

Juan Antonio Ansón García

Estudios genéticos para la
identificación de la estructura
genética de la perdiz roja (*alectoris
rufa* L.) y su aplicación en
explotaciones y áreas cinegéticas

Departamento
Anatomía, Embriología y Genética Animal

Director/es
Arruga Laviña, María Victoria

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

Tesis Doctoral

ESTUDIOS GENÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA
ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA PERDIZ ROJA (ALECTORIS
RUFA L.) Y SU APLICACIÓN EN EXPLOTACIONES Y ÁREAS
CINEGÉTICAS

Autor

Juan Antonio Ansón García

Director/es

Arruga Laviña, María Victoria

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía, Embriología y Genética Animal

2011



— Perdices y cardos —

Perdiz roja

• Oleo sobre tablex 73 x 50 cms Manuel Sosa © 2001

Universidad de Zaragoza

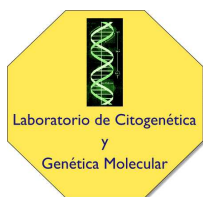
Departamento de Anatomía, Embriología y Genética

Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular

**ESTUDIOS GENÉTICOS PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA
GENÉTICA DE LA PERDIZ ROJA (*Alectoris
rufa* L.) Y SU APLICACIÓN EN
EXPLOTACIONES Y AREAS CINEGÉTICAS.**

Memoria presentada por
Juan Antonio Ansón García
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, 2011



Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular

Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

M. Victoria Arruga. Directora



Miguel Servet, 177
50013 - ZARAGOZA (Spain)

E.mail: mvarruga@posta.unizar.es

Tfno: +34 976 76 16 62
FAX: +34 976 76 16 62

Zaragoza, 29 de Marzo de 2011

M. VICTORIA ARRUGA LAVIÑA, Catedrática de Genética del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral, titulada: ESTUDIOS GENÉTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA PERDIZ ROJA (*Alectoris rufa*, L.) Y SU APLICACIÓN EN EXPLOTACIONES Y ÁREAS CINEGÉTICAS, que se recoge en la presente Memoria y de la que es autor D. Juan Antonio Ansón García, ha sido realizada bajo mi dirección en el Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Esta Memoria se adapta al Proyecto de Tesis presentado en su día y cumple los requisitos exigidos para que el interesado pueda optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Lo que suscribo, como Directora del Trabajo, en Zaragoza a veintinueve de Marzo de dos mil once.

Fdo. M. Victoria Arruga Laviña
Directora de la Tesis



Head of School
Dr Mark Fellowes, BSc, PhD
+44 (0)118 378 7064
m.fellowes@reading.ac.uk

School of Biological Science

AMS Wing
Whiteknights
Reading RG6 6AJ

phone +44 (0)118 378 8897
fax +44 (0)118 378 6671
email r.w.jackson@reading.ac.uk

Prof. Victoria Arruga
Laboratorio de Citogenética y Genética
Molecular
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza
Miguel Servet, 177
50013 – Zaragoza
Spain

May 9th 2011

Dear Prof. Arruga,

PhD Thesis of Juan Ansón: Estudios Genéticos para la Identificación de la Estructura Genética de la Perdiz Roja (*Alectoris rufa* L.) y su Aplicación en Explotaciones y Áreas Cinegéticas

Thank you for sending the Thesis of Juan Ansón for evaluation.

I have now read through the Thesis. The introduction is broad and deep and introduces the Thesis objectives. The Materials and Methods are described in detail and are reproducible. The Results follow a logical flow of systematic processes that leads to the identification of novel microsatellites. The results clearly describe the pitfalls associated with some screening methods. Application of the microsatellites on two populations of partridge allowed the distinction between the populations. All the results are discussed within the context of the project and consider other research studies and a detailed set of conclusions are presented. The bibliography is comprehensive.

In summary, this Thesis fulfils the conditions as I understand them for the award of a European Doctorate.

Yours sincerely,

Dr Robert W. Jackson





Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO PER IL SISTEMA PRODUZIONE ANIMALE IN AMBIENTE MEDITERRANEO (ISPAAM)

Sede: Via Argine, 1085, 80147 Napoli; Tel. +39-081-5964977 / +39-081-5966006
Fax +39-081-5965291;
E-mail: istituto.sede@ispaam.cnr.it; www.ispaam.cnr.it

Unità Organizzativa di Supporto Traversa I.a Crucca, 3 - Loc. Balduca, 07040 - Li Punti, Sassari
Tel. +39-079-2841601; +39-079-2841602; Fax +39-079-2841699
E-mail: istituto.sezione@ispaam.cnr.it



Naples, May 4, 2011

Prof. Maria Victoria Arruga
Laboratorio de Citogenetica
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza
Miguel Servet, 177
50013 Zaragoza
SPAIN

ISPAAM - CNR - ISPAAM		
Tit.	Cl.	F.
N. 0000338		04/05/2011



Ref. PhD-thesis of Juan Antonio Ansón García

Dear Prof. Arruga,

I found very interesting the PhD-thesis performed by Juan Antonio Ansón García and entitled "Estudios genéticos para la identificación de la estructura genética de la perdiz roja (*Alectoris rufa* L.) y su aplicación en explotaciones y áreas cinegéticas".

Perdiz roja is a very important bird in many countries and, among the European ones, the Spain is that where this species is particularly present. For this reason Spain could be the country where this species not only can be studied very well, but could be the point of reference for many other countries which have interest to import this species in their territories.

Main goal of this study was to improve the knowledge on the genome of *Alectoris rufa* by analyzing the genetic variability in both wild and captive species so to establish the interbreeding coefficient, as well as to perform an easy and simple molecular technique allowing to distinguish clearly males from females. As a tool to perform this goal, a microsatellite genome library of *Alectoris rufa* was performed.

The study performed in 50 individuals revealed that inbreeding coefficient is higher in the captive species than in the wild ones, as demonstrated by different statistical approaches, underlining that captive species have much more problems than wild ones.

The study is very original and can have practical applications to spread this species in Spain and in other interested Countries.

DNA-extraction was performed from different sources. PCR-technique and restriction enzymes were used to prepare a microsatellite genomic library. Fluorescence probes and microscopes equipped for fluorescence hybridization observation were used to select different colonies.

The study has been constructed very well and adequately discussed.

Most of these studies have been presented in international meetings and published in referred journals.

I think this thesis has all the requisites to obtain the European Doctorate award.

Sincerely yours



Prof. Leopoldo Iannuzzi

Director of the "Institute for Animal Production Systems in Mediterranean Environment" (ISPAAM) - National Research Council (CNR) of Italy



Este trabajo ha estado financiado por una **beca de investigación FPI** concedida por el Departamento Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón, con referencia nº B005/08. (Enero 2008-Septiembre 2010), y por los proyectos y convenios: **EVALUACIÓN ZOOTÉCNICA DE LA SITUACIÓN DE LA PERDIZ ROJA ESPAÑOLA** financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) nº ref: RZ2005-00011-00-00. Años:2005-06 al 2008-09. **CONVENIO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIA DE GENÉTICA Y FAUNA SILVESTRE EN ARAGÓN.** Consejería de Medio Ambiente y Consejería de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón. Años: 2007 al 2009.

**Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar.**

Extracto del poema **Caminante no hay camino**
de Antonio Machado.

***A mis padres y hermano
A mi familia***

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar me gustaría agradecer a M^a Victoria Arruga, la oportunidad que dió en su día a este grumete, al aceptarlo como miembro de su tripulación. Espero que la confianza depositada en mi no te haya defraudado. Has sido una gran tutora y guía en este viaje, y te agradezco infinitamente el esfuerzo realizado.

A los compañeros de laboratorio, Paco y las dos Cristinas, que me hicisteis muy agradable la vida en “laboro”. A Pilar Mozas del área de secuenciación de la Univ. de Zaragoza, por estar siempre tan dispuesta a ayudarme.

A los profesores de Microbiología (Jose Antonio, Mavi, Anabel, Pepe y sobre todo a mi padre espiritual Carlos Lara) por sus contínuos consejos y muestras de cariño. No me quiero olvidar de la “troupe” de los departamentos de Fisiología Animal y Reproducción, por las mismas razones. Siempre me acordaré de los buenos momentos pasados con vosotros.

To my colleagues and friends from Reading. I spend only 3 months with you, but I always carry with me. Rob, Fede, Glyn I did spend an unforgettable stay, and I learned the keys to the PhD. Thank you very much.

A los amigos, que como sois tantos y tan buenos, y no quiero que esto se convierta en un capítulo con mayúsculas, perdonadme, pero os reservo un agradecimiento más íntimo. Quiero destacar el apoyo tan importante que fuisteis en momentos de crisis doctorandiana, pero todavía mejores en los momentos de alegría, que para eso hemos venido.

Por último, y con especial énfasis y cariño, quiero mencionar a Demetris Savva, the Polaris of the travel.

I. RESUMEN.	1
II. ABSTRACT:	2
III. GLOSARIO	5
IV. INTRODUCCIÓN.	9
IV.1 Justificación del trabajo.	9
IV.2 Objetivos.	10
IV.3 Estado de la cuestión y revisión bibliográfica.	11
Biología de la Perdiz:	12
Etología y hábitat.	14
Problemática de la hibridación entre <i>Alectoris rufa</i> y especies emparentadas.	15
El genoma de la perdiz.	18
Microsatélites.	18
Importancia de los microsatélites como marcadores moleculares.	19
Microsatélites en ave.	19
Organización cromosómica.	20
Dificultades para la aplicación del genoma del pollo en <i>Alectoris</i> .	22
Situación actual del conocimiento genómico de <i>Alectoris</i>	23
IV.4 Sexaje en perdiz.	24
IV.5 Genética de poblaciones.	26
IV.6 Genoteca.	28
Clonación.	28
Tipos de Vector.	29
Plásmido pSMART®-HCKan.	31
Resistencia a antibióticos.	33
Problemática en el clonaje de repeticiones.	33
La cepa bacteriana.	34
Hibridación.	35
V. MATERIAL Y MÉTODOS.	41
V.1 Material animal.	41
V.2 Extracción de ADN.	41
V.3 Sexaje de perdices.	44
V.4 Estudios poblacionales.	45
V.5 Construcción de una genoteca.	46
Preparación de los insertos.	46
Preparación de medios de cultivo.	49
Ligación.	50
Transformación.	50
Controles.	52
Conservación.	53

V.6 Estudios de la genoteca.	53
Miniprep.	53
Amplificación directa desde colonia.	54
Preparación de un stock de ADN.	55
Secuenciación de las muestras.	56
Selección de colonias para su estudio.	57
Búsqueda de microsatélites mediante PCR.	58
Hibridación de la genoteca con sondas fluorescentes.	60
1.- Preparación de las colonias.	60
2.-Preparación de la membrana.	62
3.- Preparación de las sondas.	63
4.- Hibridación.	63
5.- Visionado con el microscopio.	65
6.- Controles de hibridación.	66
7.- Examen de los positivos.	67
 VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	 71
VII.1 Extracción ADN.	71
VII.2 Sexaje de perdicés.	72
VII.3 Estudios poblacionales.	73
Frecuencias alélicas	73
Heterocigosidades y PIC.	75
Estadísticos F y distancias génicas	75
VI.4 Resultados de la genoteca.	83
Preparación del ADN para clonar.	83
Medida de la eficiencia de transformación.	86
Controles	87
Amplificación directa desde colonia.	88
Secuenciación al azar.	89
Búsqueda de microsatélites mediante metodología PCR.	92
Hibridación.	96
 VII. CONCLUSIONES.	 105
 VIII. CONCLUSIONS.	 106
 IX. BIBLIOGRAFÍA	 111

RESUMEN / ABSTRACT

I. RESUMEN.

Como objetivo primordial de este trabajo, se pretende profundizar en el conocimiento del genoma de la especie *Alectoris rufa*.

