

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE 10 *LOCI* ENZIMÁTICOS EN PERDICES ROJAS (*ALECTORIS RUFA*) MANTENIDAS EN CAUTIVIDAD

ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF 10 ENZYME *LOCI* IN CAPTIVE-REARED RED-LEGGED PARTRIDGES (*ALECTORIS RUFA*)

Tejedor, M.T., L.V. Monteagudo y M.V. Arruga

Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Área de Genética. Facultad de Veterinaria. 50013 Zaragoza. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Polimorfismo. Variabilidad genética. Índices de fijación.

ADDITIONAL KEYWORDS

Polymorphism. Genetic variability. Fixation indices.

RESUMEN

Se han analizado muestras individuales correspondientes a 105 perdices rojas (*Alectoris rufa*) criadas en cautividad y pertenecientes a 10 explotaciones españolas distintas, dedicadas a la cría de perdices para repoblación.

Se han considerado 10 *loci* enzimáticos independientes: *PGD*, *GPI*, *ME1*, *GOT1*, *IDH1*, *LDHA*, *LDHB*, *MDH1*, *MDH2* y *MPI*. Mientras que *LDHB* y *MDH2* resultaron ser monomórficos, *ME1* e *IDH1* presentaron tres y dos alelos respectivamente. En el resto, se apreció la presencia de un alelo próximo a la fijación junto con otro u otros dos de baja frecuencia.

Es de destacar la presencia de formas anormales de LDH en cinco individuos de la misma explotación, con sólo una, dos o tres bandas, frente a las cinco bandas habituales, que podrían explicarse por la hipotética existencia de un alelo sin actividad para LDHA (*LDH*A*). La población de granja mostró, en su conjunto, un valor de F_{IS} significativo ($F_{IS} = 0,3501$; $p < 0,05$). La comparación de esta población de granja con un grupo

de 174 perdices rojas silvestres procedentes de diversas regiones españolas presentó un valor de F_{ST} significativo aunque bajo ($F_{ST} = 0,0712$; $p < 0,05$). Los *loci* que resultaron más informativos para apreciar estas diferencias fueron *GOT1* ($F_{ST} = 0,0087$; $p < 0,05$), *IDH1* ($F_{ST} = 0,1115$; $p < 0,05$) y *MPI* ($F_{ST} = 0,0251$; $p < 0,05$).

SUMMARY

Individual samples from 105 captive-reared red legged partridges (*Alectoris rufa*) were analyzed. They belonged to ten farms, devoted to restocking game preserves.

Ten independent isozyme *loci* were considered: *PGD*, *GPI*, *ME1*, *GOT1*, *IDH1*, *LDHA*, *LDHB*, *MDH1*, *MDH2* and *MPI*. *Loci* for *LDHB* and *MDH1* showed to be monomorphic ones. *ME1* and *IDH1* showed three and two alleles, respectively. The rest of studied *loci* only showed one allele near fixation and one or two rare alleles.

As an interesting result, abnormal images for LDH, composed of one, two or three bands, were found in five individuals from the same farm. Normal images, consisting in five bands, were seen in the rest of studied birds. Abnormal images might be explained by one hypothetic allele without LDHA activity (*LDHA**-). The farm population showed a significant F_{IS} value ($F_{IS}=0.3501$; $p<0.05$), when considered as a whole. This population was compared to a group of 174 wild-living red-legged partridges, coming from several Spanish regions. The obtained F_{ST} value was significant, but small ($F_{ST}=0.0712$; $p<0.05$). The most informative *loci* for this comparison were *GOT1* ($F_{ST}=0.0087$; $p<0.05$), *IDH1* ($F_{ST}=0.1115$; $p<0.05$) and *MPI* ($F_{ST}=0.0251$; $p<0.05$).

INTRODUCCIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es la reina de la caza menor en España. Cada año, miles de cazadores se dedican a su afición favorita creando un volumen de negocio que se ha convertido en un importante recurso económico de las regiones ricas en caza. Sin embargo, la caza continuada y diversas condiciones ambientales cambiantes (sequía, uso de pesticidas, abandono de tierras de labor, empleo de cosechadoras, desaparición de barbechos y ribazos, pastoreo destructivo, etc) ha llevado a la especie a una paulatina disminución de efectivos, muy notable desde el año 1960 y que se continúa apreciando en los últimos años.

