

ANÁLISIS COMPARATIVO DE GENES DE PERDIZ ROJA Y CHUKAR MEDIANTE CARACTERIZACIÓN POR SNPS.

García, C. B. y Arruga, M. V.

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

INTRODUCCIÓN

La escasa información genética de que se dispone acerca de la perdiz roja (*Alectoris rufa*) (Arruga *et al.*, 1996, 1998; Saz *et al.*, 1998), así como el interés de esta especie tanto por su valor cinegético como por su valor ecológico ha hecho necesario ampliar su estudio para tener un mayor conocimiento genético acerca de la misma.

La perdiz roja es un ave que habita principalmente en la Península Ibérica, Sur de Francia y algunos puntos del Norte de Italia y Sur de Inglaterra. Diversos factores han ocasionado un descenso en el número de ejemplares en el campo haciendo necesaria la aparición de granjas de perdices para repoblaciones y sueltas. Aunque legalmente sólo se permite la suelta de ejemplares de perdiz roja ha surgido el problema de ciertas granjas que entre sus reproductores cuentan con individuos cruzados con otras especies (principalmente perdiz chukar o *A. chukar* y perdiz griega o *A. graeca*) ya que con estos últimos se consigue una mayor productividad. Estos animales cruzados a veces son indistinguibles fenotípicamente de perdices rojas y como problema adicional añadido son capaces de reproducirse normalmente contaminando la base genética de perdiz roja pura silvestre.

Hasta el momento existen pocos datos de secuenciación del DNA genómico de la perdiz roja ya que sólo aparece una secuencia de un gen nuclear, el gen del *ovomucoide* en la base de datos de GenBank. Casi todas las secuencias depositadas hasta la fecha en GenBank son de su DNA mitocondrial. Para especies aviares que han sido poco estudiadas hasta el momento existe la posibilidad de ampliar el conocimiento de su genoma a partir de análisis comparativo de genoma con especies más estudiadas como es principalmente el pollo (*Gallus gallus*) (Smith *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Primmer *et al.*, 2002; Kasai *et al.*, 2003). Se ha estudiado un fragmento del gen de la *hormona de crecimiento* (*GH*) de pollo tanto en perdiz roja como en perdiz chukar, ya que el crecimiento de ambas especies es diferente. Para lograr una mayor secuenciación de sus genomas así como para intentar encontrar diferencias entre ambos en forma de SNPs interespecíficos. El gen de la *hormona de crecimiento* (*GH*) del pollo consta de cinco exones y cuatro intrones (Tanaka *et al.* 1992) y es un gen altamente polimórfico (Fotouhi *et al.*, 1993; Kuhnlein *et al.*, 1997; Yung *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 1999). También se han seleccionado unos cebadores que hibridan en dos exones consecutivos de del gen *LRP/p40* para intentar encontrar variaciones nucleotídicas principalmente en los intrones. Se seleccionó el locus *LRP/p40* de *G. gallus* por ser el de una mayor frecuencia de SNP (bp^{-1}) en estudios de caracterización de SNP aviares realizados previamente (Primmer *et al.*, 2002). Finalmente se ha estudiado el gen *MC1R* (*melanocortin 1-receptor*) debido a las diferencias en el color de plumaje de ambas especies de perdices. Mutaciones de este gen han sido asociadas con el color de plumas en el pollo (Kerje *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2003).

Se ha elegido la búsqueda de SNPs como técnica de estudio debido a su abundancia en el genoma y a que estos marcadores son heredados más establemente que otros como son las secuencias repetidas (Landegren *et al.*, 1998)

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha partido de muestras de DNA de perdices rojas y perdices chukar extraídas a partir de tarjetas FTA[®] empapadas con sangre.

Se usaron las secuencias de los cebadores del gen *LRP/p40* (con número de acceso de GenBank: X94368) ya probadas en otras especies en anteriores estudios (Primmer *et al.*, 2002) y que hibridan en los exones 5 y 6 de dicho gen.

Para el diseño de los cebadores para los genes *GH* (con número de acceso de GenBank: AB061722) y *MC1R* (con número de acceso de GenBank: D78272) se utilizó el programa primer3 (Rozen & Skaletsky, 1998).

Las amplificaciones para cada gen se realizaron a unas temperaturas de hibridación de 63 °C para el gen *MC1R*, 64 °C para el gen *GH* y de 67 °C para el gen *LRP/p40*.

