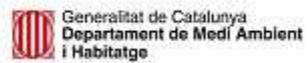




Acción 3.4.4.

« Programa de conservación ex-situ de la Perdiz pardilla »



Acción 3.4.4 « Programa de conservación ex-situ de la Perdiz pardilla »

Estado de conservación de la diversidad genética de las poblaciones salvajes de perdices pardillas de los Pirineos y de las perdices pardillas de la cría de Esterrí d'Aneu (Pallars Sobirà, Cataluña)

Nicolas Bech⁽¹⁾, Jérôme Boissier⁽¹⁾, Aïda Tarragó Guarro⁽²⁾, Ramon Martínez-Vidal⁽²⁾ y Claude. Nova⁽³⁾

⁽¹⁾Université Perpignan Via Domitia, ⁽²⁾Generalitat de Catalunya, ⁽³⁾Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage

I/ Introducción: sueltas e introgresión genética:

En Europa, la perdiz pardilla (*Perdix perdix*) representa una de las especies de caza menor más apreciadas. Por esta razón, desde mediados del siglo XX se comenzaron a realizar sueltas de perdices pardillas de criaderos casi por toda Europa [en Dinamarca (en la década de 1950), en Inglaterra (en la década de 1960), en Francia (a finales de la década de 1960) o incluso en la antigua Checoslovaquia (en la década de 1970)] (Birkan, 1971). Estas sueltas se efectuaron con fines cinegéticos, para reforzar las poblaciones naturales.

La mayoría de los individuos soltados en el medio natural están, con gran certeza, predestinados a ser abatidos en el transcurso de la siguiente temporada de caza, pero lo más frecuente es que estos individuos estén condenados a morir durante el periodo invernal como consecuencia de su mala adaptación al medio o de su incapacidad para conseguir alimento (Guitart, Cassaing, 2000). No obstante, se puede dar el caso de que ciertos individuos subsistan en el medio y lleguen a integrarse en el seno de poblaciones autóctonas salvajes. Como consecuencia de lo anterior aparecen descendientes híbridos, primera señal real de una introgresión genética de perdiz de criadero en las poblaciones de perdices salvajes.

Desde un punto de vista general, además del hecho de que la hibridación supone un importante riesgo para la integridad genética de los taxones en cuestión, la hibridación se percibe a menudo como un mecanismo que reduce el valor selectivo de los individuos a nivel de las zonas de hibridación (Barton, 2001). De este modo, tras una repoblación con fines cinegéticos, se han observado introgresiones genéticas en el caso de la perdiz griega (*Alectoris graeca*) y de la perdiz roja (*A. rufa*) por perdices chukar (*A. chukar*) (Barilani *et al.*, 2007). La principal consecuencia de estas introgresiones genéticas sería una pérdida de las adaptaciones locales, que aumentan los riesgos de extinción.

En el caso de la perdiz pardilla, una hibridación tras sueltas masivas con objeto cinegético, ha conducido con toda probabilidad a la desaparición de la subespecie *Perdix perdix italica* (Liukkonen-Anttila *et al.*, 2002). En Francia, se han evidenciado ya casos de hibridación entre perdices pardillas salvajes y perdices pardillas de criadero. Efectivamente, sobre la base de marcadores alozímicos ((Blanc *et al.*, 1986; Effenberger, Suchentrunk, 1999) o mitocondriales (Gomez-Moliner, 2007; Liukkonen-Anttila *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Uimaniemi *et al.*, 1999), se ha detectado una introgresión de genes de perdiz de criadero de llanura (*Perdix perdix amoricana*) en perdices salvajes de los Pirineos (*Perdix perdix hispaniensis*). No obstante, al comienzo del presente trabajo no se había realizado ningún estudio que hubiera utilizado los marcadores nucleares sobre la perdiz pardilla, a falta de marcadores (microsatélites) disponibles. Solo Selma Mautner definió 5 marcadores microsatélites en el transcurso de su tesis doctoral en la Universidad de Viena con objeto de estudiar la relación entre diversidad genética y valor selectivo en las perdices pardillas de criadero (Mautner, 2001).

Los marcadores nucleares microsatélites son considerados como los marcadores de elección en el estudio genético de las poblaciones (Frankham *et al.*, 2002). Desde luego, por parte de su heredabilidad mendeliana con respecto a los marcadores mitocondriales (con heredabilidad exclusivamente materna), o con respecto a su grado de polimorfismo muy superior a los marcadores alozímicos, los marcadores microsatélites son marcadores de primera elección para el seguimiento de una introgresión genética. Además, estos marcadores microsatélites son igualmente eficaces en los análisis de estructuración genética de las poblaciones naturales (Frankham *et al.*, 2002).