Estos estudios se concretan en el sexaje a partir del ADN de perdiz en la especie, en el estudio de la dinámica de poblaciones, tanto en silvestres como en cautividad y, por consiguiente, en el conocimiento de la variabilidad genética existente y en la estima de los valores de consanguinidad. Finalmente se pretende la construcción de una genoteca de *A. rufa* y la posterior búsqueda de marcadores moleculares microsatélites.

En la aplicación de la metodología de sexaje se ha introducido una variación respecto a lo publicado por diversos autores, consistente en la necesidad de utilizar enzimas de restricción para la correcta identificación de las bandas que corresponden al sexo femenino, y su diferenciación de los individuos de sexo masculino.

En el estudio poblacional se ha puesto de manifiesto la situación genética de dos poblaciones. La primera de ellas, es una población silvestre de Extremadura, y la segunda, una población en cautividad correspondiente a una granja de Cataluña. Se estudian las frecuencias alélicas, las heterocigosidades, el PIC, los estadísticos F de Wright y las distancias genéticas de Nei. Con todos estos estudios se ha comprobado que la situación genética de la población en cautividad presenta más problemas genéticos que la población silvestre, con respecto a la existencia de menor variabilidad genética y de un cierto valor de consanguinidad.

Por último, se llevó a cabo la obtención de una genoteca genómica de *A. rufa*. A partir de ella se puso especial énfasis en la búsqueda de marcadores moleculares microsatélites que ayuden a ampliar los conocimientos que se tienen acerca del genoma de la especie. Se usaron para ello tres vías: una primera, secuenciando al azar colonias con fragmentos de un tamaño adecuado, una segunda; elaborando combinaciones de cebadores con secuencias repetidas en PCR; y, por último, mediante hibridación con sondas fluorescentes de ADN de secuencias microsatélite. Con la primera de las vías se obtuvieron 2 posibles microsatélites, de los que sólo uno resultó tener

variabilidad alélica (AG)_n. La segunda vía resultó no ser la más adecuada debido a la dificultad de conseguir unas condiciones de PCR optimizadas para cada colonia, obteniéndose de esta manera falsos positivos. Se ha demostrado que la hibridación es la mejor manera de obtener microsatélites a partir de una genoteca. De esta manera se han obtenido dos microsatélites: uno compuesto interrumpido (AT)_n (AC)₃ T(AC)_n (AT)_n, y otro sencillo (AC)_n.

II. ABSTRACT:

The main objective of this work is to increase the knowledge of the genome of the species *Alectoris rufa*. These studies involved the reliable sexing of partridges using their DNA, the study of population dynamics in the wild and in captivity and, therefore, the utilisation of existing genetic variability in the estimation of inbreeding values. Finally, the study involved the construction of a DNA library of *Alectoris rufa* and the subsequent search for microsatellite molecular markers.

In applying the methodology of sexing, a modification has been introduced to the method reported by several authors, namely the introduction of a restriction enzyme step for the correct identification of the bands corresponding to female and male individuals.

The population study has revealed the genetic status of two populations. The first of them a wild population of Extremadura and, the second, a captive population at a farm. Allele frequencies were determined and used to calculate the heterozygosities, PIC, Wright F statistics and Nei's genetic distances. All these studies have shown that the genetic condition of the captive population has more genetic problems than the wild population with respect to the existence of low genetic variability and the existence of a certain degree of inbreeding.

Finally, we constructed a genomic library of *A. rufa*. This library was screened with special emphasis on the search for microsatellite markers to help broaden the knowledge available about the genome of the species. This was performed using three approaches: first, by sequencing cloned DNA at random, second, by amplifying cloned DNA by PCR using primers containing repetitive

sequences and, finally, by hybridising the library with fluorescently-labelled oligonucleotide probes containing repetitive sequences. Using the first way, we have obtained 2 possible microsatellites, which only one proved to be allelic variability $(AG)_n$. The second approach have not worked very well, because of the difficulty in obtaining PCR conditions optimized for each colony, thus obtaining false positives. It has been shown that using hybridization, is the best method to get microsatellites from a genomic library. Whith it, we have obtained 2 microsatellites, one with $(AT)_n(AC)_3T(AC)_n(AT)_n$ form, and the other with simply form $(AC)_n$.

III. GLOSARIO

ADN: ácido desoxirribonucleico.

amp: ampicilina.

BrEt: Bromuro de Etidio.

cADN: ADN procedente de ARN mensajero

Cebador F: Forward (directo).

Cebador R: Reverse (reverso).

cfu/μg: unidades formadora de colonia/ microgramo.

cM: centimorgan.

g: gramo.

h: hora/s.

H₂O: agua destilada.

H₂O_{bd}: Agua bidestilada estéril.

kan: kanamicina.

Kb: kilobases.

Mb: megabase = 10⁶ bases.

Medio LB: Lysogeny broth or Luria-Bertani broth.

min: minutos.

ms: microsatélite.

NaCl: Cloruro de sodio.

°C: grados Celsius o Centígrados.

p/v: peso/volumen.

pb: pares de bases.

rpm. Revoluciones por minuto.

Secs: segundos.

ssADN: Single stranded ADN. Con solo una hebra.

SNP: Single nucleotide polymorphism. Polimorfismo de un solo nucleótido.

STR: Short Tandem Repeats, repeticiones cortas en tandem.

T^a: temperatura.

T^{aa}: Temperatura de annealing.

TAE: Tampón Tris-Acetato-EDTA.

U: unidades enzimáticas.

V: voltios.

v/v: volumen/volumen.

Vt: Volumen total.

PCR: Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa.

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA, ADN polimórfico amplificado al azar.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción.

Tampón TAE: Tris-acetate-EDTA.

Taq: *Thermophilus aquaticus*.

INTRODUCCIÓN

IV. INTRODUCCIÓN.

IV.1 Justificación del trabajo.

Desde hace más de 30 años, y debido en gran medida al desarrollo socioeconómico experimentado a nivel mundial, la concienciación de los distintos países sobre la necesidad de conservar el medio natural ha pasado a un primer plano. Se trata de preservar los recursos naturales, evitando la degradación del patrimonio genético característico de un lugar.

La mano del ser humano se ha dejado notar en la hibridación de muchas especies, que aún estando en proceso de especiación alopátrida, han producido una descendencia fértil con algún tipo de característica más interesante para el productor. En el caso de la perdiz, la introducción de nuevas especies con mayor potencial productivo, la caza desmesurada y los cambios ambientales, están haciendo desaparecer las poblaciones autóctonas, con el peligro de pérdida de su linaje por medio de hibridaciones entre ellas.

La forma de combatir este problema, está sustentada por la creación de leyes como la española 42/2007, de 13 de diciembre, del Patrimonio Natural y de la Biodiversidad, así como la legislación europea, Directiva 2009/147/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, relativa la conservación de las aves silvestres, que no permiten la introducción de especies foráneas que puedan contaminar el patrimonio genético de especies autóctonas. La ley de Caza en Aragón, Ley 5/2002, señala que *“queda prohibida la introducción de especies, subespecies o razas distintas de la autóctonas, en la medida en que puedan competir con éstas, alterar su pureza genética o equilibrios ecológicos. A estos efectos se entienden como especies autóctonas las que habitan de forma natural en el territorio de la Comunidad Autónoma”*.

Este trabajo pretende por tanto ampliar los estudios genéticos sobre la especie *Alectoris rufa*. El descubrimiento de nuevos y más eficientes marcadores moleculares, harán posible su uso para combatir la hibridación que está sufriendo esta especie tan emblemática de nuestro país.

IV.2 Objetivos.

El objetivo principal de este proyecto de Tesis doctoral ha sido aplicar metodologías de sexaje individual y de análisis de poblaciones, para culminar con la construcción de una genoteca de *Alectoris rufa* que contribuya en un futuro próximo a un mejor conocimiento de las características genéticas de esta especie.

El conocer el sexo individual de una población es el primer punto de interés en cualquier estudio poblacional, al igual que su estructura genética. De aquí el interés de aplicar marcadores genéticos moleculares al estudio de las diferentes poblaciones de perdiz.

Otro objetivo es realizar un estudio de dos poblaciones características: una salvaje procedente de individuos cazados en los campos extremeños, y otra en cautividad, originaria de una granja de reintroducción cinegética en Cataluña. El estudio de dos marcadores microsatélites con probada eficacia: p58 y m27, (García *et al.* 2007), indicarán la existencia o no de endogamia entre sus individuos y parentesco entre poblaciones.

El interés de la realización de la genoteca reside en que, una vez preparada, se convierte en punto de partida para la búsqueda de cualquier región de ADN o de genes y su estudio mediante subclonación, secuenciación, expresión, etc. Al tratarse de una genoteca genómica, estará representado todo el genoma de la perdiz, sus secuencias codificantes + no codificantes, siendo así más valioso para todo tipo de estudios. El trabajo podrá ser usado por la comunidad científica interesada en la estructura génica de la perdiz, genómica comparativa y estudios funcionales de genes.

