



ANEXO I

ESTUDIO DE MÉTODOS GENÉTICOS PARA DETERMINAR HIBRIDACIÓN EN LA PERDIZ ROJA



Antecedentes

La perdiz roja es la especie más emblemática de caza menor en la Península Ibérica y constituye una considerable fuente de recursos económicos en áreas rurales (Delibes, 1992; Lucio y Purroy, 1992). Su relevancia ecológica es también muy grande por tratarse de una importante fuente de alimentación para varios depredadores, muchos de ellos especies amenazadas. La enorme actividad cinegética que rodea a esta especie supone un notable recurso para varias Comunidades Autónomas generando un gran volumen de negocio.

La perdiz roja ha sufrido un declive en sus poblaciones especialmente desde los años 60 (Aebischer y Lucio 1997; Rocamora y Yeatman-Berthelot 1999). Algunos autores han señalado que las dos causas principales de este declive son la pérdida de calidad del hábitat y la excesiva presión cinegética, aunque las prácticas agrícolas y ganaderas, presión de predadores, repoblaciones incontroladas y la mala gestión también contribuyen (Garrido, 2006). Esta situación es preocupante, sobre todo en ciertas áreas del Sur de España y ha llevado a implementar planes específicos de recuperación, aunque no es tarea fácil, ya que los problemas de la especie son multicausales (Nadal, 1992; Vargas y Duarte 2002).

En las últimas décadas, al superar la demanda los recursos naturales, han surgido numerosas explotaciones de cría en cautividad de *Alectoris rufa* repartidos por la geografía española, buena parte de cuya producción se emplea en sueltas previas a la actividad cinegética. Estimaciones recientes cifran en cerca de 4,5 millones anuales el número de aves producidas en cautividad.

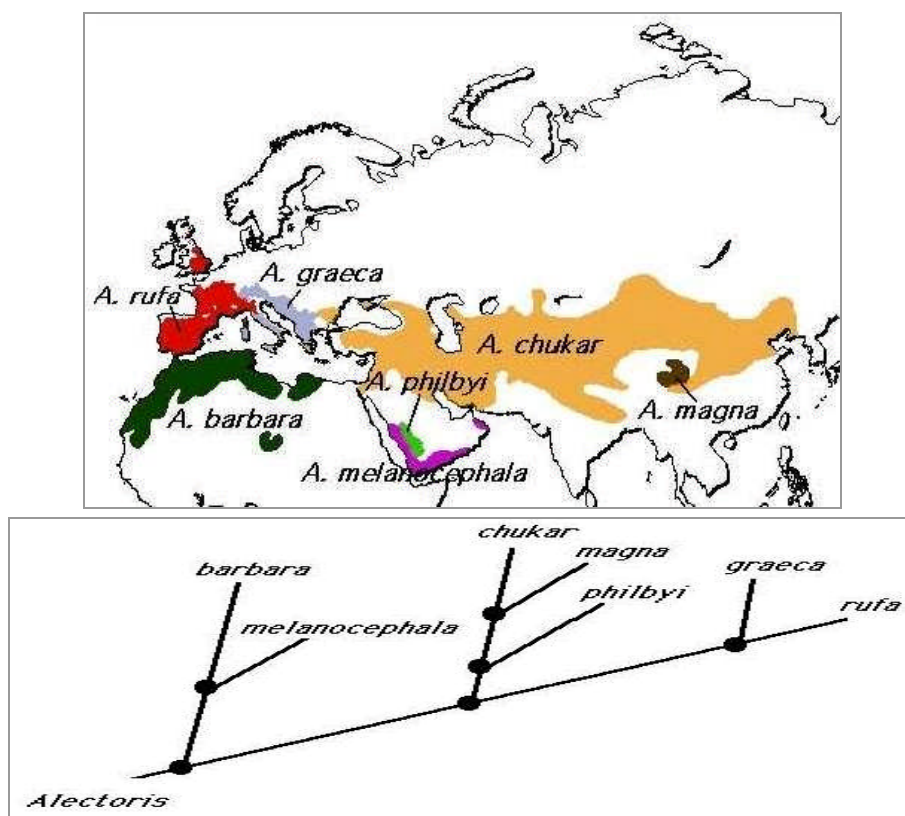
No obstante, es muy difícil averiguar con seguridad el número real de animales empleados localmente, al igual que el destino de los mismos en lo que se refiere a supervivencia en condiciones naturales, alcance y competitividad en la siguiente temporada de cría, etc.