El primer objetivo de este estudio es el establecimiento, basándose en marcadores nucleares microsatélites, de un diagnóstico de la introgresión genética de las perdices pardillas de los Pirineos. Se ha comenzado a realizar, con la ayuda de una herramienta molecular, una estimación del índice de introgresión genética de las perdices pardillas de los Pirineos, además de análisis de la distribución de esta introgresión y de su origen.

El segundo objetivo es el establecimiento, con ayuda de los mismos marcadores, de un diagnóstico del estado de conservación de la diversidad genética de las perdices pardillas del centro de cría de Esterri d'Aneu (Pallars Sobirà, Cataluña).

II/ Desarrollo de marcadores nucleares microsátélites:

Este estudio tiene como objeto principal la puesta a punto de marcadores nucleares microsátélites amplificables en el caso de la perdiz pardilla. Sobre un total de más de 150 marcadores microsátélites probados mediante “amplificación cruzada”, solo pudieron utilizarse una muestra de 12 marcadores para el estudio. De estos 12 marcadores, 10 fueron objeto de una publicación en la revista “Genetics and Molecular Research” (Bech *et al.*, 2010).

Los resultados de los análisis extraídos de estos marcadores nucleares han venido a completar los trabajos anteriormente realizados con ayuda de marcadores moleculares enzimáticos y mitocondriales.

III/ Estimación de la introgresión genética de las perdices pardillas salvajes de los Pirineos.

→ *Muestreo:*

Para realizar este estudio hemos extraído el ADN de 703 muestras de alas, sangre o plumas. Este muestreo se compuso de 605 perdices pardillas salvajes pirenaicas (repartidas en 17 poblaciones) y de 98 perdices pardillas de criaderos. De las últimas, 41 perdices provenían de 3 poblaciones de criaderos franceses (que sirvieron para repoblar las poblaciones situadas en los Pirineos Orientales franceses, en Andorra y en el Col de l'Aubisque). Las 57 perdices pardillas de criadero restantes provenían del centro de cría situado en Esterrí d'Aneu (individuos de 2003 a 2009). Este centro de cría es conocido por ser el origen de diversas operaciones de repoblación en los Pirineos Catalanes (Pallars Sobirà, Cerdaña, etc...).

→ *Comparación entre perdices pardillas de criadero y salvajes:*

Los primeros análisis nos han permitido constatar una diferencia genética significativa entre las perdices pardillas salvajes de los Pirineos y las perdices pardillas de los criaderos ($F_{st}=0.0625$, $P=0.017$). Esta diferenciación es tal que los individuos pueden clasificarse en 2 conjuntos genéticos: “salvajes” y “de criaderos” (consultar figura 1). En esta figura podemos apreciar que los individuos (representados por columnas) salvajes se asocian mayoritariamente a un conjunto genético representado por el color amarillo, mientras que los individuos de criaderos se asimilan sobre todo al conjunto genético representado por el color rojo.

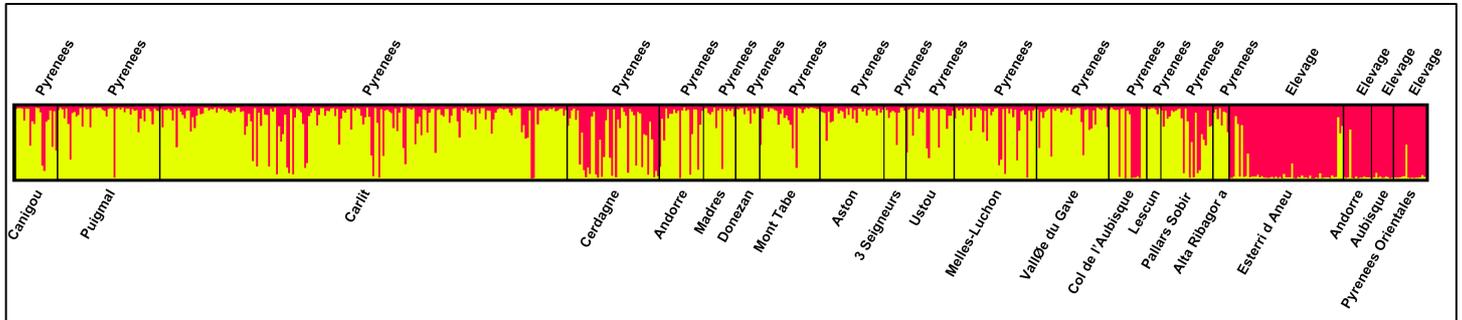


Figura 1: Figura realizada a partir del programa STRUCTURE ((Pritchard y *al.*, 2000), donde cada columna del histograma representa un individuo. Cada individuo se asigna a una de las 17 poblaciones salvajes pirenaicas o a uno de los 4 criaderos diferentes.