Por ello, en muchos cotos se está llevando a cabo la introducción de ejemplares criados en cautividad, a menudo con escaso o nulo control de su calidad genética. En la actualidad, cotos (en todas sus modalidades) y sociedades de cazadores adquieren alrededor de

3,5 millones de ejemplares por año con un coste de alrededor de 6000 millones de pesetas, con objeto de liberarlos y cubrir la diferencia entre la producción natural y la demanda.

Es alarmante el riesgo de que se introduzcan especies foráneas en nuestros territorios. La perdiz roja se hibrida fácilmente con la perdiz griega (*Alectoris graeca*). Esta última especie presenta muy diferente plumaje y es por su comportamiento en los lancés de caza mucho menos apreciada. Pero también posee mayor talla y prolificidad y es de más fácil cría en cautividad, lo que habría podido llevar de forma accidental o intencionada a su introducción en los esquemas productivos de perdices *aparentemente rojas* que podrían ser liberadas al medio. Es más, aún cuando se estuviera repoblando con perdiz roja en pureza, podría existir el riesgo de reducir seriamente la biodiversidad al introducir en masa, y año tras año, animales con menor variabilidad genética que acabarían así por degradar el patrimonio genético de la especie y poner en peligro un recurso natural de primer orden.

El objetivo de este trabajo es iniciar el estudio de las perdices rojas de granja desde un punto de vista genético, con la intención de hacer posible su comparación con las perdices rojas silvestres y comenzar a responder la pregunta ¿puede suponer la repoblación un cambio o sustitución de la población existente por otra genéticamente diferente?.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado muestras indivi-

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PERDICES ROJAS EN CAUTIVIDAD

Tabla I. Composición de la población de granja analizada. (Geographic origin of the analysed farm partridges).

Origen	Efectivo
Segovia	62
Pontevedra	16
La Coruña	6
Zaragoza 1	4
Zaragoza 2	4
Albacete 1	4
Albacete 2	3
Huesca 1	2
Huesca 2	2
Madrid	2
TOTAL	105

duales correspondientes a 105 perdices rojas criadas en cautividad y pertenecientes a un conjunto de 10 explotaciones distintas a las que hemos tenido acceso (**tabla I**). Se trata de aves inicialmente de origen silvestre, aunque se mantienen en cautividad desde hace un número indeterminado de generaciones y la reproducción se realiza de forma aislada dentro de cada explotación. Dado el pequeño efectivo analizado en la mayoría de las explotaciones consideradas, para el análisis poblacional se ha considerado la totalidad de individuos en su conjunto, que de esta manera forman la así denominada población de granja.

Como término de comparación, hemos utilizado la información correspondiente a un total de 172 perdices rojas, capturadas en el campo en diversas regiones españolas (Galicia, Castilla-León, Santander, La Rioja,

Aragón, Extremadura, Castilla-La Mancha, Valencia, Murcia y Andalucía), y que han sido ya objeto de varias publicaciones (Tejedor *et al.*, 1995; Arruga *et al.*, 1996 y 1998). Estos animales constituyen globalmente lo que denominamos población silvestre.

Para los análisis enzimáticos realizados se han utilizado muestras individuales de sangre y de hígado. Los extractos tisulares y los hemolizados se han obtenido diluyendo con el mismo volumen de tampón de Shaws (0,01M Tris/HCl pH7,5; 0,0001 M DTT y 0,001M EDTA), y tras varios ciclos de congelación y descongelación se congelaron en alícuotas a -80°C. De este modo, cada alícuota sólo se descongela una vez antes de su análisis, asegurando la repetibilidad de la imagen electroforética entre muestras y entre alícuotas dentro de una muestra.

En el presente trabajo se han analizado 10 *loci* enzimáticos independientes, que controlan la síntesis de los siguientes enzimas del metabolismo intermediario:

- 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD, E.C. 1.1.1.44).
- Glucosafosfato isomerasa (GPI, E.C. 5.3.1.9).
- Enzima málico 1 (EM1, E.C. 1.1.1.40).
- Glutámico-oxalacético transaminasa (GOT1, E.C. 2.6.1.2).
- Isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1, E.C. 1.1.1.42).
- Lactato deshidrogenasa A (LDH A, E.C. 1.1.1.27).
- Lactato deshidrogenasa B (LDH B, E.C. 1.1.1.27).

- Malato deshidrogenasa 1 (MDH1, E.C.1.1.1.37).
- Malato deshidrogenasa 2 (MDH2, E.C.1.1.1.37).
- Manosa fosfato isomerasa (MPI, E. C. 5.3.1.8).