Igualmente poco accesibles son las características genéticas de los animales criados en cautividad y posteriormente liberados. Se desconocen las estrategias de reproducción – procedencia y número de reproductores – existiendo, además, denuncias de la presencia de especies e híbridos prohibidos. De hecho, el más grave problema genético al que se enfrenta la perdiz roja es la posible contaminación genética o introgresión por cruzamiento con especies foráneas.

A nivel taxonómico, el género *Alectoris* comprende varias especies de las que *A. graeca* y *A. chukar* están filogenéticamente cercanas a *A. rufa* (Randi *et al.* 1992). La perdiz roja se distribuye en la Península Ibérica, sur de Francia, Islas Baleares y Córcega, aunque ha sido reintroducida con relativo éxito en su antigua área de distribución en Italia e introducida *de novo* en Gran Bretaña (Jonhsgard, 1988; Blanco Aguiar *et al.* 2003; Barilani *et al.*, 2007). Existen tres subespecies de perdiz roja: *A. rufa hispanica*, más oscura y brillante, en el norte y oeste peninsulares, *A. rufa intercedens*, en el resto peninsular y *A. rufa rufa*, en Francia. La llamada perdiz griega o perdiz de roca, *A. graeca*, se encuentra en Grecia, la península balcánica, Italia y el sur de Francia donde hibrida de forma



natural con la perdiz roja (Bernard-Laurent, 1984). Parece existir una cierta selección en contra de los híbridos y la introgresión no se extiende más allá de un cinturón en la zona limítrofe de las distribuciones (Randi y Bernard-Laurent, 1999). Con la perdiz turca, *A. chukar*, el problema es distinto. Su distribución – desde las islas griegas y Turquía, hasta China – no solapa con *A. rufa* y, por tanto, no pueden existir híbridos naturales. Sin embargo, *A. chukar* sí que puede hibridar con *A. rufa* cuando coinciden en el campo (Baratti *et al.*, 2005) y además, muestra una gran facilidad para la cría en cautividad, donde es fácil conseguir los híbridos. Las perdices turca y roja son distinguibles morfológicamente, así como los híbridos de F1, aunque con mayor dificultad; más difícil resulta la identificación de otras generaciones de descendientes. La liberación de perdices turcas o de los híbridos no está permitida por la ley, pero empiezan a acumularse evidencias de que en poblaciones de granja, e incluso en libertad, hay introgresión de genotipos *chukar* que, en ocasiones, se han podido identificar como de origen chino (Martínez-Fresno *et al.*, 2008). Las legislaciones española y portuguesa prohíben expresamente la liberación tanto de aquellas especies como sus híbridos con la perdiz roja. Es de señalar que, aunque se han referido algunos casos de híbridos con perdiz griega (Negro *et al.*, 2001), ninguno de los estudios más recientes ha detectado rastros de tal hibridación, que, si efectivamente existió, debe haber desaparecido con el tiempo. Sin embargo cada vez hay mas noticias de hibridación con perdiz turca (Francesch y Colominas 2007; García y Arruga, 2007; Tejedor *et al.*, 2007; Martínez-Fresno *et al.*, 2008).



Distribución geográfica y filogenia del género *Alectoris* (Duarte, 1998)



El problema de la introgresión interespecífica surge porque cada especie se encuentra adaptada a su entorno debido a la selección natural. Aquellas variantes genéticas que producen rasgos ventajosos en un determinado ambiente, acaban por extenderse a todos los individuos, constituyendo las características de la especie. Al contrario de lo que ocurre cuando se cruzan variedades distintas dentro de una misma especie, en que los híbridos pueden mostrar mayor vigor que las variedades originales; cuando dos especies distintas se cruzan, el genotipo de los híbridos no es armónico, produciéndose animales inadaptados, lo que se conoce como "depresión híbrida". Este hecho es el que explica el mantenimiento del tamaño de la faja híbrida natural que existe entre *A. rufa* y *A. graeca* en Francia (Randi y Bernard-Laurent, 1999): los individuos se mezclan hasta cierto punto porque las dos especies no han desarrollado mecanismos de aislamiento reproductivo totalmente efectivos, pero los híbridos que se forman son menos adaptados que las especies puras con las que lindan y no llegan a desplazarlas en sus respectivos territorios.