Se ha de tener en cuenta que ciertas perdices salvajes pirenaicas se asignan con fuerza al cluster “criadero” (rojo). Estas asignaciones son consecuencia de una introgresión de genes de perdiz de criadero en las poblaciones salvajes de los Pirineos.

➔ *Estimación de la introgresión genética de las perdices pardillas pirenaicas:*

Hemos recurrido a métodos estadísticos que nos han permitido distinguir, en el seno de las poblaciones salvajes pirenaicas, a los individuos realmente salvajes, a los individuos híbridos y los individuos de sueltas (y criados en la naturaleza) (consultar figuras 2 a y b).

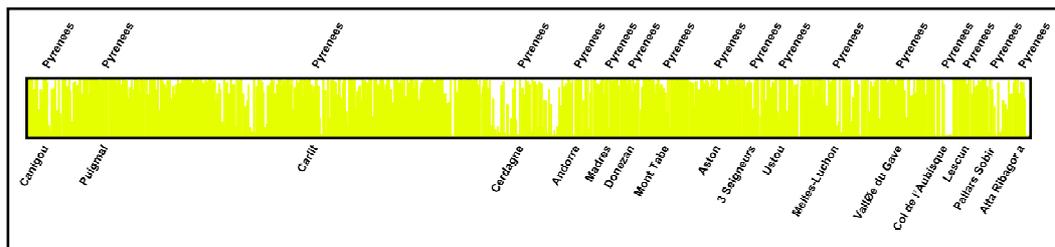


Figura 2a: Individuos estadísticamente salvajes en el seno de las 17 poblaciones salvajes de los Pirineos.

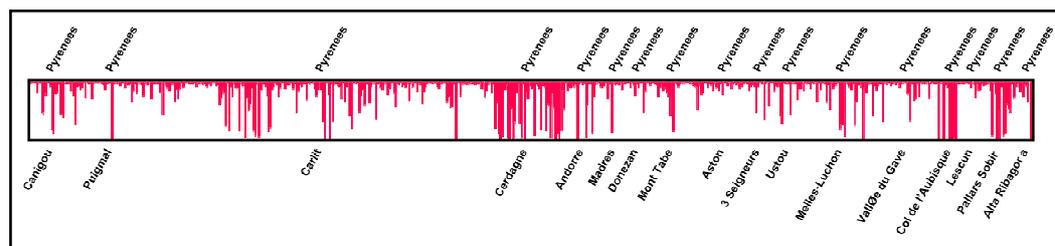


Figura 2b: Individuos estadísticamente híbridos o soltados en el seno de las 17 poblaciones salvajes de los Pirineos.

Los individuos potencialmente introgresados (n=229) se encuentran en todas las poblaciones salvajes en proporciones diversas. De este modo, en el macizo pirenaico cerca del 38% de los individuos muestran una introgresión de genes de perdiz de criaderos. Esta nueva estimación es superior al índice de introgresión genética de perdices pardillas de los Pirineos, inicialmente estimado en el 12,2% (Martin *et al.*, 2003).

Esta diferencia se debe al tipo de marcadores moleculares utilizado. De hecho, los marcadores mitocontriales empleados en el estudio de Martin et al. (2003), son conocidos por contar con una heredabilidad exclusivamente materna que oculta de este modo la señal genética de la introgresión sobre los linajes macho. De este modo, la estimación de la introgresión genética se ve fuertemente subestimada.

La distribución geográfica y los índices de introgresión genética se representan en la figura 3.