Para ello el trabajo realizado se puede resumir en los siguientes apartados:

- 1.- ESTUDIO DE SEXAJE MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ADN EN PERDICES, como complemento a la identificación fenotípica en individuos en que no sea evidente el sexo.
- 2.- ESTUDIO DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS POBLACIONES DE PERDIZ, la primera de origen silvestre y la segunda en cautividad.

3.- CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA GENÓMICA DE PERDIZ ROJA, como trabajo pionero en los estudios genéticos realizados en esta especie autóctona.

4.- BÚSQUEDA DE MARCADORES GENÉTICOS ESPECÍFICOS, que complementen a los ya existentes, para identificar la perdiz roja y posibilitar la diferenciación de otras especies próximas (griega, chuckar, bárbara, etc.), así como las posibles hibridaciones entre ellas. Igualmente, se identificarán marcadores microsatélites a partir de la información existente en otras especies de aves. Los métodos que se emplearán para ello serán: hibridación, combinaciones de cebadores en PCR, y secuenciación al azar.

Los resultados no sólo permiten ampliar el conocimiento genético del genoma de la perdiz, sino que también se podrán utilizar con aplicaciones prácticas para la mejora de la producción, ofreciendo instrumentos de selección a los criadores (buscando genes que influyen en la misma) y proporcionándoles la seguridad de autenticidad de sus animales, salvaguardando, así, la pureza genética de la perdiz roja.

IV.3 Estado de la cuestión y revisión bibliográfica.

La perdiz roja es la primera especie aviar en importancia cinegética y una de las más importantes en términos de producción (Gonzalez-Redondo *et al.* 2010). Además de la importancia cinegética y económica, forma parte de la cultura y tradición de nuestro país y es parte integrante de numerosos ecosistemas.

La distribución natural de la perdiz roja (*Alectoris rufa*), está restringida a la región mediterránea (España, Portugal, Francia, noroeste de Italia, y las islas italianas de Elba y Córcega). Ha sido introducida en Reino Unido, islas del Atlántico (Azores, Canarias y Madeira), y, con poco éxito, en Estados Unidos, Nueva Zelanda y Europa central (Blanco *et al.* 2003). Además del género *Alectoris*, que es el más conocido en estas latitudes, existen otros géneros de perdices, entre los que destacan *Perdix*, *Arborophila*, *Ammoperdix* o *Francolinus*. En el género *Alectoris* se engloban diferentes especies de perdiz que tienen en común el poseer

patas y picos de color rojizo. De entre éstas caben destacar: *A. rufa* (perdiz roja), *A. chucar* (asiática), *A. graeca* (griega), *A. bárbara* (moruna), *A. magna* y *A. malanocífera*. Salvo las dos últimas, todas ellas tienen distribución mediterránea y algunas de ellas morfológicamente muy similares a *A. rufa*, pero con hábitats geográficos diferentes (Figura 1). Las tres especies naturales de Europa *A. rufa*, *A. graeca* y *A. chuckar*, están representadas en la lista de especies amenazadas bajo la legislación de la Unión Europea (79/409 CEE Ap.2/1, 3/I; BERN Ap.3) y clasificadas como Species of European Conservation Concern (BirdLife International, 2004).

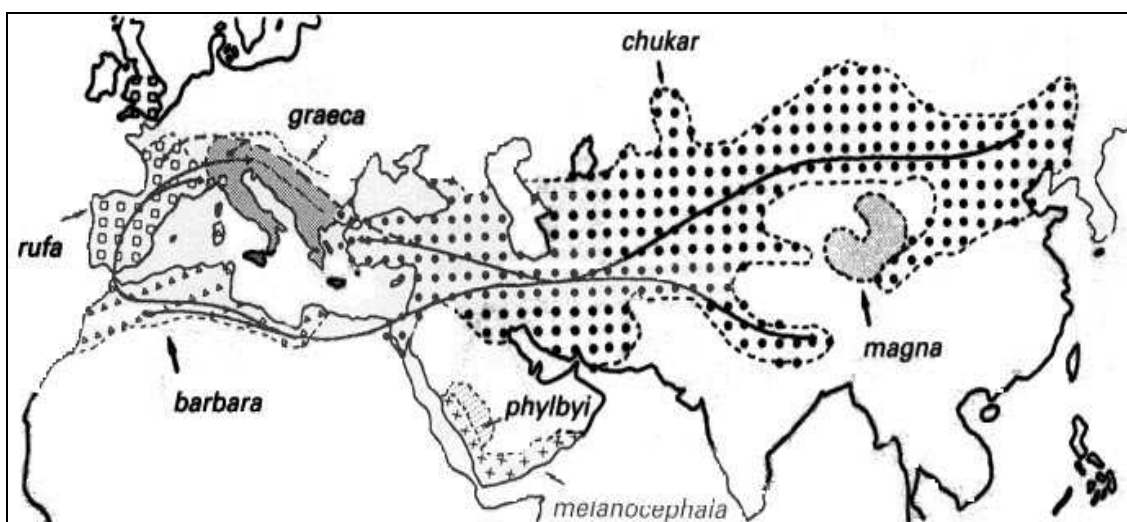


Figura 1. Mapa de distribución geográfica de perdices de género *Alectoris*. (Randi *et al.* 1992).

Biología de la Perdiz:

La perdiz roja en estado adulto tiene una longitud aproximada de entre 33 y 38 cm, y una envergadura de 50 a 60 cm., con una cola que llega medir unos 12 cm aproximadamente. Su coloración y plumaje que lo caracteriza varía según la edad y el sexo. Los perdigones de una semana de edad no vuelan, no tienen cola, y el plumón es blanco en la parte superior del pico y dorado en su parte ventral. A las dos semanas comienza a realizar pequeños vuelos y el color del plumón en la parte superior del pico se cambia a un color negro, mientras que en la parte ventral el plumón se vuelve blanco. Cuando los perdigones cumplen 4 semanas sus vuelos son más largos y el plumaje del dorso toma un color crema con moteados en la

parte ventral, a la vez que surge un ribete negro por encima del pico (Norman, 2008).

Con un mes y medio el capirote se vuelve gris, surgen manchas negras en la parte superior del pico y en la posterior del cuello, la cola se hace visible y las plumas del dorso ya aparecen de un color pardo y barrado. El color del cuello tiende hacia el negro y los laterales de la cabeza y la garganta hacia el color blanco.

Con tres meses el pico y las patas son de color naranja y el collar del cuello está sin cerrar. En los quince días siguientes las patas se vuelven rojas y en los machos juveniles la pluma más externa del ala es puntiaguda y con una mancha blanca.

La hembra adulta de quince meses muestra la pluma más externa del ala con su borde gastado y una mancha blanca. Carece de espolón. A los veintisiete meses el plumaje de la hembra es rojizo y presenta un collar negro que va de la base del pico hacia la garganta; tiene una tonalidad de color blanco sucio, presentando un babero de plumas de color gris perla y negro. En sus flancos se aprecian las características bandas transversales, donde alternan los colores rojos, blancos y gris perla, ribeteados de una fina línea negra. Su pico y las patas son rojas y en algunas ocasiones presentan un pequeño espolón.

En las patas es donde presenta una situación característica de dimorfismo sexual, ya que los machos poseen en la parte posterior de los tarsos una excrecencia de naturaleza córnea que sirve de espolón. Las hembras, sin embargo, no lo poseen, salvo las ya añosas, por lo que hace muy arriesgado el uso de este carácter para el sexaje (Fig. 2).

Perdiz roja ?



Estado de conservación

Extinto Amenazado Preocupación menor

EX EW CR EN VU NT **LC**

Preocupación menor (IUCN)

Clasificación científica

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Aves
Orden:	Galliformes
Familia:	Phasianidae
Género:	<i>Alectoris</i>
Especie:	<i>A. rufa</i>

Nombre binomial

Alectoris rufa
(Linnaeus, 1758)



Figura 2: Imágenes de patas de hembra con espolón y sin espolón. La imagen de abajo-izquierda pertenece a un individuo juvenil. La imagen de abajo-derecha es de un macho. (Blasco, 2011).

Tradicionalmente, aparte de la presencia o ausencia de espolón, la caracterización del sexo se ha completado mediante biometría, usando la anchura del tarso al nivel del espolón, la longitud del ala plegada y la altura del pico al nivel de las narinas (Sáenz de Buruaga *et al.* 1991).

Etología y hábitat.

La perdiz roja es un ave omnívora, de carácter sedentario, que se distribuye con regularidad por la parte sur del Reino Unido, por Francia, por el norte de Italia y por toda la Península Ibérica. Su distribución altitudinal varía desde el nivel del mar hasta los 2500 metros (Norman, 2008). Esta especie vive en bandadas familiares compuestos por uno o dos adultos con su prole, contando con un número variable de individuos, de 4 a 25; esta última cifra indica un buen estado de la población. Durante el periodo invernal, por su carácter sedentario, la perdiz habita en una zona reducida de terreno y emite su peculiar canto al amanecer y al atardecer para atraer a la bandada. En caso de espantada, todos saldrán volando a toda velocidad hacia la misma dirección. Las perdices aprovechan las charcas y el rocío del campo para beber. Duermen en lugares abiertos para facilitar su huida. Pasadas las heladas invernales, comienza la época de apareamiento, que variará en función de como evolucione la siembra de cereales y leguminosas. Esto proporcionará a la nueva pollada cobertura en el campo y alimento suficiente. Normalmente es a partir

de enero cuando las bandadas de perdices rompen sus lazos de unión y los machos inician la conquista de las hembras, produciéndose violentas peleas. La perdiz anida en el suelo y prefiere los lugares pedregosos con monte bajo y tierras de labranza, donde sean frecuentes las siembras de cereales de invierno y las leguminosas. El macho es el que prepara los nidos en lugares con buena cobertura; la hembra elige uno de ellos, donde pone de 9 a 18 huevos que incuba en 23 días y medio. Si por cualquier causa, sea meteorológica o por depredadores, se pierde la primera puesta, la hembra suele efectuar una segunda reposición más reducida que la primera. En algunos casos la puesta es doble y ambos adultos se encargarían cada uno de incubar un nido, pero lo normal es que sea uno y el macho se encargue de vigilar desde un punto dominante la presencia de intrusos. A los 23 días y medio se produce la eclosión de los perdigones, que vienen a pesar unos 20 gramos. Sus progenitores velarán por su supervivencia y cuidarán de ellos hasta que puedan valerse por si solos. Los factores que propician una mortalidad que oscila entre el 65 y el 60%, son achacables, con las reservas propias de este tipo de afirmaciones, a la caza en un 40%, incluyendo tanto la regulada como la furtiva, a la climatología excesivamente rigurosa del invierno en un 10%, a los pesticidas en un 5% y a los depredadores en otro 10%. Bastaría que con un 30 por ciento de las supervivientes fuese capaz de reproducirse para recuperar su población inicial.