Con más razón, es de esperar que los híbridos entre *A. rufa* y *A. chukar* aún siendo más inadaptados que los que se forman entre *A. rufa* y *A. graeca*, puesto que sus distribuciones geográficas están más alejadas y las diferencias genéticas son mayores (Randi y Lucchini, 1998; Martínez-Fresno *et al.*, 2007). Aunque la cría en granja de estos híbridos pueda presentar ciertas ventajas productivas, en el entorno natural probablemente tengan claras desventajas. Esta inadaptación se puede revelar en muchos aspectos: alimentación, movilidad, resistencia a calor o a la sequía, comportamiento, etc.

Aunque los híbridos sean inadaptados en condiciones de campo, si el número de ellos que se sueltan desde las granjas de cría es muy grande en comparación con la población autóctona, no solamente contaminarán sino que acabarán por eliminar del todo aquello que tenemos por perdiz roja, que se extinguirá como especie. El motivo es distinto, pero es el mismo resultado que si se exterminasen todos los animales.

Debemos tener en cuenta que ambas especies, la roja y la chukar, tienen un ancestro común, de tal manera que sus genomas serán muy similares, pero también es fácil entender que aunque sean muy similares, diversos procesos evolutivos han hecho que se generen diferencias genéticas que las separan. Estas diferencias genéticas pueden ser detectadas mediante herramientas genéticas adecuadas.

Detección de la introgresión

El problema de la detección de la introgresión o, dicho de otra manera, el problema de garantizar la integridad genética de la especie autóctona de perdiz roja puede ser enfocado desde dos perspectivas diferentes.

En una de las perspectivas el problema se plantea como una cuestión categórica, no probabilística, en el sentido de que, descartados errores de custodia o procesado de la muestra, la presencia de determinadas 'marcas' de ADN en un



ejemplar (o mezcla de ejemplares) permite rechazar la integridad genética del mismo. La otra perspectiva plantea esta cuestión como un problema de asignación del ejemplar a una determinada población. La asignación es probabilística y, aunque el individuo problema se asignará a la población en la que su composición genética proporcione una mayor probabilidad, el ejemplar puede ser asignado a otras poblaciones con probabilidades más bajas. Dependiendo del enfoque que se elija, el categórico o el probabilístico, el tipo de marcador y la estrategia de trabajo será muy diferente.

En el caso que nos ocupa, el conjunto de laboratorios tomó la decisión de abordar el problema desde la primera perspectiva: la exclusión de integridad genética.

Exclusión de integridad genética

La perspectiva categórica se basa en la búsqueda de marcadores exclusivos, marcadores que presentan una variante en una población y otra variante distinta en la otra población.

Se eligió, como marcador "ideal" para este objetivo, el marcador denominado SNP (acrónimo que hace referencia a **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) que, entre otras características de interés, tienen sólo dos variantes, de tal forma que es posible seleccionar aquellos SNP que presentan una variante en la población de perdiz roja y la otra en la de perdiz chukar. Es posible, por lo tanto, elegir un conjunto mínimo de marcadores que proporcionen una potencia de detección determinada de perdices con un determinado nivel de introgresión.

El desarrollo de este proceso de búsqueda de marcadores se realizó en dos etapas. En la primera, cada laboratorio participante utilizó un conjunto de muestras de referencia que consistieron en un grupo de perdices rojas puras y otro de perdices chukar puras. Estas muestras de referencia, en las que se basaron las decisiones posteriores de aceptación o rechazo de un marcador, se consideran representativas de ambas especies, es decir, se trató de disponer de una representación de todas las posibles subpoblaciones que pueden aparecer en el medio natural.

Probabilidad de exclusión

En este contexto, el interés por un determinado marcador es consecuencia de sus propiedades tecnológicas para poder ser analizado simultáneamente junto a un número elevado de otros marcadores, es decir, el interés lo marca la posibilidad de combinar adecuadamente con el resto de marcadores que cumplen el requisito de ser exclusivos.