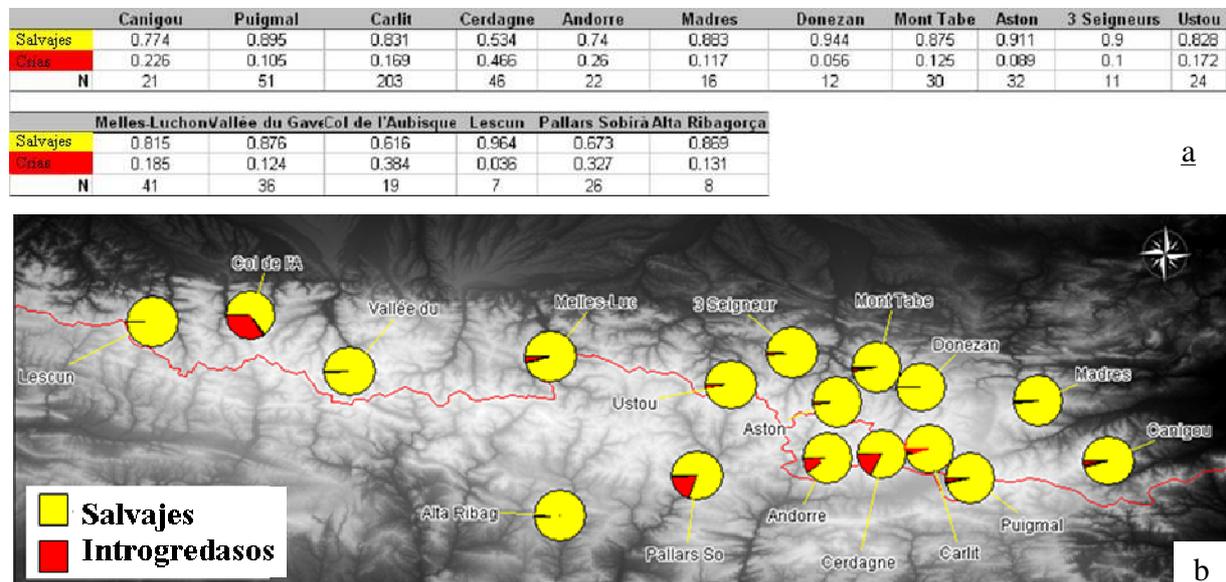


Figura 3: a. Distribución de la introgresión genética (%) en el seno de las poblaciones de perdices pardillas de los Pirineos.

b. Representación cartográfica de esta introgresión genética.

No obstante, existe una diferencia genética significativa entre las perdices de criaderos españoles y las perdices de criaderos franceses (F_{st} media=0.054, $P=0.05$). De este modo, hemos representado la parte de cada uno de los dos criaderos (francés o español) en cada población salvaje de los Pirineos (consultar figura 4).

	Canigou	Puigmal	Carlit	Cerdagne	Andorre	Madres	Donezan	Mont Tabe	Aston
Salvajes	0.947	0.962	0.944	0.816	0.896	0.979	0.989	0.964	0.974
Cría de España	0.023	0.009	0.018	0.083	0.035	0.007	0.005	0.019	0.014
Cría de Francia	0.030	0.028	0.038	0.101	0.069	0.014	0.006	0.017	0.011
	3 Seigneurs	Ustou	Melles-Luchon	Vallée du Gave	Col de l'Aubisque	Lescun	Pallars Sobirà	Alta Ribagorça	
Salvajes	0.979	0.968	0.951	0.982	0.649	0.991	0.797	0.983	
Cría de España	0.009	0.020	0.012	0.013	0.012	0.006	0.184	0.013	
Cría de Francia	0.012	0.012	0.036	0.005	0.339	0.003	0.019	0.004	a

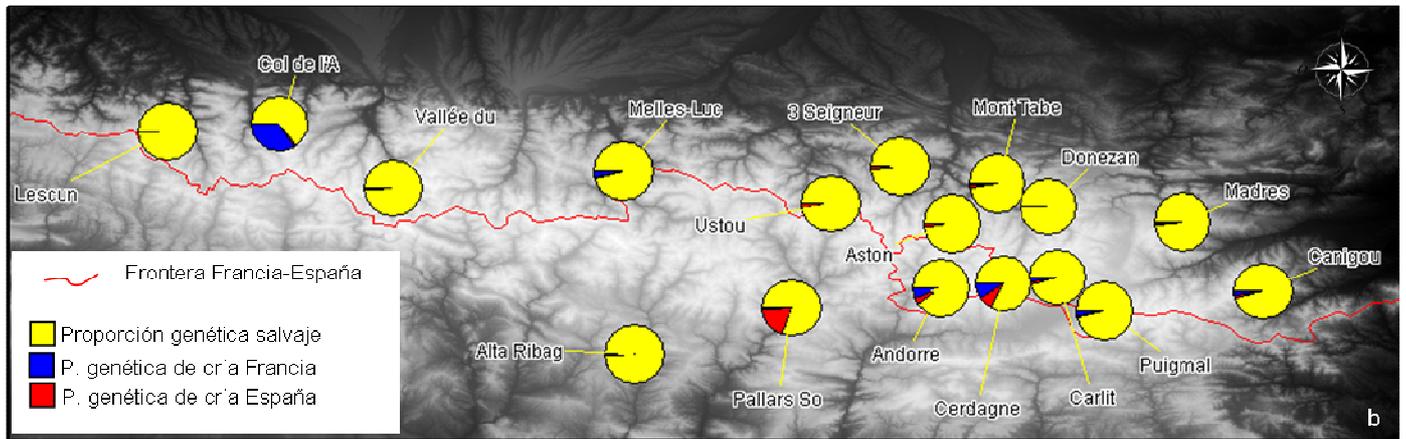


Figura 4: a. Distribución de la introgresión genética (%) en el seno de las poblaciones de perdices pardillas de los Pirineos.

b. Representación cartográfica de esta introgresión genética.