La elección de los *loci* enzimáticos se ha realizado únicamente teniendo en cuenta la disponibilidad de técnicas y materiales en nuestro laboratorio, independientemente de la variabilidad de los mismos en aves.

Como soporte para la electroforesis se usaron tiras de acetato de celulosa, lo que permitió economizar muestra y productos de tinción. Tras un desarrollo electroforético que no superó en ningún caso las tres horas, las variantes de cada enzima se pusieron de manifiesto mediante una tinción específica, basada en el uso del sustrato específico para el enzima en cuestión. Se obtuvo así una mancha en el punto donde se encontraba la variante enzimática, que podía observarse directamente o bajo luz ultravioleta, según los casos. Los tampones, las condiciones electroforéticas y las tinciones enzimáticas se adaptaron de las técnicas originales de Meera Khan (1971), Harris y Hopkinson (1976), Van Someren *et al.* (1974) y Womack y Moll (1986). Por convenio, se denominaron las variantes con las letras del alfabeto en orden decreciente de movilidad electroforética.

En los estudios poblacionales se ha utilizado el programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996-1998). Este programa permite el cálculo de un conjunto de parámetros poblacionales (frecuencias alélicas, parámetros de polimorfismo, índices de fijación F de

Wright, D de Nei) y propone el estudio de su significación estadística mediante el empleo de test de remuestreo del tipo de las permutaciones. Así, genera la distribución de un parámetro concreto bajo la correspondiente hipótesis nula por permutaciones adecuadas obtenidas a partir del fichero de datos. El valor observado sobre los datos reales se compara con la distribución obtenida y permite obtener una estimación de la probabilidad de obtener un valor igual o superior al valor observado bajo la Hipótesis nula. (H_0). Según los autores del programa (Belkhir *et al.*, 1996-1998), esta aproximación es preferible a los tests paramétricos usuales porque las leyes de distribución de los estimadores poblacionales son en general mal conocidas (Weir, 1996), y resulta muy apropiada cuando se trabaja con tablas de contingencia con pocas observaciones en cada caso, de modo que constituye una alternativa a los test exactos cuando éstos existen.

Los parámetros de polimorfismo utilizados en este trabajo son los siguientes: heterocigosidad esperada en situación de equilibrio de Hardy-Weinberg, corregida para el sesgo de muestreo ($H_{exp.}$, Nei, 1978), heterocigosidad observada ($H_{obs.}$), proporción de *loci* polimórficos donde la frecuencia del alelo más frecuente es 0,95 ($P(0,95)$), idem para 0,99 ($P(0,99)$), número medio de alelos por *locus* (A/l).

Los índices de fijación o estadísticos F se denominan F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} (Wright, 1965) y son calculados por el programa citado mediante la metodología de Weir y Cockerham (1984). F_{IS} y F_{IT} miden, respectivamente, el exceso o defecto promedio de heterocigotos en cada po-

blación y en el total considerado como un conjunto. Estos estadísticos pueden tener valores positivos o negativos, según exista defecto o exceso de heterocigotos. F_{ST} estima el grado de diferenciación genética entre poblaciones. Su valor oscila entre 0 y 1, de modo que puede ser usado como una medida de distancia genética entre poblaciones (Weir, 1990). El error estándar de estos parámetros se ha estimado por remuestreo según el método de *jackknife* sobre los *loci* (Weir, 1990).

Para testar la existencia de equilibrio genético de Hardy-Weinberg se parte del valor de F_{IS} . El programa genera la distribución de F_{IS} correspondiente bajo la hipótesis nula (existencia de equilibrio) mediante permutación de alelos entre individuos. El valor de F_{IS} observado sobre datos reales se compara con la distribución

obtenida y esto permite estimar la probabilidad de obtener un valor igual o superior al valor observado bajo la hipótesis nula. De la misma manera, el programa estima la significación de los valores de F_{IT} (a través de permutación global sobre los alelos) y F_{ST} (mediante permutación global de los individuos).

El valor de D ha sido estimado por el programa en función de la fórmula de Nei (1978), que introduce una corrección para el sesgo de muestreo de los individuos. La significación del valor de D obtenido también se testa determinando su probabilidad bajo la hipótesis nula ($D=0$) utilizando métodos de remuestreo por permutación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VARIABILIDAD ELECTROFORÉTICA

La especial situación encontrada en lo que se refiere a los *loci* LDHA y LDHB hace necesaria una explicación detallada. Dichos *loci* controlan una misma actividad enzimática. El enzima lactato deshidrogenasa funcional es una proteína compleja formada por la unión de cuatro subunidades simples denominadas monómeros; el enzima completo es, por tanto, un tetrámero.

