ESTUDIOS GENÉTICOS EN PERDIZ ROJA ESPAÑOLA (*ALECTORIS RUFA* L.)

García, C. B. y Arruga, M. V.
Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria.
C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es un ave que habita principalmente en la Península Ibérica, Sur de Francia y algunos puntos del Norte de Italia y Sur de Inglaterra. Es una especie que hasta ahora ha sido muy poco estudiada genéticamente (Arruga *et al.*, 1996, 1998; Saz *et al.*, 1998).

A consecuencia de diferentes factores como una excesiva presión cinegética, una elevada presión de sus depredadores naturales, la destrucción de su hábitat natural... el número de perdices silvestres ha disminuido alarmantemente y se cree que puedan quedar pocos ejemplares. Cabe destacar la problemática originada por la suelta de perdices de granja que no sean perdices rojas en pureza (principalmente híbridos con perdiz griega o *A. graeca*, que se cría en España para carne de consumo) ya que estos híbridos se pueden reproducir normalmente contaminando el patrimonio genético de perdiz roja existente en el medio natural.

Así tanto por un interés cinegético como por un interés ecológico y medioambiental se están realizando estudios genéticos en esta especie para ver si existe todavía en el campo perdiz roja pura silvestre. También se están estudiando ejemplares de granjas cinegéticas para averiguar si poseen híbridos entre sus reproductores ya que por ley no se pueden soltar este tipo de individuos.

Para el estudio genético de esta especie se analiza el DNA mediante la metodología RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) descrita por Williams *et al.* en 1990. Es una forma rápida y fácil de identificar polimorfismos de DNA generados a partir de varias regiones del genoma ya que se amplifican mediante PCR fragmentos al azar usando cebadores de pocos pares de bases (generalmente 10 pb) y una temperatura de hibridación baja que aumenta la inespecificidad obteniendo así como resultado unos patrones de múltiples bandas. Las ventajas que ofrecen los RAPDs son principalmente que se pueden estudiar un gran número de loci en especies de las que se conoce muy poco acerca de su DNA, a partir de poca muestra e incluso con DNA antiguo. Este tipo de marcador ha sido empleado ampliamente en diferentes especies para su caracterización genética y estudios de poblaciones (Plotsky *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Tansley *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2002). Aunque se señala como inconveniente de esta metodología la baja reproducibilidad de sus resultados, se ha visto que se pueden optimizar para poder ser usados como marcadores fiables y reproducibles (Rothuizen *et al.* 1994, Ambady *et al.* 1996). Con RAPDs se pretenden poner de manifiesto diferencias entre los genomas de perdiz roja y griega, así como los de perdices híbridas que compartirán características de ambas especies. Para encontrar los patrones correspondientes a cada especie se han estudiado los animales individualmente y los resultados han sido analizados con un software de tratamiento de imágenes que permite comparar poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 253 ejemplares de perdices procedentes de la Península Ibérica (n_1= 31 perdices griegas, n_2= 4 perdices híbridas y n_3= 218 perdices supuestamente rojas siendo 100 de ellas silvestres y 118 de granja) con diferentes

tipos de primers, dos parejas de cebadores procedentes de microsatélites de pavo (P-2 y P-8) y cebadores procedentes de kits comerciales de (CG02 y CG20).

La extracción del DNA se ha realizado a partir de muestras de sangre, tejidos y tarjetas impregnadas con sangre.

Con los cebadores P-2 y P-8 se ha empleado un protocolo de PCR de una desnaturalización inicial a 95 °C de 5 minutos seguida de 35 ciclos de 95 °C 1 minuto, 30 °C 1 minuto y 74 °C 2 minutos y una extensión final a 74 °C de 10 minutos. Con los cebadores comerciales se ha usado un protocolo de PCR diferente con una desnaturalización inicial a 94 °C de 4 minutos seguida de 45 ciclos de 94 °C 1 minuto, 36 °C 1 minuto y 72 °C 2 minutos y una extensión final a 72 °C de 10 minutos. Los reactivos que entraron a formar parte de la reacción de PCR se optimizaron para cada cebador.

Los fragmentos amplificados se separan por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 2,5 % para P-2 y P-8 y al 1,6% con CG02 y CG20.

Los resultados son posteriormente analizados con el software de tratamiento de imágenes Diversity Database™ Versión 2.2.0 . Se ha utilizado como método para computar la similitud entre las muestras el Coeficiente Dice.