La huella genética de las perdices de criaderos se encuentra principalmente en las poblaciones de Pallars Sobirà, Cerdaña, Andorra y en el Col de l'Aubisque. Estos resultados concuerdan con las prácticas de sueltas ampliamente extendidas hasta hace muy poco sobre estas poblaciones. Señalamos igualmente que las poblaciones situadas en Andorra y en Cerdaña revelan una introgresión genética que procede a la vez de los criaderos españoles y franceses. Existen diversos factores que permiten explicar la escasa proporción de individuos introgresados en las restantes poblaciones: (1) la escasa dispersión de las perdices pardillas, lo que efectivamente limitaría la propagación de los genes de criadero en el medio, y (2) el escaso índice de supervivencia post-sueltas de las aves de criadero (Guitart, Cassaing, 2000, Claude NOVOA Comm. Pers.), dependiendo sobre todo la contribución de estas aves a la introgresión genética de las poblaciones salvajes de la cantidad de aves soltadas. Esto podría explicar los índices de introgresión elevados que se han encontrado a nivel de las poblaciones del Aubisque, Andorra, Cerdaña y Pallars Sobirà, poblaciones conocidas por ser objeto de sueltas regulares.

➔ *Origen de la diferenciación entre perdices de criaderos franceses y españoles:*

La diferenciación genética entre las perdices de criaderos franceses y las perdices de criaderos españoles se explica por la proximidad genética de las perdices de criaderos franceses con las perdices pardillas salvajes situadas en la cuenca parisina (consultar la figura 5). En efecto, en esta figura se muestra que las perdices soltadas en el lado francés se parecen más a las perdices pardillas de llanura (*P.p. armoricana*) que a las perdices pardillas de montaña (*P.p. hispaniensis*). Estas dos subespecies son alopátricas y poseen exigencias ecológicas bien diferentes. De este modo, la hibridación entre perdices pardillas salvajes autóctonas y perdices pardillas de criadero de llanura representa un riesgo importante en cuanto a la integridad genética de la subespecie *P.p. hispaniensis*. Por el contrario, el criadero de Esterri d'Aneu se ha realizado, al menos en parte, a partir de perdices pardillas salvajes capturadas en la naturaleza. En este sentido, este criadero no presenta ningún riesgo de importancia para la integridad genética de las perdices pardillas salvajes repobladas. No obstante, la posición alejada de este centro de cría en el plano factorial de la figura 5 revela una cierta divergencia genética de las perdices en cautividad con respecto a las perdices salvajes de los Pirineos. Esta divergencia podría deberse a una deriva genética intrínseca a la cría resultante en potencia de un efecto de consanguineidad.