Cada uno de los *loci* indicados controla un tipo de monómeros, denominados respectivamente A y B. El comportamiento electroforético de estos monómeros es diferente: el monómero B se mueve hacia el polo positivo y el monómero A lo hace hacia el negativo. Para formar el enzima funcional, es preciso que se unan cuatro de estos monómeros, pero no es necesario que sean del mismo tipo y de hecho las

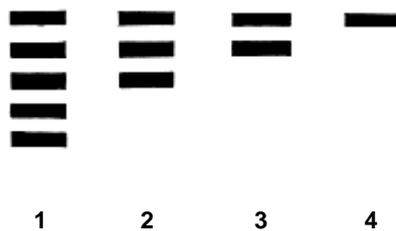


Figura 1. Diagrama de los patrones normales y anómalos de LDH, mostrando la estructura polimérica de las bandas observadas. 1: $B_4, B_3A_1, B_2A_2, B_1A_3, A_4$; 2: B_4, B_3A_1, B_2A_2 ; 3: B_4, B_3A_1 ; 4: B_4 . (Diagram about normal and abnormal patterns of LDH in partridge, showing polymeric structure of observed bands. 1: $B_4, B_3A_1, B_2A_2, B_1A_3, A_4$; 2: B_4, B_3A_1, B_2A_2 ; 3: B_4, B_3A_1 ; 4: B_4).

Tabla II. Frecuencias alélicas \pm error estándar para los loci variantes. (Allele frequencies \pm standard error for variable loci).

Locus	Alelos	Granja (n)	Silvestre (n)
<i>PGD</i>		(101)	(172)
<i>PGD</i> *A	—	—	0,0058 \pm 0,0041
<i>PGD</i> *B	0,9703 \pm 0,0118	—	0,9506 \pm 0,0118
<i>PGD</i> *C	0,0297 \pm 0,0118	—	0,0436 \pm 0,0109
<i>GPI</i>		(105)	(172)
<i>GPI</i> *A	—	—	0,0029 \pm 0,0028
<i>GPI</i> *B	0,0048 \pm 0,0004	—	—
<i>GPI</i> *C	0,9952 \pm 0,0004	—	0,9971 \pm 0,0028
<i>ME1</i>		(43)	(171)
<i>ME1</i> *A	—	—	0,0760 \pm 0,0141
<i>ME1</i> *B	0,1512 \pm 0,0387	—	0,3421 \pm 0,0257
<i>ME1</i> *C	0,8023 \pm 0,0424	—	0,5614 \pm 0,0268
<i>ME1</i> *D	0,0465 \pm 0,0224	—	0,0205 \pm 0,0077
<i>GOT1</i>		(105)	(171)
<i>GOT1</i> *A	0,0714 \pm 0,0178	—	0,0292 \pm 0,0091
<i>GOT1</i> *B	0,9000 \pm 0,0207	—	0,9064 \pm 0,0158
<i>GOT1</i> *C	—	—	0,0497 \pm 0,0114
<i>GOT1</i> *D	—	—	0,0117 \pm 0,0058
<i>GOT1</i> *E	0,0286 \pm 0,0115	—	0,0029 \pm 0,0028
<i>IDH1</i>		(95)	(172)
<i>IDH1</i> *A	0,2263 \pm 0,0303	—	0,4680 \pm 0,0268
<i>IDH1</i> *B	0,7737 \pm 0,0303	—	0,5320 \pm 0,0268
<i>LDHA</i> (90)		(54)	
<i>LDH</i> *A	0,9611 \pm 0,0144	—	1,000
<i>LDH</i> *A ⁻	0,0389 \pm 0,0144	—	—
<i>MDH2</i>		(92)	(54)
<i>MDH2</i> *A	1,000	—	0,9904 \pm 0,0094
<i>MDH2</i> *B	—	—	0,0096 \pm 0,0094
<i>MPI</i>		(43)	(172)
<i>MPI</i> *A	—	—	0,0087 \pm 0,0152
<i>MPI</i> *B	0,9884 \pm 0,0114	—	0,9215 \pm 0,0145
<i>MPI</i> *C	0,0116 \pm 0,0114	—	0,0698 \pm 0,0138

uniones se producen al azar, con lo que son posibles cinco tipos de asociaciones: B_4 , B_3A_1 , B_2A_2 , B_1A_3 , A_4 .