Los productos de PCR fueron secuenciados y se empleó el programa BioEdit (Hall, 1999) para el alineamiento de las secuencias resultantes con la opción de ClustalW multiple alignment y su posterior análisis y búsqueda de SNPs. Para el alineamiento se utilizaron las secuencias en ambos sentidos de cada animal para establecer una secuencia consenso para cada uno y finalmente proceder a la comparación con la secuencia original de pollo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el gen *GH* se secuenciaron 11 animales, 6 perdices rojas y 5 perdices chukar. Se compararon 201 pares de bases y se han encontrado 17 posiciones en las que había un cambio nucleotídico en pollo con respecto a la secuencia consenso de las dos especies de perdices y 1 gap en las perdices en el mismo tipo de comparación. Para la diferenciación de perdiz roja y perdiz chukar se encontraron 2 SNPs interespecíficos tratándose en ambos casos de una transición.

Para estudiar el gen *LRP/p40* también se secuenciaron 6 perdices rojas y 5 perdices chukar. La comparación se realizó con 314 pares de bases y se identificaron 14 SNPs entre el pollo y las perdices, 15 gaps en pollo y 3 gaps en perdices. Al comparar *A. rufa* con *A. chukar* no se obtuvieron SNPs interespecíficos.

Por último se estudió el gen *MC1R*. Se secuenciaron y analizaron los resultados de 5 animales, 3 de ellos *A. rufa* y 2 *A. chukar* y se compararon 336 pares de bases. En 5 posiciones aparecieron SNPs entre las especies de pollo y perdiz. No se encontraron variaciones nucleotídicas específica para cada especie de perdices.

Las secuencias de los genes para cada especie de perdiz están depositadas en la base de datos de GenBank con los números de acceso: AY606819, AY606820, AY606821, AY606822, AY762966 and AY762967.

En total se han localizado 57 posiciones diferentes (incluyendo gaps) entre el pollo y la perdiz, de las 851 pares de bases estudiadas. Así aunque las secuencias de pollo nos han servido de punto de partida para comenzar el estudio de esos mismos genes en perdiz, se ha demostrado que existe bastante variación entre estas especies. Los SNPs más abundantes han sido las transiciones

En cuanto a la búsqueda de SNPs interespecíficos de perdiz roja y perdiz chukar también se han conseguido avances pues se han localizado 2 SNPs, que sirven para la caracterización de estas especies. Como era de esperar las variaciones nucleotídicas entre estas dos especies del mismo género *Alectoris* han sido menores que entre especies de diferente género. De estas variaciones la mayoría han sido también transiciones.

Con este trabajo se ha conseguido que haya un mayor conocimiento de la base genética de la perdiz chukar a la vez que de la perdiz roja y se ha creado un punto de referencia nuevo para tratar de identificar ejemplares de perdices como una especie u otra a través del DNA mediante el diagnóstico por SNPs interespecíficos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Hall, T. A. 1999. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Kasai, F.; Garcia, C. B.; Arruga, M. V. and Ferguson-Smith, M. 2003. *Cytogenetics and Genome Research*, 102: 326-330.
- Kerje, S.; Lind, J.; Schütz, K.; Jensen, P.; Andersson, L. 2001. *Animal Genetics*, 34: 241-248.
- Landegren, U.; Nilsson, M.; Kwok, P.-Y. 1998. *Genome Research*, 8(8): 769-776.
- Leung, FC, Zhang X-Q, Ip SC-Y. 1999. *Poultry Science* 78(Supp. 1): 61.
- Ling, M. K.; Lagerström, M. C.; Fredriksson, R.; Okimoto, R.; Mundy, N. I.; Takeuchi, S.; Schiöth, H. B. 2003. *European Journal of Biochemistry*, 270: 1441-1449.
- Primmer, C. R.; Borge, T.; Lindell, J.; Saetre, G. P. 2002. *Molecular Ecology*, 11: 603-612.
- Rozen, S.; Skaletsky, H. J. 1998. Primer3. Code available at <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3> www.cgi
- Saz, J.; Arruga, M. V.; Tejedor, M. T.; Villarroel, M.; Savva, D. 1998. *Hungarian Journal of Animal Production*, 48(1): 86-89.
- Shi, L.; Drummond, P.; De Kloet, S.; Pimentel-Smith, G. E.; Smith, E. J. 2001. *Genetica*, 110: 227-230.
- Smith, E.; Shi, L.; Drummond, P.; Rodriguez, L.; Hamilton, R.; Powell, E.; Nahashon, S.; Ramlal, S.; Smith, G.; Foster, J. 2000. *Animal Genetics*, 31: 62-67.
- Tanaka, M.; Hosokawa, Y.; Watahiki, M.; Nakashima, K. 1992. *Gene*, 112(2): 235-239.
- Fotouhi, N.; Karatzas, C. N.; Kuhnlein, U.; Zadworny, D. 1993. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 931-936.
- Kuhnlein, U.; Ni, L.; Weigend, S.; Gavora, J. S.; Fairfull, W.; Zadworny, D. 1997. *Animal Genetics*, 28: 116-123.
- Yung, W.; Chan, C.; Leung, F. 1998. *Poultry Science* 77(Supp. 1): 6.