Problemática de la hibridación entre *Alectoris rufa* y especies emparentadas.

Las perdices del género *Alectoris* se especiaron de forma alopátrida durante el Pleistoceno, y no han desarrollado desde entonces mecanismos de aislamiento reproductivo. Se pone de manifiesto en la hibridación natural que se produce entre *A. rufa* y *A. graeca* en zonas alpinas francesas de contacto natural entre las dos (Barilani et al., 2007). También ocurren hibridaciones naturales entre *A. graeca* y *A. chukar* en las montañas Ródope, en la región de Tracia (Dragoev, 1974). Mientras las hibridaciones naturales se producen en ciertas zonas limítrofes de contacto entre las especies, la difusión por parte del ser humano de híbridos artificiales parece tener un amplio rango de distribución. Según su distribución natural, la

hibridación natural entre *A. chukar* X *A. rufa* no debería ocurrir, pero entre la década de los 60 y los 80, chukars o híbridos con chukars fueron introducidos masivamente para repoblar poblaciones de perdiz roja en la Península Ibérica (Arruga *et al.* 1996), Francia (Goodwin, 1986) e Italia (Priolo, 1970). Hoy en día, estos híbridos han colonizado toda la parte este de Europa, así como las islas de Elba y Córcega (Barbanera *et al.* 2009).

Cuando se inició la cría en cautividad de la perdiz roja, los resultados eran pobres, debido a que el carácter salvaje de esta especie hace difícil su reproducción y manejo en granja. Por otra parte, la explotación intensiva de perdiz griega y chukar para la producción de carne ya se encontraba bastante desarrollada, existiendo líneas genéticas con una buena aptitud de puesta y con alta velocidad de crecimiento adaptadas a la explotación intensiva en granja. Como consecuencia de ello se piensa que comenzaron algunos criadores del sur de Francia, aprovechando la similitud de esas especies con la perdiz roja y su capacidad para producir híbridos fértiles, a fin de obtener mediante cruzamiento animales indistinguibles fenotípicamente de la especie pura (Negro *et al.* 2001). Las primeras observaciones de las que se tiene constancia son de los primeros años de la década de los 70, cuando sueltas de *A.chukar* x *A.rufa* fueron descubiertas en Reino Unido (Potts, 1989). Híbridos de *Alectoris* también han sido detectados con el uso de técnicas moleculares en Grecia (Baratti *et al.* 2005; Barbanera *et al.*, 2005; Barilani *et al.*, 2007), y en la península Ibérica (Tejedor *et al.* 2009; García *et al.* 2009; y Negro *et al.* 2001). En el caso de España la hibridación natural no es posible debido a la distinta distribución de las especies, y a que *A. chukar* posee una distribución que discurre entre el noreste de China y la región más oriental de la cuenca mediterránea (Magde and McGowan, 2002).

Tan solo una serie de caracteres morfológicos sirven para caracterizar a los híbridos de primera generación, pero tras diversas generaciones de retrocruzamientos, estos se difuminan y solo se conservan diferencias de comportamiento que hace a los híbridos aptos para su cría en cautividad. Los factores que hacen que la hibridación sea beneficiosa para la cría en cautividad son: un incremento en la densidad de población, cierto aumento en el tamaño del individuo, la reducción de los costes de la producción en granjas, y la ausencia hasta hace unos años de marcadores efectivos para identificar los híbridos (Carranza *et al.* 2003; Vernesi *et al.* 2003; Barilani *et al.* 2005). Existe evidencia de

que la integridad genética de numerosas especies autóctonas de animales cinegéticos ha sido manipulada por hibridación antropogénica con otras especies alóctonas. Se pueden encontrar ejemplos en Escocia como el nativo *Cervus elaphus* hibridado con un ciervo traído de Asia *Cervus nippon* (Goodman *et al.* 1999); como la reintroducción del jabalí salvaje de Europa central en Italia, con la consecuente hibridación entre las subespecies *Sus scrofa majori* y *Sus scrofa scrofa* (Vernesi *et al.* 2003); como hibridaciones entre subespecies de conejo salvaje *Oryctolagus cuniculus cuniculus* con *Oryctolagus cuniculus algirus* en España (Delibes-Mateos *et al.* 2008); y como una especie más cercana a la de estudio como la codorniz común europea *Coturnix coturnix coturnix* hibrida con la domesticada *Coturnix coturnix japonica* (Barilani *et al.* 2005).

Entre los principales defectos de los híbridos del género *Alectoris* pueden citarse su carácter menos agreste, que los hace más susceptibles a la acción de los predadores; su mayor capacidad de puesta y su inherente disminución de la cloquez o capacidad de incubar, que disminuye la viabilidad de las puestas en libertad; su diferente patrón etiológico, que provoca, a menudo, apareamientos fallidos y disturbios entre los híbridos y los ejemplares silvestres, etc. (Gonzalez-Redondo, 1997). La hibridación, además, produce la pérdida de valores únicos en el sentido genético, morfológico, ecológico y etológico, que han evolucionado en poblaciones locales a lo largo del tiempo, estando así estos híbridos menos adaptados a ese medio ambiente. Esto se ha comprobado en las poblaciones limítrofes de los Alpes franceses, en las que la selección natural acaba seleccionando a los individuos puros *A. graeca* o *A. rufa* frente a los híbridos (Randi and Bernard-Laurent, 1999). Como resultado pueden manifestar menor éxito en la fertilización, reducción de la supervivencia embrionaria, menor resistencia a las enfermedades y patógenos, menor efectividad en la búsqueda de alimentos, menor supervivencia ante sus predadores, y una reducida capacidad para soportar el estrés fisiológico (Hutchings and Fraser, 2008; Edmands, 2007).

Los estudios realizados hasta la fecha para identificar, tanto a nivel de sueltas como en estado salvaje, los posibles híbridos, se han basado en el análisis de genoma mitocondrial (región del gen citocromo-B y la D-loop control region) (Barbanera *et al.* 2009; Blanco *et al.* 2008; Barilani *et al.* 2007) y nuclear (STR microsatélites, RAPD y SNP) (Barbanera *et al.* 2005; Gonzalez *et al.* 2005; García, 2005; Morin *et al.* 2004).

El genoma de la perdiz.

La mayor parte del conocimiento que se tiene del genoma de la perdiz ha sido gracias al desarrollo del genoma de pollo (*Gallus gallus*). Ésta ha sido la primera especie de animal doméstico secuenciada, (I.C.G.S.C. 2004), debido a su importancia como animal de producción; así como modelo para el estudio en biología del desarrollo, virología, oncogénesis e inmunología (Brown *et al.* 2003).

El tamaño genómico del pollo es de $1,2 \times 10^9$ Kb, lo que comparativamente es mucho menor que el de la mayor parte de las especies de mamíferos. Tiene una peculiar organización en macro y microcromosomas, y posee pocas secuencias repetidas, lo que indica un genoma compacto. Mediante varios métodos se ha estimado que existen entre 20.000 y 23.000 genes codificantes para proteínas, lo que es similar al de mamíferos. No obstante, su genoma es un 65% más pequeño que el genoma de mamíferos (3×10^9). Se especula que esto está relacionado con nuevos requerimientos ante la aparición de una demanda fisiológica para el vuelo (Hughes and Piontkivska, 2005).

Microsatélites.

Los microsatélites son secuencias de ADN en las que un fragmento (de 2 a 6 nucleótidos) se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos los cuales se distinguen entre sí por el número de repeticiones. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN. Son neutros, co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. Por ello, la variabilidad que presentan es útil para su uso como marcadores genéticos respecto al número de repeticiones.

Un microsatélite está típicamente conformado por un motivo repetitivo, en el cual se encuentra contenido, la secuencia repetida, y dos regiones flanqueantes, las cuales se encuentran a ambos lados del motivo repetitivo. Sin embargo, en algunos casos, puede haber dos motivos repetitivos o más. Para que un microsatélite sea considerado útil como marcador molecular, toda la variación de la secuencia o polimorfismo debe hallarse dentro del motivo repetitivo y por el contrario, las regiones flanqueantes deben estar altamente conservadas, hasta el punto de no presentar ninguna variación de secuencia.

Se ha probado que los microsatélites son versátiles marcadores moleculares, particularmente para los análisis poblacionales, pero no por ello se encuentran ausentes de limitaciones. Aquellos desarrollados para unas especies particulares pueden con frecuencia ser aplicadas a especies emparentadas, pero el porcentaje de loci que se amplifican satisfactoriamente puede disminuir cuando aumenta la distancia genética entre dichas especies.

Los microsatélites se clasifican de acuerdo al número de nucleótidos que posea el motivo de repetición como: mono, di, tri, tetra, penta o hexanucleótido. La clasificación también incluye el patrón de orden de los motivos:

- **Puro o perfecto:** Un solo motivo repetido n veces en serie. ej: (AC)₉
- **Puro interrumpido:** Un solo motivo repetido n veces, donde se intercalan nucleótidos entre las distintas repeticiones. ej: (CA)₂AA(CA)₁₂
- **Compuestos:** Dos o más motivos repetidos en serie. ej: (GT)₂(TG)₁₀
- **Compuestos interrumpidos:** Al menos uno de sus motivos presenta nucleótidos intercalados. ej: (CT)₄(GT)₂CTAT(GT)₁₅
- **Complejos:** Combinaciones entre cualquiera de las clases anteriores, sin ningún patrón de orden definido. ej: (ACC)₈ + TG + (GA)₁₂ + (TTA)₅ + GC + (TTA)₄.

Importancia de los microsatélites como marcadores moleculares.

Los microsatélites tienen numerosas ventajas frente a otros tipos de marcadores moleculares (Vélez, 2007):

- Polimorfismo muy elevado.
- Análisis rápido y escrutinio de alelos fácil y objetivo.
- Reproducibilidad muy alta.
- Resultados transferibles entre laboratorios.
- Herencia mendeliana codominante, y por ello permiten análisis de genealogías.
- No están influidos por el ambiente.

Microsatélites en ave.