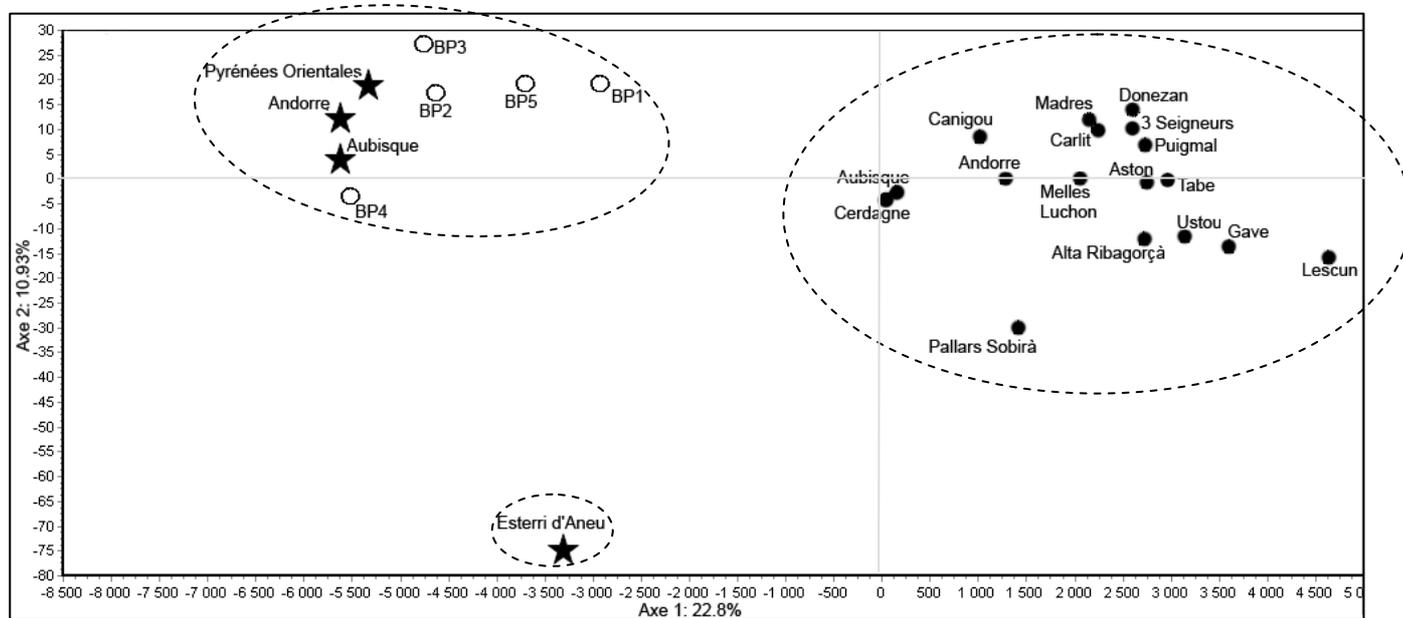


Figura 5: Análisis Factorial de Correspondencias (AFC) realizado con el programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996) sobre la base de la distribución de los genotipos de cada individuo. Las estrellas representan las poblaciones de perdices pardillas soltadas en los Pirineos. Los círculos negros representan las poblaciones de perdices pardillas salvajes de los Pirineos. Los círculos blancos representan las poblaciones de perdices pardillas salvajes situadas en la cuenca parisina. Las elipses han sido añadidas *a posteriori* con ayuda de una clasificación jerárquica ascendente.

IV/ Estructuración genética de las poblaciones de perdices pardillas salvajes en los

Pirineos:

Los métodos estadísticos nos han permitido distinguir los individuos salvajes de los individuos introgresados, por lo que hemos podido lanzar análisis de estructuración genética de las perdices pardillas de los Pirineos sin tener en cuenta a los individuos introgresados. Los primeros resultados indican que no hay diferencia significativa en la distribución de la diversidad genética dentro de las poblaciones pirenaicas (H_e , test de Friedman, $N=12$, $ddl=16$, $P=0.493$), (AR, test de Friedman, $N=12$, $ddl=16$, $P=0.452$). Por el contrario, los análisis de estructuración genética revelan diferencias genéticas significativas entre ciertas poblaciones (F_{st} medio de 0.041 ± 0.029). Además, estas distancias genéticas se correlacionan positivamente con las distancias geográficas euclidianas, revelando un aislamiento debido a la distancia (consultar figura 6).

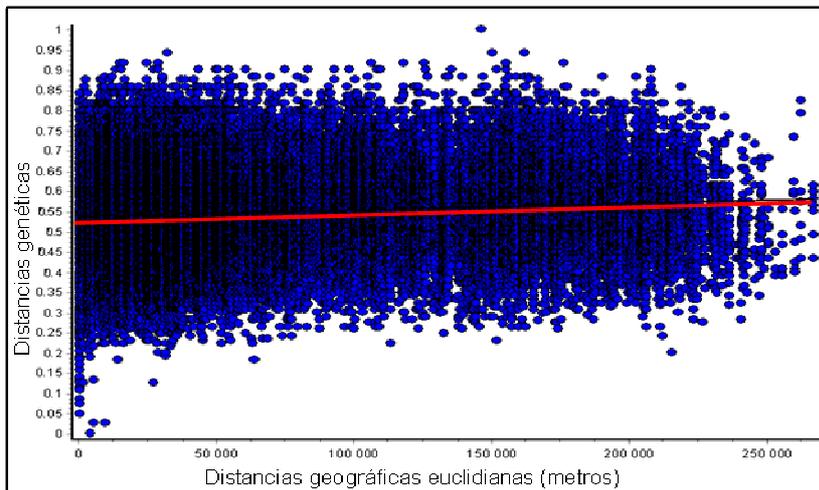


Figura 6: Test de Mantel realizado con el programa ALLELE IN SPACE (Miller, 2005). Regresión lineal entre distancias genéticas por par de individuos y distancias geográficas euclidianas ($r^2= 0.0091$; $p=0.0009$)

El aislamiento debido a la distancia se conoce en muchas galliformes (Bech *et al.*, 2009; Caizergues *et al.*, 2003; Caizergues *et al.*, 2001). Esta estructuración genética espacial, llamada de “vecindad” y caracterizada por flujos génicos de proximidad, se explica a menudo por el comportamiento de las aves que limitan sus movimientos a localidades próximas. Las distancias de dispersión registradas por la telemetría y evaluadas con ayuda de una herramienta genética parecen confirmar este resultado. Efectivamente, según el estado actual de los conocimientos, las distancias de dispersión post-nacimiento de las perdices pardillas jóvenes, determinadas por el seguimiento por radio, no sobrepasan los 11 kilómetros.