Dada la diferente movilidad electroforética de los monómeros A y B, cada uno de los conjuntos anteriores corresponde a una banda de diferente movilidad, de modo que el orden indicado es decreciente respecto al polo positivo (**figura 1**). Así pues, es posible identificar los diferentes monómeros que aparecen en un individuo concreto.

La gran mayoría de los individuos estudiados, tanto de granja como silvestres, presentan las cinco bandas esperadas. Pero en la población de granja dos individuos presentan sólo una banda, la más rápida, correspondiente a B_4 , otros dos individuos presentan únicamente las tres primeras bandas (B_4 , B_3A_1 , B_2A_2) y un individuo presentó sólo las dos primeras bandas (B_4 y B_3A_1). Todos estos individuos corresponden a una única explotación (Segovia). Esta situación parece indicar la presencia de un alelo no activo para el locus LDHA, que representamos en principio como LDH^*A^- .

De este modo, si un individuo es homocigoto LDH^*A^-/LDH^*A^- , no tiene posibilidad de formar monómeros A que tengan actividad enzimática, de manera que los únicos tetrámeros activos que puede presentar serían de tipo B_4 , con lo cual su imagen sería una única banda rápida. De acuerdo con esta hipótesis de trabajo, un individuo heterocigoto LDH^*A^-/LDH^*A^- sólo formaría la mitad de monómeros activos que tendría un individuo normal. La escasez de monómeros activos de tipo A evitaría en la práctica la formación de las bandas más lentas de lactato

deshidrogenasa, que presentan un elevado componente de monómeros A (B_1A_3 y A_4), de forma que sólo aparecen las bandas más rápidas, observándose también una menor actividad para las correspondientes a B_3A_1 y B_2A_2 , que llegaría hasta la desaparición de ésta última en algún caso. La falta de actividad o incluso la ausencia total de monómeros A en los individuos indicados se ve compensada por la presencia de monómeros B de actividad normal, por lo que estos individuos presentarían un aspecto general en principio normal.

No se ha encontrado en la bibliografía referencia alguna acerca de estas variantes en perdices; de hecho, trabajos anteriores realizados por otros investigadores en perdices rojas muestran a los *loci* *LDHA* y *LDHB* como monomórficos (Randi *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1993).

Estos trabajos se refieren tan sólo a un pequeño número de animales (entre 12 y 28), tanto silvestres (Sudoeste de España y de Francia) como de granja (situada en Italia). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de polimorfismo en la expresión génica de *LDHA* en eritrocitos de ovino (Serov *et al.*, 1975). En la especie humana se ha descrito un caso similar para el *locus* *LDHB* (Kitamura *et al.*, 1971) y en 1990 Maekawa *et al.*, describieron también una mutación génica responsable de la deficiencia de la actividad de la subunidad A de LDH. Dado que no se ha encontrado referencia bibliográfica alguna sobre su presencia en ninguna especie animal, resulta de gran importancia confirmar su existencia mediante el análisis de la descendencia de los individuos portadores.

FRECUENCIAS GÉNICAS

La **tabla II** muestra las frecuencias génicas de los *loci* *PGD*, *GPI*, *MEI*, *GOT1*, *IDH1*, *LDHA*, *MDH2* y *MPI* en las aves de granja y, como término de comparación, también en las silvestres analizadas hasta el momento. Los *loci* *LDHB* y *MDH1* resultaron ser invariantes en ambas poblaciones. La **tabla II** detalla también para cada *locus* el efectivo analizado (n).

El alelo *PGD*B* se encuentra próximo a la fijación tanto en perdices de granja como en silvestres, si bien en estas últimas aparece un alelo raro (*PGD*A*), que no se ha observado en la primera población.

Algo similar ocurre en el *locus* *GPI*, donde el alelo *GPI*C* está prácticamente fijado en ambas poblaciones, pero los alelos raros que le acompañan son distintos en cada una de ellas.

En el caso del *locus* *MEI*, dado que no se encuentra activo en eritrocitos, sólo se ha podido analizar en 43 perdices de granja, de las que se disponía de muestras de hígado. El alelo más frecuente es *MEI*C*, seguido por *MEI*B* y *MEI*D* en ambas poblaciones. Sin embargo, en las perdices silvestres aparece el alelo *MEI*A* con baja frecuencia, mientras que no se ha observado en granja, posiblemente por el bajo efectivo analizado.