También se hace una estimación de la similitud entre las especies *A. rufa* y *A. graeca* calculando para cada primer la frecuencia de bandas compartidas entre ambas usando la fórmula: $B_{ab} = 2b_{ab}/(b_a + b_b)$, adaptada de la fórmula propuesta por Lynch (1990) donde b_a y b_b serán el número de bandas que aparecen en el patrón general de perdiz roja y perdiz griega, respectivamente y b_{ab} es el número de bandas comunes a ambas especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras numerosas pruebas con diferentes combinaciones de cebadores, se eligieron 4 con los que se obtenían unos patrones repetibles y diferentes para perdiz roja y perdiz griega (figura 1). Además con estos marcadores se pueden detectar los ejemplares híbridos ya que en los patrones aparecen bandas diagnósticas (comunes a todos los ejemplares de una especie y ausentes en la otra). Para la definición de los patrones y las bandas diagnósticas se compararon los resultados individuales con un programa informático de tratamiento de imágenes (Diversity Database™).

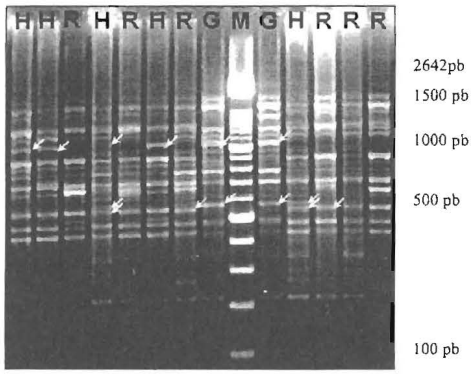


Figura 1. Prueba RAPDs realizada con el cebador CG02. Las calles R corresponden a individuos de perdiz roja, G son de perdiz griega y H de perdices híbridas. Las flechas indican las bandas diagnósticas. La calle M corresponde a un marcador de peso molecular.

Con el programa informático usando el Coeficiente Dice como método de comparación de similitud se construyeron también árboles filogenéticos con el método UPGAMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages).

Aunque con algunos marcadores se consiguieron separar las poblaciones de perdices griegas de las de rojas, no se consiguieron agrupar las perdices rojas por su origen (granja/silvestre) o localización geográfica (Norte/Sur de la Península) ni incluso agrupar las perdices de las diferentes granjas. Aparecen perdices híbridas tanto entre los animales de granja como en los silvestres de diferentes localizaciones aunque es cierto que en algunas granjas aparece un mayor porcentaje de animales híbridos que en otras. De igual modo se han detectado perdices rojas puras tanto en el campo como en las granjas por lo que aún estamos a tiempo de evitar que se empeore la situación de la perdiz roja en España evitando la suelta en el campo de perdices rojas no puras.

En cuanto a los cálculos realizados para determinar la frecuencia de bandas compartidas entre los patrones de la perdiz roja y la perdiz griega se han encontrado unos valores muy altos para los cuatro marcadores que apoya la proximidad filogenética de ambas especies propuesta en estudios anteriores (Randi *et al.* 1992, Randi 1996).

Podemos concluir que con la metodología RAPDs una vez optimizada se pueden obtener patrones genéticos repetibles en estas especies y además permite la identificación de posibles híbridos. Con esta metodología se ha logrado un mayor conocimiento genético de las perdices rojas y griegas y en el futuro se pretende ampliar este estudio con otro tipo de marcadores para conseguir más información complementaria.

REFERENCIAS

Ambady, S.; Carpio, C. M., Ponce de León, F. A. 1996. *Animal Biotechnology*, 7(2):99-112.

Arruga, M. V.; Tejedor, M. T.; Villaroel, 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.; Villarroel, M. 1998. *Expoaviga,* 98: 9-14.

Casa, A. M.; Mitchell, S. E.; Lopes, C. R.; Valls, J. F. M. 2002. *The Journal of Heredity,* 93(4):300-302.

Lynch, M.,1990. *Molecular Biology and Evolution*, 7:478-484.

Plotsky, Y.; Kaiser, M. G.; Lamont, S. J. 1995. *Animal Genetics*, 26:163-170.

Randi, E.; Meriggi, A.; Lorenzini, R.; Fusco, G.; Alkon, P. 1992. *The Auk*, 109(2):358-367.

Randi, E. 1996. *Molecular phylogenetics and Evolution,* 6(2):214-227.

Rothuizen, J.; Van Wolferen, M. 1994. *Animal Genetics,* 25:13-18.

Saz, J.; Arruga, M.V.; Tejedor, M.T.; Villarroel, M.; Savva, D. 1998. *Hungarian Journal of Animal Production,* 48(1):86-89.

Smith, E. J.; Jones, C. P.; Bartlett, J.; Nestor, K. E. 1996. *Poultry Science*, 75:579-584.

Tansley, S. A.; Brown, C. R. 2000. *Biological Conservation*, 95:39-48.

Williams, J. G. K.; Kubelik; A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tingey, S. V. 1990. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.