V/ Estado de conservación de la diversidad genética de las perdices pardillas del criadero de Esterri d’Aneu:

Para realizar el seguimiento de la diversidad genética de las perdices pardillas del criadero de Esterri d’Aneu en el tiempo, hemos escindido la muestra en dos conjuntos. Estos conjuntos se han realizado a partir del año de nacimiento de cada individuo. De este modo, el primer conjunto engloba las perdices nacidas entre 2003 y 2005, y el segundo las perdices nacidas entre 2007 y 2009.

Se ha conocido la diversidad genética gracias a la ayuda de dos índices de diversidad genética, que son: la riqueza alélica (AR) y la heterocigicidad (He).

Los primeros resultados indican que hay una pérdida de diversidad genética significativa entre las perdices nacidas entre 2003 y 2005 y las perdices nacidas entre 2007 y 2009. Este empobrecimiento genético podría explicarse por un régimen consanguíneo resultante de la detención de las “reintroducciones” (aporte de individuos salvajes) dentro de un criadero. En comparación con las diversidades genéticas medias calculadas en diversos centros de cría franceses (que han servido para repoblar las poblaciones de perdices pardillas situadas en los Pirineos y la cuenca parisina) así como en diversas poblaciones salvajes de los Pirineos, el criadero de Esterri d’Aneu presenta en la actualidad diversidades genéticas inferiores, mientras que entre 2003 y 2005 estas diversidades genéticas eran bastante más elevadas (consultar figura 7). Se debe observar no obstante que la reagrupación, en la muestra inicial, de perdices procedentes de diferentes criaderos ha podido aumentar de manera artificial la riqueza alélica de las poblaciones de los criaderos. Esto es igual para las poblaciones salvajes.

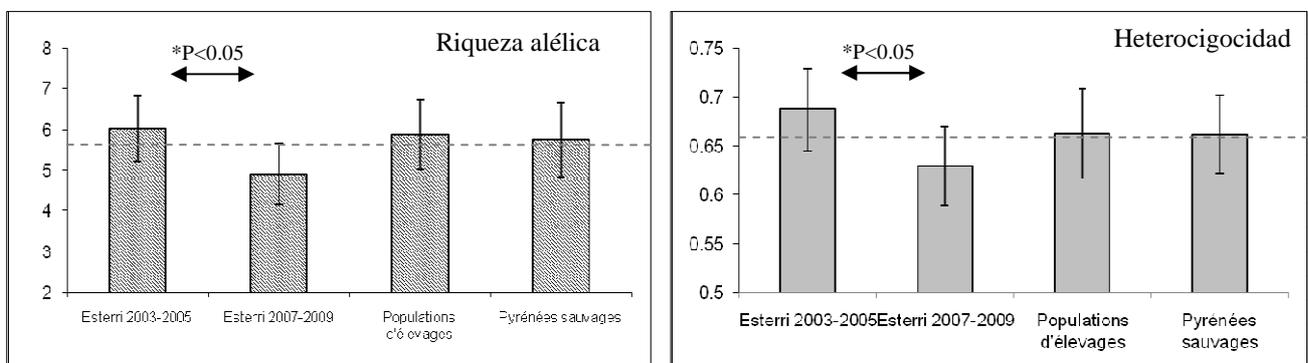


Figura 7: Índices de diversidad genética para las poblaciones de Esterri 2003-2005, Esterri 2007-2009, de diferentes criaderos y de perdices pirenaicas salvajes. Las líneas de puntos pardillas representan las medias de riqueza alélica y de heterocigicidad. La importancia del test entre Esterri 2003-2005 y Esterri 2007-2009 se ha estimado con ayuda de un test de Wilcoxon implementado en el programa SPPS.

Este empobrecimiento genético entre 2003-2005 y 2007-2009 se ha acompañado de una diferenciación genética significativa. Esta diferenciación se ha estimado en alrededor del 2%, y se debería a una deriva genética intrínseca a la cría.

➔ *Conclusión:*

Situado en el corazón de los Pirineos y fundado a partir de perdices salvajes de los Pirineos, el centro de cría de Esterrí d'Aneu representa un interés muy particular para las operaciones de refuerzo de las poblaciones de perdices pardillas en los Pirineos. Sin embargo, su posición marginal sobre el plano factorial junto con un empobrecimiento genético en el transcurso de los últimos años plantea dudas para futuras sueltas. En efecto, aunque las perdices de criaderos actuales son descendientes de perdices salvajes pirenaicas, no lo es menos que las mismas se han convertido con el tiempo en perdices diferenciadas genéticamente de las perdices salvajes actuales. De esta forma, la continuación de sueltas a partir de este "stock" de criaderos podría traducirse en una hibridación entre perdices de criadero soltadas y perdices salvajes, lo que podría dar como resultado una pérdida de las adaptaciones locales y un riesgo de empobrecimiento de las poblaciones de perdices salvajes.