Sólo el 9-11% del genoma de pollo son secuencias repetidas intercaladas (I.C.G.S.C. 2004b), en contraste con el 40-50% de los genes de los mamíferos,

pero aún así, no se explicaría la diferencia en tamaño, que es dos-tres veces mayor en mamíferos que en aves. Los primeros informes acerca de la secuencia genómica del pollo, indicaron que la aparición de microsatélites es relativamente escasa (Primmer *et al.* 1997), lo que posteriormente se confirmó tras secuenciarse el genoma entero de pollo. Los últimos estudios indican que la frecuencia de microsatélites es de un 30-80% superior en mamíferos que en pollo, siendo en éste de un 0,1% respecto al total del genoma (I.C.G.S.C. 2004b). Si se compara la frecuencia de microsatélites respecto al tamaño del genoma nuevamente en mamíferos, resulta de tres a cinco veces superior que en pollo (Brandström and Ellegren, 2008).

Como indican Primmer *et al.*, en 1997, los microsatélites mayoritarios en todo tipo de aves son del tipo (AC)_n y (AG)_n. El polimorfismo de los microsatélites parece variar según el número de repeticiones y el contenido en bases G y C (Brandström, 2008). Como es lógico pensar respecto al número de repeticiones, los microsatélites con más de 10, tienen un 50% de posibilidades de ser polimórficos, y con 15 o más, una posibilidad del 75-80%. Aquellos microsatélites con un alto contenido en G y C parecen tener menos polimorfismo que los que no contienen este tipo de bases, salvo en los microsatélites formados por trinucleótidos (Brandström and Ellegren, 2008).

En cuanto a la secuencia repetida, hay que tener en cuenta que existen casos en que ésta es interrumpida por un pequeño número de bases distintas al motivo. Esto se explica por la existencia en pollo de un 6% de microsatélites con algún tipo de interrupción en las repeticiones. En microsatélites con más de 15 repeticiones esto se eleva a un 16%. Esto es muy interesante, pues estas imperfecciones suelen situarse en la zona final de las repeticiones, dejando así la zona inicial como punto para que se produzcan las mutaciones repetitivas (Brandström and Ellegren, 2008).

Organización cromosómica.

El genoma de perdiz está organizado en macrocromosomas y microcromosomas (Arruga *et al.* 1996). Los rangos de tamaño varían entre 5 – 180Mb, y el cariotipo está definido como $2n = 78$ (Kasai *et al.* 2003), de los cuales

los 10 primeros están considerados macrocromosomas, incluyendo los cromosomas sexuales (algunos autores consideran del 6 al 10 como cromosomas intermedios), y del 11 al 38 son microcromosomas.

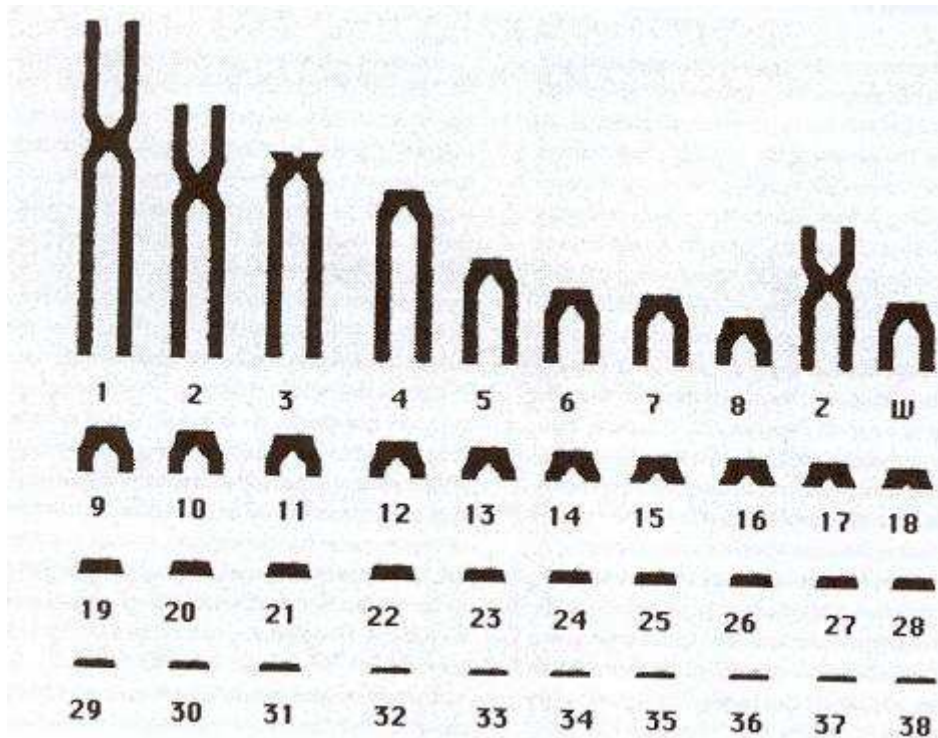


Figura 3: Cariotipo de *Alectoris rufa* (Arruga et al. 1996).

Los microcromosomas poseen un alto contenido en nucleótidos C y G, con gran densidad en islas CpG, genes y repeticiones (Ellegren, 2005). La naturaleza compacta de los microcromosomas se pone en evidencia por la correlación positiva entre el tamaño de los cromosomas, y la distancia intergénica y tamaño de los intrones; pero donde más se ponen de manifiesto las diferencias entre micro y macrocromosomas es en la tasa de recombinación. La media para los macrocromosomas es de 2,8 cM/Mb y para los microcromosomas es de 6,4 cM/Mb, siendo 1cM aproximadamente un 1% de recombinación. Comparándolo con mamíferos, en humanos el rango es de 1-2 cM/Mb por cromosoma y en ratón es de 0,5-1 cM/Mb. Esta alta tasa de recombinación por parte de los microcromosomas es de esperar, debido al obligado sobrecruzamiento para la correcta migración cromosómica durante la meiosis. Gracias a esto se considera que el microcromosomas más pequeño será de 50 cM (Ellegren, 2005).

Se han hecho estudios de bandeo de cromosomas y de mapeo comparativo usando sondas de pollo, revelando grandes zonas conservadas, incluso entre

especies de aves muy alejadas filogenéticamente (Kasai et al, 2003). Se observó una baja ratio de duplicaciones para genes y para segmentos cromosómicos, que junto con otros estudios, parecen confirmar que los genomas de las aves han permanecido relativamente estables a lo largo de la historia (Bourque et al, 2004. Burt et al, 1999).

La hipótesis tradicional que aboga por la existencia de líneas monofiléticas dentro del Orden Galliformes: faisanes, perdices, pavos y tragopan, está siendo debatida mediante el estudio de los genomas completos mitocondriales que se van secuenciando. En el nuevo árbol filogenético que se propone (Fig. 4), el género *Alectoris* parece situarse relativamente cerca del género *Gallus* (Shen et al. 2010). Por lo tanto, es de suponer que el genoma de perdiz sea muy similar al de pollo.

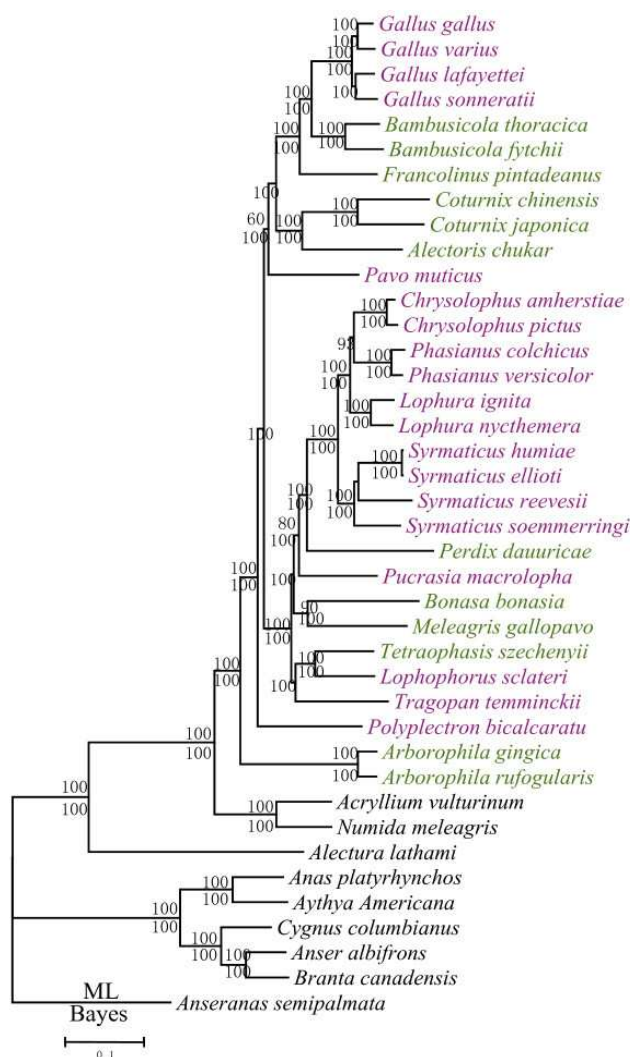


Figura 4: Árbol filogenético basado en los genomas mitocondriales de Galliformes (Shen, et al. 2010).

Dificultades para la aplicación del genoma del pollo en *Alectoris*.

El primer mapa genómico de calidad que se ha realizado para un ave salvaje ha sido para *Coturnix coturnix* (Kayang et al. 2004; Roussot et al. 2003). Un aspecto importante de la genómica comparativa es la habilidad para traspasar

información de marcadores o mapas génicos entre especies. Los investigadores han venido usando secuencias de pollo para el diseño de cebadores en el resto de especies emparentadas, y así amplificar la mayor parte de sus genes a estudio; por ejemplo, los SNPs en genes precisos han sido buscados de esta manera (García and Arruga, 2005).

En el caso de los microsatélites es más problemático. Primero porque la mayoría de los microsatélites están situados en regiones con pocos o nulos efectos selectivos, y el éxito de amplificación comparativa disminuye rápidamente al incrementarse las distancias genéticas (Primmer *et al.*1996). En segundo lugar, la utilización de microsatélites de una especie a otra, no garantiza la obtención de polimorfismo en esta última. Como ejemplo, tan solo el 5% de los microsatélites de pollo han resultado ser polimórficos en codorniz.

Situación actual del conocimiento genómico de *Alectoris*.

Hasta el mes de abril de 2011 se han localizado las siguientes entradas de estudios publicados en uno de los registros bibliográficos más importantes en biotecnología, el N.C.B.I. (National Center for Biotechnology Information). La búsqueda fue en relación al género *Alectoris* e híbridos, y *A. rufa* (entre paréntesis).

155 (71) entradas en PubMed de artículos y resúmenes.

