marcadores es variable, siendo el marcador Ph-03 el que permite identificar un mayor número de híbridos.

En el supuesto de individuos retrocruzados con *A. rufa*, la potencia de ser detectados utilizando 8 marcadores de tipo RAPD, suponiendo que segregan de forma independiente y cuyos alelos específicos de la *A. chukar* estuvieran en homocigosis, es del 99,6 %, es decir, de cada 1000 perdices híbridas sólo 4 serían consideradas como *A. rufa*.

Debido al elevado número de individuos objeto de este estudio y que el coste de una perdiz podría no justificar el gasto de estos análisis genéticos, se optó por agruparlos en lotes de cinco aves. Para ello fue necesario determinar la contribución equivalente de cada uno de los individuos en la muestra analizada. Las muestras de las que partimos son sangre y, teniendo en cuenta que los glóbulos rojos de las aves son nucleados, realizamos el contaje de eritrocitos en cámaras de Neubauer, obteniendo así una medida aproximada de la contribución en material genético de cada una de las perdices que contribuyen al lote. Con este sistema, la aparición de una única perdiz híbrida en el lote conduce a la eliminación de los 5 individuos del mismo. La intensidad de las bandas diagnósticas que se obtienen en geles de acrilamida está asociada con el número de individuos híbridos en el lote. (Figura 1b y 1c).

CONCLUSIONES

La aplicación de la técnica de RAPD sobre un amplio número de ejemplares de perdiz ha llevado a la obtención de resultados preocupantes, alcanzando la hibridación con perdiz chúcar valores del 50%, por lo que sería conveniente establecer un sistema de control exhaustivo de los reproductores utilizados en granjas cinegéticas españolas antes de realizar sueltas y repoblaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barbanera F, Negro JJ, Di Giuseppe G, Bertocini 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.

2. Baratti M, Ammammati M, Magnelli C, Dessi-Fulgheri F. (2004) Introgression of chukar genes into reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy. *Animal Genetics*, 36, 29-35.
3. Blanc F, Durand P, Jabbour-Zahab R. (1993) Diversité génétique des populations de perdrix rouges (*Alectoris rufa*) dans la région de Béziers (Hérault). *Gibier Faune Sauvage*, 10, 293-302.
4. Cortés O, Cañón J, Dunner S. (2001) Utilización de pools de ADN y RAPD para identificar diferencias genéticas entre la perdiz roja (*Alectoris rufa*) y perdiz griega (*Alectoris graeca*). III Congreso de la Sociedad Española de Genética (Sevilla).
5. 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.
6. Negro JJ, Torres MJ, Godoy JA (2001) RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* × *Alectoris graeca*) in Spain. *Biology Conserv*, 98, 19–24.
7. Randi E, Meriggi A, Lorenzini R, Fusco G, Alkon PU. (1992) Biochemical analysis of relationships of Mediterranean *Alectoris* partridges. *The Auk*, 109(2), 358-367.
8. Randi E, Taborrioni C, Rimondi S, Lucchini V, Sfougaris A. (2003) Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). *Molecular Ecology*, 12, 2201-2214.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning*. En: *Molecular cloning*. Volumen 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, E.3.-E.4.

| Cebadores | Secuencia | Publicación |
|------------------|----------------------|----------------------|
| UCM38 | 5'-GGTGGGTGGT- 3' | Cortés et al., 2001 |
| UCM63 | 5'-CACACCACCC- 3' | Cortés et al., 2001 |
| UCM98 | 5'- GAGAGGAAGG-3' | Cortés et al., 2001 |
| OPN11 | 5'-TCGCCGCAAA- 3' | Cortés et al., 2001 |
| OPA14 | 5'-TCTGTGCTGG- 3' | Cortés et al., 2001 |
| OPA16 | 5'-AAGCGACCTG- 3' | Cortés et al., 2001 |
| OP-08 | 5'-TGGACCGGTG- 3' | Negro et al. en 2001 |
| Ph-03 | 5'-GTAGACCCGT- 3' | Negro et al. en 2001 |

Tabla 1. Cebadores RAPD utilizados en el estudio.

| Marcadores Positivos | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | Total |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| Sin hibridación | 152 | 0 | 0 | 0 | 0 | 152 |
| Con hibridación | 0 | 72 | 48 | 24 | 6 | 150 |
| % de lotes positivos | 0 | 48 | 32 | 16 | 4 | 100 |

Tabla 2. Número de marcadores positivos hallados en los diferentes lotes de perdices analizados.

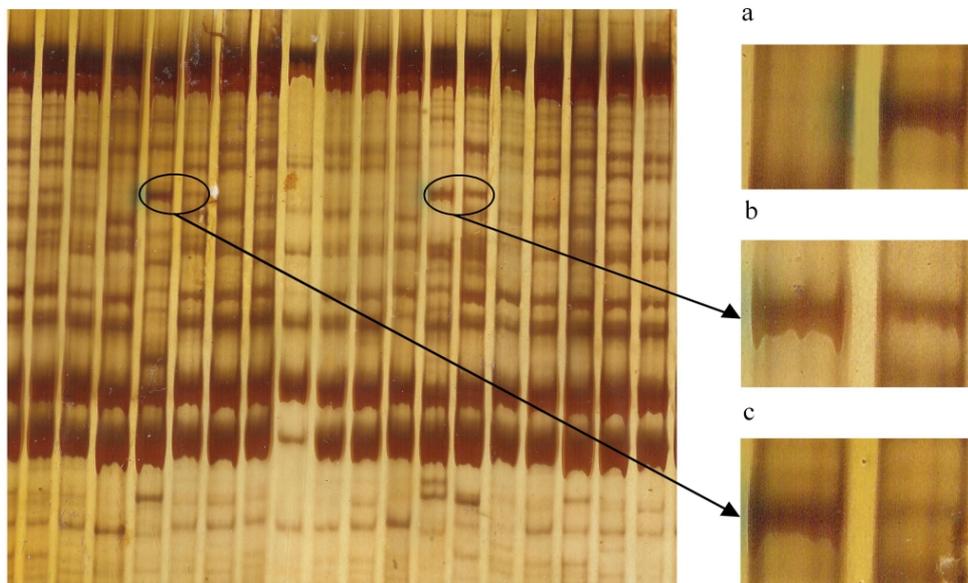


Figura 1. Visualización en gel de acrilamida teñido con nitrato de plata de patrones electroforéticos obtenidos con el RAPD OPA16. a): imagen ampliada de la banda diagnóstica de *Alectoris chukar* (derecha) junto al control negativo *Alectoris rufa* (izquierda) en el que no se aprecia dicha banda. b) y c): Diferente intensidad de la banda diagnóstica según el número de individuos híbridos que incluye cada lote.