En el caso de utilizar marcadores exclusivos la potencia total de exclusión, es decir, la probabilidad de detectar híbridos, viene dada por la expresión:

$$P_{ET} = 1 - (1 - P_E)^n \quad [1]$$

donde:



n representa el número de marcadores exclusivos disponibles

$P_E = 2p$ y **p** representa la proporción de genes de perdiz chukar en la población autóctona, por ejemplo, si se trata de una F_1 (cruzamiento de un ejemplar de perdiz roja pura con otro de chukar pura), **p** valdrá 0,5. Sin embargo, si esta F_1 posteriormente se cruza con otra perdiz roja pura (retrocruzamiento R_2) el valor de **p** será 0,25, y así sucesivamente.

En la siguiente tabla se refleja la relación entre el nivel de introgresión (2, 3 y 4 se refieren al número de retrocruzamientos con perdiz roja, y entre paréntesis el porcentaje de genoma teórico de perdiz chukar presente en el híbrido), la potencia de detección del híbrido y el número de marcadores exclusivos que son necesarios para detectarle.

Nivel de introgresión	Potencia de detección	Número de marcadores
R2 (25,0)*	85	3 (2,7)**
	90	3 (3,3)**
	95	4
	99	7
R3 (12,5)	85	7
	90	8
	95	10
	99	16
R4 (6,25)	85	14
	90	17
	95	22
	99	34

* Entre paréntesis el porcentaje de genoma de perdiz chukar

** Entre paréntesis la cifra de marcadores aproximada con un decimal

Actualmente, el número de marcadores validados es de 23, y su utilización conjunta proporciona una potencia teórica aproximada de 100, 99,9 y 95,4 % para detectar híbridos con un 25, 12,5 y 6,25 % de perdiz foránea respectivamente. Estas cifras indican que de cada 100 perdices R3 (87,5 % de perdiz roja) que se analicen mediante este conjunto de marcadores detectaremos como híbridas la práctica totalidad (99,9) y si son R4 (95,4 % de perdiz roja), sólo 5 de ellas aparecerán como rojas, detectándose como híbridas las otras 95 perdices.

Este tipo de análisis es conservador, en el sentido de que el rechazo de la pureza del individuo no es probabilístico sino categórico (irrefutable), mientras que la no detección de genoma de la especie foránea en un híbrido le asigna a la misma categoría que los individuos puros.

El método molecular utilizado ha sido el denominado **Multiplex-Primer Extension**, y se lleva a cabo mediante dos reacciones secuenciales:

- La primera reacción es una PCR que consiste en la amplificación de fragmentos de ADN del genoma de la perdiz que incluyen los 23 marcadores. Los



fragmentos amplificados corresponden a los genes que aparecen en la tabla siguiente:

Tabla 1.- Nombre de los genes en los que se han descrito SNPs utilizados como marcadores para la detección de introgresión de *A. chukar* en *A. rufa*. Se indica la abreviatura utilizada para cada uno de ellos.

nombre gen	abreviatura	nombre gen	abreviatura
Aru1I68	Aru1I68	Ribosomal Protein L7A	RPL7A
Aru1F32	Aru1F32	Creatine Kinase 6	CKB
Aru1V16	Aru1V16	Cell Division Cycle 2-like1	CDC2L1
ATP-citrate lyase	ACLY	β -Cristalline	CRYB
Adenylate Kinase 1	AK	Glyceraldehyde -3-P dehydrogenase	GAPDH
Alpha-enolase	ENO	Recombination activating gene 1	RAG1
Beta Fibrinogen	FGB	Aggrecan 1	AGC1*
Hepatocyte nuclear factor 1 alpha	HNFA1	Parathyroid hormone	PTH
Myelin proteolipid protein	PLP	Thrombospondin 1	THBS
Rhodopsin	RHO	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2	TCF1*
DLOOP	DLOOP	Interleukina 12b	IL12B*
Vimentine	VIM		

- La segunda reacción conlleva la hibridación de cebadores internos de cada una de las secuencias amplificadas en la "multiplex" que se caracterizan por terminar una base antes del polimorfismo de interés, permitiendo la adición de un nucleótido marcado (ddNTP) en cada una de las posiciones diagnósticas.