59 (33) entradas de artículos completos en revistas de libre acceso.

1188 (407) entradas de secuencias nucleotídicas.

1 (0) entrada para un marcador de secuencia expresada E.S.T. (expressed sequence tag) procedente de una genoteca de cADN.

80 (43) entradas a GSS (Genome Survey Sequences). A diferencia de las anteriores, las secuencias tienen origen genómico y no de mRNA.

579 (159) entradas a secuencias protéicas.

33 (15) entradas a PopSet que son secuencias nucleotídicas consecuencia de estudios comparativos.

1 entrada a Taxonomía:

- o **Alectoris barbara** (Barbary partridge)
- o **Alectoris chukar** (Chukar partridge)
 - **Alectoris chukar dzungarica**

- **Alectoris chukar falki**
- **Alectoris chukar potanini**
- **Alectoris chukar pubescens**
- o **Alectoris chukar x Alectoris rufa**
- o **Alectoris graeca** (Rock partridge)
- o **Alectoris magna** (Przewalski's partridge)
- o **Alectoris melanocephala** (Arabian partridge)
- o **Alectoris philbyi** (Philby's partridge)
- o **Alectoris rufa** (Red-legged partridge)
- o **Alectoris rufa x Alectoris chukar**

IV.4 Sexaje en perdiz.

Como se ha comentando en la parte de introducción, las perdices pertenecen a un grupo de aves que carece de rasgos fenotípicos totalmente fiables para identificar su sexo. Se estima que alrededor del 50 % de las especies de aves presentan ausencia de dimorfismo sexual, ya sea en estado juvenil o adulto.

Los métodos hasta ahora empleados en el caso de la perdiz roja se basan muchas veces en observaciones subjetivas de gente familiarizada con la especie. Los rasgos por los que se suelen guiar son la observación de espolones en las patas (propias de machos, pero también de hembras añosas), y el tamaño, que suele ser algo menor en el macho (aunque también está sujeto a otras muchas variables).

El empleo de marcadores genéticos moleculares para determinar el sexo de las aves es una herramienta muy útil debido a la exactitud y rapidez de los resultados. La determinación temprana del sexo en perdices resulta de especial relevancia en programas de conservación, producción y explotación en granjas. Todos estos parámetros son controlados por genes ligados a los cromosomas sexuales; en el caso de las aves son los cromosomas Z y W y en el de mamíferos XY (Frayer and Wolpoff, 1985). En aves las hembras son heterogaméticas ZW y los machos homogaméticos ZZ. Los estudios hechos hasta la fecha sobre estos cromosomas señalan que gran parte del cromosoma W (al igual que el Y en

mamíferos) presenta señales típicas de un cromosoma sexual degenerado. Este cromosoma contiene una cantidad desproporcionada de ADN no codificante, por lo que estas secuencias han evolucionado rápidamente, incluso entre especies emparentadas. Es rico en heterocromatina, similar a la encontrada en los centrómeros, lo cual lo hace muy susceptible a cambios y mutaciones pues no está sujeta a una presión selectiva (Fridolfsson *et al.* 1998). El cromosoma Z (como el X), sin embargo, está muy conservado ya que mantiene el mismo grupo de genes codificantes, cerca de 350 (Stiglec *et al.* 2007).

Los principales genes con actuación en la determinación del sexo en aves estudiados hasta la fecha son el gen DMRT1 (Smith, 2009; Marshall, 2009) y el HINTW-Z (Ceplitis and Ellegren, 2004). DMRT1 se encuentra en el cromosoma Z y causa la formación en el desarrollo testicular en los machos. HINTW-Z está presente en ambos cromosomas y participa en el desarrollo de las gónadas.

Tradicionalmente, para sexar molecularmente se ha empleado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen de la helicasa CHD (Chromobox-helicase-DNA-binding gene), situado en los cromosomas sexuales y descrito por Griffiths and Tiwari, 1995. Los sexajes basados en este gen se caracterizan por el uso de un juego de cebadores que amplifican un fragmento del gen situado en ambos cromosomas. Al obtenerse dos fragmentos del mismo tamaño, para visualizarlo de forma correcta, se usan enzimas de restricción que corten el fragmento, obteniéndose dos bandas en las hembras (ZW), y una en los machos (ZZ) (Griffiths *et al.* 1996).

La prueba molecular se reforzó al identificarse regiones no codificantes (intrones) en el gen CHD. Esto permitió diseñar cebadores más específicos que hibridaban en una zona exónica a ambos lados de un intrón, y así amplificaban una zona no codificante. Al ser regiones menos conservadas, los tamaños que se obtienen según procedan del cromosoma Z y del W, difieren de tal manera que pueden visualizarse directamente al hacer una electroforesis en agarosa. Esto hace al método más rápido y barato, ya que no es necesaria la digestión con la enzima de restricción (Griffiths *et al.* 1998).

A pesar de que la metodología anteriormente expuesta es aplicable para un amplio rango de taxa de aves, existen dificultades para la asignación del sexo en aquellas que pertenecen a las familias Anatidae, Gruidae, Scolopacidae, Falconidae y Accipiteridae. Esto es debido a que los productos de amplificación

obtenidos del gen CHD-W y CHD-Z son muy similares, pues tan solo existe una diferencia de 2pb, que hace difícil identificar los productos obtenidos de la PCR (Ito *et al.* 2003).

IV.5 Genética de poblaciones.

Generalmente, el hábitat apropiado para una especie se presenta de manera discontinua, por lo que raramente una especie aparece como una sola unidad panmíctica. Por el contrario, cualquier especie se encuentra más o menos fragmentada en distintas subpoblaciones o poblaciones locales.

Cuando una población está fragmentada geográficamente en varias poblaciones locales, la variabilidad genética total no describe adecuadamente como está estructurada esta variación. Cuando hablamos de perdices se establecen poblaciones atendiendo exclusivamente a regiones geográficas, ya que al ser una especie cinegética, la mano del hombre está detrás de todo flujo génico. Incluso en Mallorca se ha detectado hibridación (Blanco-Aguilar *et al.* 2008). La diversidad genética total de una especie se encuentra fraccionada en dos componentes: variabilidad genética intrapoblacional (contenida en cada una de las subpoblaciones) y diferenciación genética interpoblacional (diferencias genéticas entre las subpoblaciones), por lo que es muy importante conocer el estado genético de las granjas destinadas a la repoblación y su posible endogamia.

Una población se puede describir según:

- **Frecuencias alélicas (p).** El número de veces que un alelo se encuentra presente en relación con el número total de alelos de una población en estudio, para un locus dado.
- **P (X%).** Porcentaje de loci polimórficos. La X indica el porcentaje del que el alelo más frecuente no puede superar para que el locus sea considerado como polimórfico.
- **Heterocigosidad observada (Ho).** Expresa el porcentaje promedio de loci heterocigóticos por individuo. n° de genotipos heterocigotos/ n° total de genotipos analizados.

- **Heterocigosidad esperada (He).** Proporción esperada de loci heterocigóticos por individuo en una población con cruzamientos al azar.
- **PIC (contenido de la información polimórfica).** Mide la “informatividad” de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Se calcula mediante la fórmula propuesta (Botstein *et al.* 1980).

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum (2 \cdot p_i^2 \cdot p_j^2)$$

- **Fis (coeficiente de endogamia)** (Weir and Cockerham, 1984). Mide la reducción en la heterocigosidad individual debido a las desviaciones de los cruzamientos al azar. En otras palabras, se define como la correlación de alelos homólogos dentro de individuos con referencia a la subpoblación.

$$F_{IS} = \frac{\overline{H_S} - H_I}{\overline{H_S}}$$

- H_I Promedio de la heterocigosidad observada en todas las poblaciones
- H_S Heterocigosidad esperada en cada subpoblación

- **Fst (índice de fijación).** Es la correlación de alelos homólogos dentro de una subpoblación con respecto a la población total. Es indicativo de la distancia genética entre poblaciones.

$$F_{ST} = \frac{H_T - \overline{H_S}}{H_T}$$

- H_T Heterocigosidad esperada en la población total (=Σ de todas las poblaciones)

- **Fit (coeficiente de endogamia total).** Es la correlación de alelos homólogos dentro de individuos con respecto a la población total. Se trata de una medida de la desviación respecto al equilibrio Hardy-Weinberg en el total de la población. $FIT = FIS + FST - (FIS \cdot FST)$

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

- **Gst (coeficiente de diferenciación génica):** Nei (1973) propuso una redefinición de la Fst de Wright basada en función de la diversidad génica de varios loci multialélicos.

$$Gst = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

IV.6 Genoteca.

Una genoteca, o librería genómica, es una colección de bacterias que contienen una molécula de ADN insertada en un vector. Toda esta colección de ADN clonado, representa el genoma entero del organismo fuente. Se distinguen dos tipos de genotecas: genotecas genómicas, y genotecas de ADNc (ADN complementario). La principal diferencia entre las dos radica en que la primera se construye a partir del genoma entero de un organismo, por lo que se encuentra representado en su totalidad; y la segunda se construye a partir de copias de ADN complementario del ARN mensajero presente en un determinado tejido.

La elección entre una genoteca u otra depende de lo que se quiera investigar. Una genoteca de ADNc está basada en las regiones de ADN que se transcriben, por lo que será más pequeña que una genoteca genómica en la que debería contener todo el genoma. Además, estas últimas contienen los genes en su forma nativa, incluyendo los intrones y las secuencias reguladoras (Griffiths *et al.* 2008). Hasta ahora las genotecas preparadas en perdis se han orientado hacia la búsqueda de microsatélites específicos, por lo que se han decantado por la opción de librerías enriquecidas en estas secuencias (Gonzalez *et al.* 2005).

El tamaño de la librería génica debe ser proporcional al tamaño del genoma; si un genoma de una especie es muy grande, ej: humanos 3×10^9 , necesitará una gran cantidad de clones para que esté todo representado, lo que no sucederá en un genoma pequeño como el de *E. coli* 4×10^6 .

Clonación.

Clonar significa introducir un fragmento de ADN en un vector, introducirlo en una célula, y replicar esta información para obtener cantidades abundantes del ADN clonado. Normalmente se utiliza como célula huésped una bacteria. Es un término que no debe confundirse con el de clon, ya que éste significa la obtención de copias genéticamente idénticas de un organismo. Como los clones pueden ser replicados una y otra vez, para los investigadores en biología molecular es una herramienta importantísima para la obtención de gran cantidad de material genético, aprovechándose de la capacidad de división bacteriana y su bajo coste. Esta “ilimitada” replicación del fragmento de interés no es el único aspecto importante en los clones de ADN. A través del vector es posible introducir

características adicionales que expanden su uso considerablemente. Por ejemplo un promotor de ARN polimerasa en el vector, o un promotor viral, permiten que se de la expresión de cADNs en células de mamíferos (de esta forma se han obtenido hormonas de crecimiento, insulina, etc.).

