

Aplicación del estudio del DNA al conocimiento de la estructura genética de la perdiz roja (*Alectoris rufa*, L.)

García, C. B.¹; Arruga, M. V.²

RESUMEN

La disminución del número de perdices rojas silvestres en el campo ha hecho necesario que se recurra a su crianza en cautividad para su posterior suelta o repoblación. Para aumentar la productividad de esta especie en algunas granjas se ha recurrido a las hibridaciones con otras especies más productivas como son la perdiz chukar o la perdiz griega. Ante la posibilidad de dañar el patrimonio genético de la perdiz roja pura con sueltas o repoblaciones con animales híbridos se ha buscado desarrollar una metodología genética de detección de este tipo de individuos. Para ello se ha utilizado la metodología RAPD y se han hecho pruebas con diferentes cebadores hasta obtener unos patrones repetibles y diferentes entre perdiz roja y otras especies. Las bandas diagnósticas de otras especies han servido para detectar a los animales híbridos tanto en perdices silvestres como en perdices de granja. Esta metodología ha demostrado su utilidad para la identificación de individuos no puros y así poder eliminarlos de las granjas.

Palabras clave: perdiz roja, RAPD, análisis genético.

SUMMARY

The number of wild red-legged partridges in fields has decreased so it has been necessary to breed them in captivity for restocking. Some farms has hybridized red-legged partridges with other species such as chukar partridge or rock partridge to increase their productivity. A genetic methodology to detect hybrid individuals has been developed to avoid damage in the genetic heritage of pure red-legged partridges due to restocking with such individuals. RAPD methodology has been used after some trials with different primers until repetible different patterns for red partridges and other species are obtained. Diagnostic bands for other species have been used to detect hybrid animals among wild partridges as well as among captive reared partridges. This methodology has shown to be very useful to identify not pure individuals and thus farmers will be able to eliminate them.

Keywords: red-legged partridge, RAPD, genetic analysis.

INTRODUCCIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es un ave que pertenece al orden de las gallináceas y a la familia de las fasiánidas que habita principalmente en la Península Ibérica, Sur de Francia y algunos puntos del Norte de Italia y Sur de Inglaterra.

Es una especie muy apreciada tanto para la caza menor como para el consumo de su carne. Diferentes causas como la destrucción de su hábitat natural o una excesiva presión cinegética han sido responsables del descenso del número de ejemplares de esta especie en el campo. Para poder recuperar las poblaciones naturales se ha tenido que recurrir a su crianza en cautividad para su posterior suelta, en el caso de cotos de caza, o repoblación. La crianza de perdiz roja en granjas es bastante costosa al tratarse de una especie que no se adapta fácilmente a las jaulas y cuyos índices productivos no son muy buenos. Hay otras especies de

perdiz como perdiz chukar (*A. chukar*) o perdiz griega (*A. graeca*) cuya productividad en granja es mayor y suelen criarse para carne de consumo. Algunos productores de perdiz roja han realizado cruzamientos de esta especie con perdices chukar o perdices griegas para aumentar la productividad de sus granjas. También hay productores que al comprar reproductores de otras localizaciones para evitar la consanguinidad en sus granjas, pueden adquirir inconscientemente animales no puros. Los híbridos resultantes pueden ser prácticamente indiferenciables de perdices rojas puras y al ser no sólo viables sino además capaces de reproducirse normalmente, una vez soltados en el campo pueden contaminar el patrimonio genético de la perdiz roja silvestre.

La legislación española vigente (ley 4/1989, de 27 de marzo) defiende la conservación de la fauna silvestre pero no

hay unas pruebas genéticas oficiales que demuestren que los ejemplares que van destinados a suelta o repoblación son perdices rojas puras.

Como la perdiz roja es una especie que hasta el momento ha sido poco estudiada genéticamente (2, 7, 9), se ha analizado su DNA con la metodología RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que no requiere conocimiento previo de secuenciación de la especie ya que se amplifican fragmentos al azar mediante PCR. Esta metodología fue descrita por Williams et al. en 1990 (10) y es un procedimiento rápido para identificar polimorfismos de DNA usando cebadores de pocos pares de bases (generalmente 10 pb.). RAPDs han sido utilizados previamente tanto para caracterización genética (5, 6) como para estudios de variabilidad genética (4) en aves.

Se señala como inconveniente de RAPDs que sus resultados son poco repro-

¹ Facultad de Veterinaria.

² Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. ESPAÑA.

Tel: +34 (9)76761662, e-mail: mvarruga@unizar.es

ducibles pero si se realiza una optimización previa pueden llegar a ser marcadores fiables y repetibles (1, 3, 8)

Como resultado de la aplicación de esta metodología se obtienen patrones de múltiples bandas. Se buscan cebadores que nos den patrones comunes para cada especie y diferentes entre sí en ciertas bandas que denominamos bandas diagnósticas de especie. Para definir los patrones de cada especie con cada uno de los marcadores se utiliza un programa informático de tratamiento de imágenes (Diversity DatabaseTM). Se detectan los animales híbridos cuando en los patrones de supuestas perdices rojas aparece alguna banda diagnóstica de perdiz chukar o perdiz griega.

MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción del DNA de las perdices se ha realizado a partir de muestras de sangre, tejidos y tarjetas impregnadas con sangre. Han sido objeto de este estudio 463 ejemplares de perdices procedentes de la Península Ibérica de las cuales 418 son perdices supuestamente rojas (100 de ellas capturadas en el campo). El resto corresponden a 4 animales que se sabe que son híbridos y 41 perdices de otras especies (chukar y griega).

Para el estudio se han empleado diferentes combinaciones de cebadores incluyendo microsatélites de ave y cebadores procedentes de kits comerciales (Operon Technologies, Inc.).

Con los cebadores probados el protocolo de PCR se optimizó para las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de PCR de desnaturalización a 95 °C (1 minuto), hibridación con el cebador a 30 °C (1 min), extensión a 74 °C (2 min) y una extensión final a 74 °C durante 10 minutos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl con tampón 10X (sin Mg), 3.5 mM de cloruro de magnesio, 500 µM de dNTP's, 0.5 µM de cada cebador, 2.5 U de Taq polimerasa y la cantidad de DNA y de agua bidestilada depende del método de extracción y de la concentración final de DNA en la muestra.

Para visualizar los resultados de la reacción de PCR se emplearon geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Las

imágenes de los geles posteriormente se analizaron con el programa informático de tratamiento de imágenes Diversity DatabaseTM Versión 2.2.0.

RESULTADOS

Se realizaron pruebas de optimización con los diferentes cebadores hasta que se obtuvieron los resultados esperados con cuatro de ellos. Estos resultados incluyeron unos patrones de bandas que se repetían en cada una de las especies y que se diferenciaban al menos en una banda (banda diagnóstica) del patrón de perdiz roja. Para la definición del patrón general de cada especie y la detección de las bandas diagnósticas se empleó el programa informático Diversity Database analizando los patrones individuales de cada uno de los ejemplares y comparándolos entre si.

Cuando se obtiene en el patrón de una supuesta perdiz roja alguna de las bandas diagnósticas de otra especie es porque el individuo es un híbrido (figura 1). Se encontraron animales híbridos tanto entre las perdices silvestres como entre las que se crían en granjas.

DISCUSIÓN

Se ha encontrado que con la metodología RAPD y tras una optimización de la reacción de PCR se obtienen unos marcadores repetibles y eficaces que sirven para detectar híbridos de perdiz roja con otras especies.

Estos marcadores ofrecen información complementaria, ya que algunos indivi-

duos híbridos que no son identificados como tales con alguno de los marcadores, puede ser detectado con los otros.

De la misma forma que con el uso de diferentes cebadores obtenemos complementariedad en la información genética de perdiz roja, el desarrollo de otras metodologías también puede ser de interés para ampliarla y en su caso que sirva también para detección de híbridos. Con esta finalidad se están desarrollando otras técnicas de estudio como SSCPs o SNPs.

CONCLUSIONES

Con los marcadores RAPD probados como eficaces se pretenden examinar las perdices de los productores interesados en ofrecer individuos de pureza comprobada. Identificando los híbridos se pueden eliminar de las granjas y así evitar su posterior reproducción en el campo.

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.

Agradecimientos

Agradecemos a M^a Jesús Gómez su ayuda en la obtención de la imagen de la figura.

Este trabajo ha sido financiado por CI-CYT (Ref. N^o: RZ01-009) y una beca F.P.U. del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España para CBG.



Figura 1. Patrón RAPD con uno de los cebadores seleccionados en el que aparecen señaladas con flechas las bandas diagnósticas. R= perdiz roja, O= perdiz de otra especie, H= perdiz detectada como híbrida, M= marcador de peso molecular.

Referencias bibliográficas

1. **Ambady, S.; Carpio, C.M.; Ponce de León, F.A.** (1996). Optimization of RAPD-PCR conditions in cattle. *Anim. Biotechnol.* 7(2): 99-112.
2. **Arruga, M.V.; Tejedor, M.T.; Villarroel, M.R.; Heriz, A.; Ferreira, E.; Abenia, F.J.** (1996). Genetic studies in *Alectoris rufa* and *Alectoris graeca* in Spain. 12th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals. *Cytogenet. Cell Genet.* 74, 228.
3. **Atienzar, F.; Evenden, A.; Jha, A.; Savva, D.; Depledge, M.H.** (2000). Optimised RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *Biotechniques* 28: 52-54.
4. **Delany, M.F.; Giesel, J.T.; Brazeau, D.A.** (2000). Genetic variability among populations of the Florida grasshopper sparrow. *J. Wildlife Manage.* 64(3): 631-636.
5. **Haig, S.M.; Rhymer, J.,M.; Heckel, D.G.** (1994). Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. *Mol. Ecol.* 3(6): 581-595.
6. **Plotsky, Y.; Kaiser, M.G.; Lamont, S.J.** (1995). Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprinting and polymerase chain reaction using arbitrary primers. *Anim. Genet.* 26:163:163-170.
7. **Randi, E.** (1996). A mitochondrial Cytochrome B phylogeny of the *Alectoris* partridges. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6(2): 214-227.
8. **Rothuizen, J.; Van Wolferen, M.** (1994). Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. *Anim. Genet.* 25: 13-18.
9. **Saz, J.; Arruga, M.V.; Tejedor, M.T.; Villarroel, M.; Savva, D.** (1998). Genetic differentiation in *Alectoris rufa* and *A. graeca* from Spain. *Hungarian J. Anim. Prod.* 48(1): 86-89.
10. **Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