Se pueden considerar diversas recomendaciones. La primera recomendación consistiría en recrear un nuevo stock reproductor a partir de algunos individuos salvajes que se conservan en la actualidad en el centro separados de las aves de cría. Este stock debería ser, en la medida de lo posible, vuelto a introducir con regularidad junto con individuos salvajes con objeto de evitar, como anteriormente ocurrió, una divergencia genética intrínseca a la cría.

Otra recomendación podría ser la reconstitución de un stock reproductor a partir de individuos de criaderos los más próximos posible genéticamente hablando a las perdices salvajes. Aquí igualmente se deberían realizar "reintroducciones" regulares a partir de individuos salvajes, ya que serían determinantes para el mantenimiento de la diversidad genética del criadero.

En todos los casos, considerando que todas las poblaciones naturales de perdices pardillas de los Pirineos cuentan con un cierto nivel de introgresión, no será posible hacer desaparecer por completo esta introgresión de genes de perdiz de criadero en las poblaciones salvajes como en las de los criaderos, ya que es de esperar que exista un fondo de introgresión genética residual. Sin embargo, podemos esperar una amortiguación de estos índices de introgresión genética con el paso de las generaciones si las perdices de los criaderos soltadas se aproximan genéticamente a un perfil "pirenaico".

Bibliografia

- Barilani M, Bernard-Laurent A, Mucci N, *et al.* (2007) Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biological Conservation* **137**, 57-69.
- Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* **10**, 551-568.
- Bech N, Boissier J, Drovetski S, Novoa C (2009) Population genetic structure of rock ptarmigan in the 'sky islands' of French Pyrenees: implications for conservation. *animal conservation* **12**, 138-146.
- Bech N, Novoa C, Allienne JF, Boissier J (2010) Transferability of microsatellite markers among economically and ecologically important galliform birds. *Genetics and Molecular Research* **9**, 1121-1129.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.
- Birkan M (1971) Réussite des lâchers de perdrix grise (*Perdix perdix*) et de perdrix rouge (*Alectoris rufa*) d'élevage. *Bulletin du Conseil Supérieur de la Chasse* **15** 44-56.
- Blanc P, Ledème P, blanc C-P (1986) variation géographique de la diversité génétique chez la perdrix grise (*Perdix perdix*). *Gibier Faune Sauvage* **3**, 5-41.
- Caizergues A, Bernard-Laurent A, Brenot JF, Ellison L, Rasplus JY (2003) Population genetic structure of rock ptarmigan *Lagopus mutus* in Northern and Western Europe. *Molecular Ecology* **12**, 2267-2274.
- Caizergues A, Dubois S, Mondor G, *et al.* (2001) Genetic structure of Black Grouse (*Tetrao tetrix*) populations of the French Alps. *Genetic Selection Evolution* **33 (Suppl. 1)**, S177-S191.
- Effenberger S, Suchentrunk F (1999) Population genetics of grey partridge (*Perdix perdix*) in Austria-preliminary results. *Hungarian small game bulletin* **5**, 179-181.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe D (2002) Introduction to Conservation Genetics. *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Gomez-Moliner BJ (2007) caracterizacion de las poblaciones de perdiz pardilla dal pirineo catalan mediante el analisis de ADN mitochondrial. *rapport de stage*.
- Guitart SS, Cassaing J (2000) Suivis de perdrix grises (*Perdix perdix*) d'élevage utilisées pour le renforcement de populations de montagne de *P.p. hispaniensis*. *vie et milieu* **50**, 39-43.
- Liukkonen-Anttila T, Uimaniemi L, Orell M, Lumme J (2002) Mitochondrial DNA variation and the phylogeography of the grey partridge (*Perdix perdix*) in Europe: from Pleistocene history to present day populations. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 971-982.
- Martin JF, Novoa C, Blanc-Manel S, Taberlet P (2003) Les populations de perdrix grise des Pyrénées (*Perdix perdix hispaniensis*) ont-elles subi une introgression génétique à partir d'individus d'élevage? Analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondrial. *Les Actes du Bureau des Ressources Génétiques* **4**, 115-126.
- Mautner S (2001) Genetic variability, inbreeding risk and fertility in the grey partridge (*Perdix Perdix*). *PhD thesis Vienna university*.
- Miller MP (2005) Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic information. *Journal of Heredity* **96**, 722-724.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Uimaniemi L, Lumme J, Putaala A, Hissa R (1999) Conservation status of the finnish grey partridge (*Perdix perdix lucida*). *Hungarian small game bulletin* **5**, 165-170.

Les partenaires / Los socios:



www.gallipyr.eu