Al comienzo del experimento, el investigador debe decidir el vector de clonación a utilizar según la finalidad que persiga.

Tipos de Vector.

Los vectores deben ser moléculas pequeñas para permitir una manipulación lo mas cómoda posible. Entre sus características deben figurar las de ser capaces de replicarse en células vivas para poder amplificar el fragmento insertado, y poseer las sitios de restricción adecuadas en las cuales se pueda insertar el ADN que se quiere clonar. Esta diana debería de estar representada una sola vez en el vector, para que el inserto se establezca en solo una única posición, y que el vector no se descomponga en decenas de pequeñas piezas. También es importante contar con una manera de identificar y recuperar la molécula recombinante con rapidez. Actualmente se utiliza un gran número de vectores de clonación según los diferentes tamaños de inserto o los diferentes usos del clon (Griffiths *et al.* 2008).

Las características a tener en cuenta para la elección de un vector son:

- La talla del inserto.
- La talla del vector.
- Los sitios de restricción.
- El número de copias.
- La eficiencia de clonación.
- Capacidad para el análisis de insertos.

Plásmidos: los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómicos circulares y de doble hebra, que pueden multiplicarse en las bacterias de manera independiente al genoma bacteriano. Las características mínimas que debe poseer un vector son: un inicio de replicación (por ejemplo el origen de replicación [*ori*]), un gen de selección (lo más común es que se use un gen con resistencia a un

fármaco), y una región de clonación en el que se introduzca el ADN que se quiera clonar en el plásmido. Dependiendo del objetivo que se pretende con la clonación, el vector puede contener otras secuencias como un segundo marcador de selección, o un promotor si el propósito es la expresión del gen insertado. (Mülhardt *et al.* 2007).

El tamaño de los plásmidos suele variar entre 1 hasta 1000Kb, dependiendo de las características que presenten. Pese a que en teoría el tamaño del plásmido es ilimitado, en la práctica los fragmentos que se suelen insertar son de hasta 15kb. La dificultad de insertar fragmentos mayores a los de este tamaño se incrementa proporcionalmente.

El número de copias plasmídicas que puede contener una bacteria depende del origen de replicación. Si las copias son menores de 20, el plásmido será denominado como de bajo nivel de copia (low-copy plasmid), y si es del orden de cientos de copias por bacteria se denominará de alto nivel de copia (high-copy plasmid).

El lugar en el que se inserta el ADN es el mismo que el de la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción. La mayor parte de los vectores plasmídicos contienen de 10 a 20 de ellos, y entonces se habla de sitio múltiple de clonación (MCS de multiple cloning site) o polylinker.

Vectores virales: un vector viral es un virus modificado que hace de vehículo para introducir material genético de interés. El más común es el fago- λ . Una de las ventajas que ofrecen es su capacidad infectiva, ya que el gen clonado se introduce en las células hospedadoras con mucha más facilidad que con una transformación. Tienen una capacidad máxima de inserto de 25kb.

Cósmidos y fósmodos: son vectores híbridos entre un fago y un plásmido, de modo que su ADN puede replicarse en una célula como un plásmido, y empaquetarse como un fago. Los fósmodos son similares a los cósmidos, pero basados en el factor-F bacteriano. Pueden clonarse insertos de ADN de hasta 45Kb.

BACs (cromosoma artificial bacteriano): es una construcción de ADN basada en factor-F. Se usa como los anteriores para la clonación en bacterias, normalmente

E. coli. Los fragmentos insertados van de 30-300kb, por lo que se usan para secuenciar el genoma de organismos como, por ejemplo, en el proyecto genoma humano (McElheny, 2010). Los **PAC** son vectores de clonación similares producidos a partir del plásmido P1.

YACs (cromosoma artificial de levadura): son los vectores con más capacidad de inserto: de 300 a 1500kb. Se utilizan para clonar genomas complejos y para genes especialmente largos. Contienen el telómero, centrómero y origen de replicación de secuencias necesarias para la replicación y mantenimiento en levaduras. Fueron descritos por primera vez por Murray and Szostak en 1983.

HAC (cromosoma artificial humano): es un microcromosoma sintético con funcionamiento independiente en células humanas, en el que se suelen introducir nuevos genes. Puede albergar hasta 2000Kb. Fue sintetizado por primera vez en 1997 por Harrington and Bokkelen *et al.*

Plásmido pSMART[®]-HCKan.

Uno de los plásmidos más recomendados por sus características de clonaje es el pSMART-HCKan (Lucigen[®]), de alta replicación y con resistencia al antibiótico Kanamicina (fig. 5).

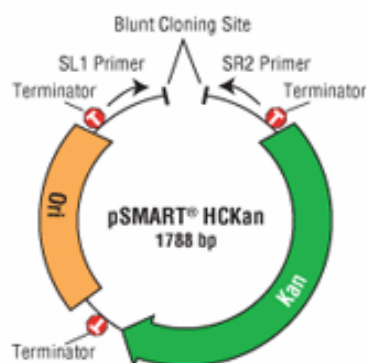


Figura 5: Mapa del plásmido pSMART-HCKan. Kan: resistencia a la kanamicina, Ori: origen de replicación.

De los kits comerciales existentes es el más indicado debido a que:

- El background de vectores vacíos es muy bajo (menos del 0,5%), y así no haría falta hacer una búsqueda (screening) para identificar los recombinantes (Godiska *et al.* 2005).

- No es necesario el uso de XGAL/IPTG y así no hay opción de obtener falsos negativos (colonias en azul claro), y falsos positivos (colonias blancas sin inserto).
- La cantidad inicial de ADN necesaria es muy poca, del orden de nanogramos.
- El kit viene recomendado por su capacidad de clonaje de zonas complicadas, como las repetitivas. En nuestro caso, esta observación es muy interesante, porque uno de los objetivos es la obtención de microsátélites.
- El plásmido posee regiones terminadoras a ambos lados del inserto, y esto elimina la transcripción dentro de la región insertada. Es especialmente interesante para aquellos insertos que se pueden comportar potencialmente como promotores o secuencias que codifican productos tóxicos.
- El antibiótico de selección es kanamicina que no crea halo de resistencia.
- La particularidad de que los extremos cortados del plásmido sean romos choca con la idea de que los extremos cohesivos ligan mejor con el inserto, ya que tiene mayor superficie para hibridar (Griffiths *et al.* 2008). Al tratarse de un plásmido que acepta extremos romos, no será necesario que estén cortados por una enzima de restricción que produzca los extremos cohesivos.

Aunque, según las características del kit, está diseñado para producir una genoteca con la máxima representación del genoma, pueden producirse resultados no esperados durante la ligación y transformación como indican (Godiska *et al.* 2005):

- La unión de varios insertos no consecutivos en un mismo plásmido, que podría falsear la lectura de la secuencia.
- La dificultad de clonación de secuencias ricas en AT y las repetitivas, y la mayor facilidad de las secuencias más cortas para insertarse, hacen que ciertas zonas interesantes puedan no estar representadas.
- La entrada de más de un vector diferente en la misma bacteria durante la transformación puede dar lugar a la amplificación de varias bandas.

Resistencia a antibióticos.

El antibiótico más estandarizado para la selección directa de clones recombinados ha sido la ampicilina. Presenta algunas desventajas como, por ejemplo, el hecho de que el producto de gen de resistencia a la ampicilina, la beta-lactamasa, es secretada al exterior para que actúe allí, por la célula hospedante del plásmido. Como resultado se crea un halo alrededor de las colonias transformadas, libre de ampicilina, en el que pueden crecer células no resistentes, denominadas colonias satélite. Éstas interfieren en el posterior análisis del inserto, pudiendo contaminar la recogida de los clones que poseen insertos. Si, en vez de tratarse de un medio sólido, se trabaja en medio líquido, el mismo proceso permite el crecimiento de clones que no han recombinado, o ni siquiera poseen el plásmido. Por esta razón se viene utilizando antibióticos cuyo producto de resistencia al antibiótico no es secretado al exterior, como la kanamicina o el cloranfenicol.

Problemática en el clonaje de repeticiones.

Los mecanismos responsables de expandir o reducir las repeticiones en células de mamíferos parecen operar también en *E. coli*. Las repeticiones genómicas pueden ser clonadas en los plásmidos (Bichara *et al.* 2000). Sin embargo, la habilidad de las bacterias para reagrupar estas secuencias interfiere en la obtención de clones con la formación original. Diversos estudios en bacterias han puesto de manifiesto que la secuencia de la repetición y los niveles de replicación y transcripción del plásmido, tiene que ver en gran medida en el mantenimiento de las repeticiones (Wells *et al.* 2005; Lin *et al.* 2010). Se ha sugerido que estos mecanismos de delección y expansión ocurren por la formación de horquillas durante la reparación (Parnieweski *et al.* 1999) o durante la replicación tanto en la hebra conductora como en la retrasada de la horquilla de replicación. Los plásmidos que sufren delecciones tienen mayor capacidad de crecimiento, en comparación con las moléculas originales sin la delección (Bowater *et al.* 1997). Minimizar la transcripción del plásmido, es por tanto, crítico a la hora de mantener la integridad de los clones que contienen repeticiones.

La cepa bacteriana.

No todas las bacterias son válidas para la construcción de genotecas. Normalmente el vector utilizado y la cepa bacteriana que se usa como hospedador están directamente relacionados. Las compañías que comercializan los plásmidos proveen también de información en cuanto a las cepas bacterianas que pueden ser utilizadas. Esto no limita la libertad de usar otras bacterias, pero lo normal es que las diseñadas por la compañía en cuestión sean las más indicadas.

Las bacterias se pueden diferenciar según sus sistemas de metilación y restricción. Estos, por ejemplo, pueden causar problemas si queremos cortar fragmentos con enzimas sensibles a la metilación. La mayor parte de cepas son Dam y Dcm positivas, lo que significa que son deficientes en estas metilasas (Ausubel *et al.* 1999)

Otro carácter a tener en cuenta es el tipo de competencia que poseen, que puede ser electrocompetente (transformación por electroporación) para una máxima eficiencia, y quimiocompetente (transformación por choque de calor).