Para el *locus* *GOT1*, en ambas poblaciones se aprecia que el alelo *GOT1*B* presenta una frecuencia muy elevada. Pero en las perdices silvestres se observan también los alelos raros *GOT1*A*, *GOT1*C*, *GOT1*D* y *GOT1*E*, mientras que en perdices de granja sólo se han observado *GOT1*A* y *GOT1*E*.

EN *IDH1*, debido a la escasez de las muestras utilizadas, sólo pudo analizarse en 95 de las aves de granja muestreadas. Aunque el *locus* es dialélico en las poblaciones estudiadas, la frecuencias son muy diferentes en una y en otra población.

En lo referente a *LDH A*, como ya se ha indicado sólo se aprecia variabilidad en una de las explotaciones estudiadas, con la presencia de un supuesto alelo inactivo (*LDH*A*). En lo referente a *LDH A*, como ya se ha indicado, sólo se aprecia variabilidad en una de las explotaciones estudiadas, con la presencia de un supuesto alelo inactivo (*LDH*A*). Por agotamiento de las muestras disponibles, sólo se analizó este *locus* en 90 de las perdices de granja y en 54 de las silvestres. Es patente la gran diferencia entre los efectivos analizados de granja y silvestres para este *locus*, y el hecho de que la variante rara *LDH*A* sólo se ha encontrado en una de las explotaciones no permite descartar que pueda existir en otras o incluso en la población silvestre, aunque hasta el momento no se haya observado.

El agotamiento de las muestras lleva a situaciones similares en cuanto a los *loci* *LDHB*, *MDH1* y *MDH2*. Tanto *LDHB* como *MDH1* aparecen como invariantes. El *locus* *MDH2* sólo presenta variabilidad en la población silvestre, aunque dicha variabilidad es muy reducida, ya que el alelo *MDH2*B* aparece en heterocigosis en un único individuo. En la población de granja, aunque su efectivo duplica al de la población silvestre, este *locus* es sin embargo monomórfico.

Finalmente, el *locus* *MPI*, que no se encuentra activo en eritrocitos, no

pudo analizarse más que en 43 perdices de granja a partir de las muestras de hígado disponibles. El alelo *MPI*B* se encuentra muy próximo a la fijación en ambas poblaciones consideradas, pero sobre todo en la población de granja, donde aparece *MPI*C* con muy baja frecuencia. En la población silvestre, además de estos dos alelos, se aprecia un tercer alelo, aún menos frecuente (*MPI*A*). Estos resultados por supuesto se ven influenciados por el tamaño de la muestra analizada, que resulta mucho menor en el caso de las perdices de granja.

En trabajos realizados por otros autores en perdiz roja, los *loci* *PGD*, *IDH*, *MDH1* y 2 y *MPI* aparecen como monomórficos, mientras que *ME1* y *GOT1* son dialélicos. (Randi *et al.*, 1992; Blanc *et al.*, 1993). Hay que tener presente que estos trabajos se refieren tan sólo a un pequeño número de animales (entre 12 y 28), tanto silvestres (Sudoeste de España y de Francia) como de granja (situada en Italia), situación que podría influir en la menor variabilidad detectada.

El estudio de cada *locus* concreto en las granjas consideradas con mayor efectivo analizado (Segovia, Pontevedra y La Coruña) mostró la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los casos, excepto para los *loci* *GOT1* y *LDHA* ($p < 0,05$) en la granja de Segovia. En los *loci* indicados, que por otro lado son los más variables en la granja en cuestión, se aprecia un defecto significativo de heterocigotos con respecto a la situación de equilibrio. En dicha granja se ha estimado un valor de F_{IS} de 0,4785 ($p < 0,05$), considerando globalmente todos los *loci* analizados. Este déficit significativo de heteroci-

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PERDICES ROJAS EN CAUTIVIDAD

Tabla III. Índices de diversidad genética de las poblaciones estudiadas. (Genetic diversity indexes of the studied populations).

Población	H exp.±e.s.	H. obs±e.s.	P(0,95)	P(0,99)	A/I
Granja	0,1038±0,1384	0,0676±0,1060	0,300	0,600	1,900
Silvestre	0,1504±0,2113	0,1284±0,1766	0,400	0,500	2,400

gotos se debería a procesos de deriva, a un posible efecto fundación o a la reproducción entre individuos emparentados, fenómenos todos ellos habituales en poblaciones pequeñas y cerradas. El defecto de heterocigotos podría explicarse también, al menos desde un punto de vista teórico, por procesos selectivos, pero la existencia de selección natural es difícil de demostrar (Grant & Price, 1981) y no hay constancia alguna de selección dirigida por el ganadero en este sentido.