Bibliografía

- Aebischer N, Lucio A (1997) Red-legged partridge (*Alectoris rufa*). In: Hagemeyer EJM, Blair MJ (eds) The EBBC atlas of European breeding birds: their distribution and abundance. Poyser, London, pp 208–209.
- Baratti M, Ammannati M, Magnelli C and Dessì-Fulgheri F (2005) Introgression of chukar genes into a reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy. *Anim Genet* 36: 29-35.
- Barilani M, Sfougaris A, Giannakopoulos A, Mucci N, Tabarroni C, Randi E 2006 Detecting introgressive hybridization in rock partridge populations (*Alectoris graeca*) in Greece through Bayesian admixture analyses of multilocus genotypes. *Conserv Genet* DOI 101007/s10592-006-9174-1.
- Bernard-Laurent A (1984) Hybridation naturelle entre Perdrix bartavelle (*Alectoris graeca saxatilis*) et Perdrix rouge (*Alectoris rufa rufa*) dans les Alpes Maritimes. *Gibier Faune Sauvage* 2: 79-96.
- Blanco Aguiar JA, Virgós E, Villafuerte R (2003) Perdiz roja (*Alectoris rufa*). In: R Martí and JC del Moral (Eds) Atlas de las aves reproductoras de España, pp 212-213 DGCoNa-SEO Madrid.
- Delibes (1992) Gestión de los cotos de perdiz roja. In: Fundación La Caixa (ed) La perdiz roja Gestión del hábitat Fundación La Caixa Barcelona, pp 141-146.
- Duarte, J. (1998) La perdiz roja (*Alectoris rufa*) en el olivar: métodos de estimación demográfica. Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga.
- Francesch A, Colominas JA (2007) Calidad genética de la perdiz roja en España y propuestas para su conservación y mejora. *Selecciones Avícolas* 10: 667-672.
- García CB, Arruga MV (2007) Diferenciación de especies de perdiz mediante caracterización de SNPs. *Archivos de Zootecnia* 56. (Sup 1).
- Garrido JL (2006) Conclusiones sobre perdiz roja. Así se ve el futuro de la perdiz roja *FederCaza*. Num, 243: 42–48.
- Johnsgard PA (1988) The Quails, Partridges and Francolins of the World. Oxford University Press, New Cork.
- Lucio A, Purroy FJ (1992) Caza y conservación de aves en España. *Ardeola* 39:85–98.
- Martínez-Fresno M, Henriques-Gil N, Arana P. 2008. Mitochondrial DNA sequence variability in red-legged partridge, *Alectoris rufa*, Spanish populations and the origins of genetic contamination from *A. chukar*. *Conservation Genetics* 9:1223–1231.



- 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 Aedos Ed Barcelona, pp 87-100.
- Negro JJ, Torres MJ and Godoy JA (2001) RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* x *A. graeca*). In: Spain Biological Conservation 98: 19-24.
- Randi E and Bernard-Laurent A (1999) Population genetics of a hybrid zone between the Red-legged partridge and rock partridge. The Auk 116: 324-337.
- Randi E and Lucchini V (1998) Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. J Mol Evol 47: 449-462 .
- Randi E, Meriggi A, Lorenzini R, Fusco G and Alkon PU (1992) Biochemical analysis of relationships of Mediterranean *Alectoris* partridges. The Auk 109: 358-367.
- Rocamora G, Yeatman-Berthelot D (1999) Oiseaux menacés et à surveiller en France. Listes rouges et recherches de priorités. Société d'Études Ornithologiques de France/Ligue pour la Protection des Oiseaux, Paris.
- Tejedor MT, Monteagudo LV, Mautner S, Hadjisterkotis E, and Arruga MV. (2007) Introgression of *Alectoris chukar* genes into a spanish wild *Alectoris rufa* population. Journal of Heredity 98:179-182.
- Vargas JM, Duarte J (2002) Dos modelos discrepantes de gestión de la perdiz roja en España. In: Lucio A, Sáenz de Buruaga M (eds) Aportaciones a la gestión sostenible de la caza en España. FEDENCA-EEC, Madrid, pp 93-119.
- Vargas JM, Guerrero JC, Farfán MA, Barbosa AM and Real R (2006) Land use and environmental factors affecting red-legged partridge (*Alectoris rufa*) hunting yields in southern Spain. European Journal of Wildlife Research 52: 188-195.

Consorcio *Perdiz Roja* FEDENCA-Laboratorios de Genética