En cuanto al conjunto global de aves de granja, se ha constatado la ausencia de equilibrio genético para los loci *PGD*, *GOT1*, *IDH1* y *LDHA*, con un defecto significativo ($p < 0,05$) de heterocigotos en todos los casos. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que estamos considerando como una única población a una serie de individuos que corresponden a varias granjas distintas, entre las que no existen relaciones reproductivas.

La **tabla III** muestra los índices de variabilidad genética para las poblaciones de granja y silvestre analizadas. Como puede apreciarse, los valores son siempre inferiores para la población de granja, a excepción del porcentaje de polimorfismo al nivel del 99%, que es superior en las perdices

de granja. Esta menor variabilidad de las perdices de granja sería también una consecuencia del hecho de que en realidad estamos considerando un conjunto de poblaciones pequeñas y aisladas.

En la **tabla IV** se muestran las estimaciones promedio de los índices de fijación F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} considerando los loci estudiados y las dos poblaciones analizadas. La tabla muestra también sus correspondientes errores estándar. Como ya se ha comentado, la distribución de los estimadores poblacionales resulta a menudo mal conocida y, por otro lado, se han analizado pocos loci y sólo dos poblaciones. Por estas razones, los errores estándar

Tabla IV. Estimaciones promedio de los índices de fijación (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}), considerando los loci estudiados y las dos poblaciones analizadas (granja y silvestre) con sus correspondientes errores estándar. (Mean estimations of fixation indexes (F_{IS} , F_{IT} and F_{ST}) considering all the studied loci in both analysed (farm and wild) populations with standar errors)

	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Media	0,2065	0,2630	0,0712
Error estándar	0,0581	0,0562	0,0218

calculados no permiten realizar tests precisos de hipótesis nula para los parámetros estimados, sino más bien apreciar la influencia del plan de muestreo (elección de *loci* y de poblaciones) sobre los valores medios de dichos parámetros.

Así pues, y como se ha indicado antes en el apartado correspondiente a material y métodos, se ha determinado la significación de los mencionados parámetros mediante métodos de remuestreo por permutación. En todos los casos se obtienen estimaciones significativamente diferentes de cero ($p < 0,05$).

Es de destacar que el valor de F_{IS} estimado es tan sólo un promedio para las dos poblaciones consideradas. El valor de F_{IS} estimado para la población de granja es de 0,3501 ($p < 0,05$), mientras que el estimado para la población silvestre es 0,1464 ($p < 0,05$). El valor más elevado que se aprecia en la población de granja podría deberse de nuevo a que la reproducción en dichas granjas se realiza de una forma cerrada y a partir de un reducido número de reproductores.

Los índices de variabilidad genética y el valor de F_{IS} calculados con los datos disponibles en este estudio sugieren una menor variabilidad genética en la población de granja que en la población silvestre.

COMPARACIÓN DE LA POBLACIÓN DE GRANJA CON LA POBLACIÓN SILVESTRE

El valor significativo de F_{ST} (0,0712, $p < 0,05$) indica la existencia de divergencia genética entre las dos poblaciones consideradas. La correspondiente distancia de Nei es de 0,012 ($p < 0,05$).

Sin embargo, estos valores, aunque significativamente distintos de cero, no son muy elevados, de manera que la población de granja y la población silvestre no pueden considerarse muy diferentes, al menos a partir de los *loci* considerados. Este resultado está de acuerdo con los trabajos de Barrowclough (1983), según los cuales, la mayoría de las especies aviares tienen valores de F_{ST} del orden de 0,1 o incluso menos. Los *loci* que resultan más informativos para apreciar estas diferencias son *GOT1* ($F_{ST}=0,0087$, $p < 0,05$), *IDH1* ($F_{ST}=0,1115$, $p < 0,05$) y *MPI* ($F_{ST}=0,0251$, $p < 0,05$). El valor correspondiente a *MPI* debe ser considerado sólo a título indicativo, dado el pequeño número de aves de granja que se ha podido estudiar para este *locus*.

Aunque estas estimaciones son orientativas de las diferencias globales entre las perdices criadas en granja y las perdices silvestres, no hay que olvidar que para valorar el impacto real de una repoblación sobre la variabilidad y la estructura genética de la población local es preciso considerar las diferencias genéticas de partida entre las poblaciones implicadas concretas. Asimismo, es necesario valorar el flujo genético real, entendido formalmente no sólo como el movimiento de genes de la granja hacia el campo, sino también su incorporación en la población local. Así, el flujo genético actúa como uniformizador y deja sentir su efecto sobre la estructura de las poblaciones afectadas (Rockwell y Barrowclough, 1987), con lo que se puede esperar una disminución de F_{ST} , cuando el flujo entre poblaciones es intenso.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PERDICES ROJAS EN CAUTIVIDAD

BIBLIOGRAFÍA

- Arruga, M.V., M.T. Tejedor, M.R. Villarroel, A. Hériz, E. Ferreira and F.J. Abenia. 1996. Genetic studies of *Alectoris rufa* and *A. graeca* in Spain. *Arch. Zootec.*, 45: 339-344.
- Arruga, M.V., M.T. Tejedor, J. Saz, L.V. Monteagudo y M. R.Villarroel. 1998. Avances en la determinación de la pureza genética de la perdiz roja. II Jornadas técnicas PROGALTER, Expoaviga, 98: 9-14.
- Barrowclough, G.F. 1983. Biochemical studies of microevolutionary processes In: A.H.Brush and G.A. Clark Jr (Ed.) Perspectives in Ornithology pp 223-261. Cambridge University Press, New York.
- Belkhir, K., P. Borsa, J. Goudet, L. Chikhi and F. Bonhomme. 1996-1998. GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire du Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Blanc, F., P. Durand and R. Jabbour-Zahab. 1993. Diversité génétique des populations de perdrix rouges (*Alectoris rufa*) dans la région de Béziers (Hérault). *Gibier Faune Sauvage*, 10: 293-302.
- Falconer, D.S. 1989. Introduction to quantitative genetics. (Third Edition). Longman Scientific & Technical. Essex (England).
- Grant, P. R. and T. D. Price. 1981. Population variation in continuously varying traits as an ecological genetics question. *Am. Zool.*, 21:795-811.
- Harris, H. and D.A. Hopkinson. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Kitamura, A., N. Iijima, F. Hashimoto and A. Hiratsuka. 1971. Hereditary deficiency of subunit H of Lactate dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta*, 34: 419-423.
- Maekawa, M., K. Sudo, T. Kanno and S.S. L. Li. 1990. Molecular characterization of genetic mutation in human lactate dehydrogenase-A (M) deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 168: 677-682.
- Meera Khan, P. 1971. Enzyme electrophoresis on cellulose acetate gels: Zymogram patterns in man-mouse and man-chinese hamster somatic cell hybrids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 145: 470-483.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Randi, E., A. Meriggi, R. Lorenzini, G. Fusco and P.U. Alkon. 1992. Biochemical analysis of relationships of mediterranean *Alectoris* partridges. *Auk*, 109: 358-367.
- Rockwell, R.F. and G.F. Barrowclough. 1987. Gene flow and the genetic structure of populations. In: F. Cooke and P.A. Buckley (Ed.) Avian Genetics. A population and ecological approach pp. 223-253. Academic Press, London.
- Serov, D.L., V. I. Glasko and L.I. Korochin. 1975. Genetic control of the expression of gene for lactate dehydrogenase A in sheep erythrocytes. *Genetika*, 11: 27-31.
- Tejedor, M.T., L.V. Monteagudo, M.V. Arruga, F.J. Abenia y A.C. Lavilla. 1995. Variabilidad genética de la perdiz roja española para varios *loci* enzimáticos. *I.T.E.A.*, Vol. extra, nº 16:330-332.
- Tejedor, M.T., L.V. Monteagudo and M.V. Arruga. 1996. Enzymatic analysis in some wild populations of Spanish Red Partridge. *Anim. Genet.*, 27: 28.
- Van Someren, H., H.B. Van Henegouwen, W. Los, E. Wurzer-Figurelli, B. Dopfer, M. Vervloet and P. Meera Khan. 1974. Enzyme electrophoresis on cellulose acetate gel, II. Zymogram patterns in man-chinese hamster somatic cell hybrids. *Humangenetik*, 25: 189-201.
- Weir, B.S. 1990. Genetic data analysis. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984. Estimating

TEJEDOR, MONTEAGUDO Y ARRUGA

- F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Womack, J.E. and Y.D. Moll. 1986. Gene map of the cow: Conservation of linkage with mouse and man. *J. Hered.*, 77: 2-7.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.

Recibido: 27-7-98. Aceptado: 9-3-99.

Archivos de zootecnia vol. 48, núm. 182, p. 186.