Aunque el utilizar los plásmidos pSMART[®]-HCKan, no limita en la elección de la cepa bacteriana hospedadora (se puede usar algunas cepas comunes en laboratorios como DH10B[™] o DH5 α [™]) para asegurar unos resultados lo más óptimos posibles, se optó por la recomendada por la casa Lucigen. El no poseer aparato electroporador también condicionó la elección a: *E. coli* 10G Chemically Competent Cells. Genotipo: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 araD139 Δ (ara,leu)7697. galU galK rpsL nupG λ tonA.

Tras la elección del vector, los siguientes pasos a realizar en la construcción de una librería génica o genoteca son la preparación de los insertos y el vector, una ligación de los dos anteriores y, por último, la transformación en una bacteria hospedadora (fig. 6).

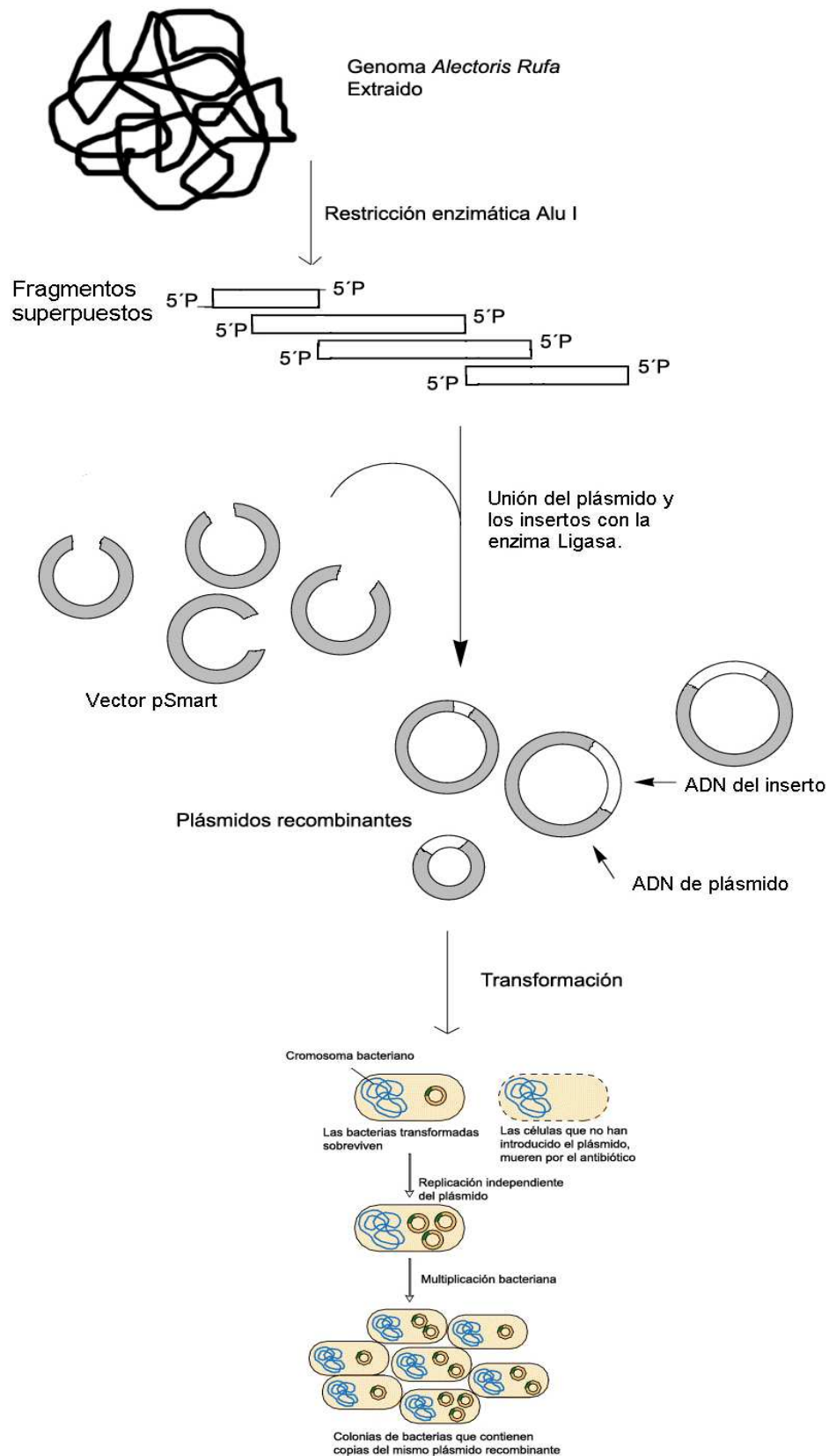


Figura 6: Resumen esquematizado de los pasos a seguir en la obtención de una genoteca.

Hibridación.

Una genoteca puede contener cientos de miles de clones con fragmentos diferentes clonados que deben examinarse en búsqueda de las secuencias existentes (Griffiths, 2008). Esto se realiza mediante el método de hibridación. Este método consiste en la fijación de ADN a una membrana para, posteriormente, hibridar de manera específica con una sonda de ADN marcado y así poner de manifiesto una secuencia buscada. Las membranas utilizadas pueden ser de nitrocelulosa o nylon en dos variantes: cargada negativamente o neutra. Las segundas, más modernas, son capaces de fijar covalentemente fragmentos pequeños (menores de 500pb), hibridar varias veces y soportar mejor distintos tratamientos que las primeras (*Mülhardt and Beese 2007*).

Las sondas empleadas en la detección pueden ser fragmentos de ADN (o ARN, según con qué se trabaje) con una longitud de 12-1000pb. Para detectar la hibridación entre la sonda y la secuencia buscada, la sonda deberá contener un marcador molecular como puede ser radioactividad (como P^{32}) o fluorescencia (como Dioxigenina o Rhodamina). La visualización se hará mediante autorradiografía en el primer caso, y a través de un microscopio, u otras técnicas de visionado en la segunda. La detección de secuencias con más o menos similitudes depende de cuan restrictiva se haga la reacción de hibridación. Por ejemplo, unas condiciones con alta temperatura y baja concentración de sales en el tampón de reacción permitirá la sola hibridación entre secuencias muy similares. Al contrario, una baja temperatura y una alta concentración de sales hará que secuencias menos similares lleguen a hibridar.

Las razones de no usar marcadores radiactivos fueron tres:

- 1) Vida media muy corta.
- 2) Resultan cancerígenos durante la preparación y uso.
- 3) Los residuos radiactivos que se generan.

Un marcador ideal debe poseer las siguientes características (Kricka, 1992):

- Fácil de unir al ácido nucleico.
- Estable en las condiciones de hibridación, con temperaturas de hasta 80°C, y expuesto a soluciones que contienen detergentes disolventes.

- Detectable a muy bajas concentraciones, usando un análisis simple e instrumental no complejo.
- Que no obstruya la reacción de hibridación.
- Compatible con distintas soluciones, por ejemplo las que se usan para preparar la membrana.
- No destructiva. El marcador debería ser fácilmente extraíble para poder usar la membrana en sucesivas pruebas. Esto no es problemático para sondas radiactivas, pero sí para las que no lo son.
- Debe permitir distinguir las hibridadas de las que no lo están.
- Estable durante su almacenaje, con una vida media larga.
- Compatible con análisis automatizados (en los casos que haya que analizar a gran escala).

No existe ningún marcador hoy en día que cumpla bien todas las características expuestas.

MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

V.1 Material animal.

Se han empleado perdices de diversas especies, procedencias y hábitat (silvestres o en cautividad en granjas). Se ha estudiado un número total de 50 individuos para el estudio de poblaciones, 10 para los estudios de sexaje, y 25 individuos para el estudio de la genoteca. Las especies utilizadas han sido *Alectoris rufa*, *A. barbara*, *A. graeca*, y *A. chukar*. Los animales procedían de las provincias de Lérida, Burgos, Jaén, Zaragoza, Álava, Badajoz, Ciudad Real, Toledo, Mallorca, Cerdeña, Grecia, y Chipre.

Los diferentes tipos de muestra que se han procesado fueron gotas de sangre fresca, impregnadas en tarjetas FTA[®] (Whatman[®] BioScience), y muestras de tejidos como plumas y lenguas en formol.

V.2 Extracción de ADN.

A) Extracción de ADN a partir de tarjetas FTA[®] (Whatman[®] BioScience) con resina chelex (Gutierrez-Corchero *et al.* 2002).

Estas tarjetas tienen una matriz que conserva la sangre para luego poder ser procesada en cualquier momento y extraer el ADN genómico. Ofrecen ciertas ventajas frente a otras formas de conservación de muestras, como mantener el ADN estable a temperatura ambiente durante mucho tiempo. De esta forma las muestras ocupan un espacio mínimo y no necesitan de refrigeración o congelación. Una vez depositadas las gotas de sangre en las tarjetas se secan a temperatura ambiente y cada tarjeta se guarda en bolsas de plástico individuales.

1.- Se corta un cuadradito de la tarjeta con un bisturí esterilizado en la llama y se añade a un tubo eppendorf de 0,5ml. A esto se le añaden 180µl de la resina Chelex[®] BioRad al 5% en agitación permanente.

2.- Una vez que queda bien mezclado se somete a 2min a 100°C en un termociclador.

- 3.- Se saca, se mezcla con un vortex y se vuelve a someter a 100°C durante 25min.
- 4.- El ADN quedará disuelto en el buffer de extracción. Antes de su uso para PCR, se remueve con un vortex, se aplica una breve centrifugación para que la resina se deposite en el fondo y se recoge del sobrenadante lo que se vaya a cargar.
- 5.- La muestra se guarda congelada.

B) Extracción de ADN a partir de sangre fresca.

El material biológico de partida fue una muestra de sangre que se extrajo desde la vena radial del ala. Para ello, se utilizaron jeringuillas con agujas de 0,3 x13 mm de diámetro, impregnadas en 80µl de heparina (5000U/ml al 5%) que impide la coagulación.

Antes de clavar la aguja, debe desplumarse un poco la zona en donde se va a trabajar, se limpia con alcohol, y se impregna con vaselina para resaltar la vena e impermeabilizar la zona. Conforme se va extrayendo la sangre, se guarda en un eppendorf de 1,5ml a 4°C en la nevera. Al acabar la extracción se aplica *Aluspray*[®] sobre la herida para una mejor cicatrización, y así permitir al supervivencia del animal.

Se probó a realizar la extracción de ADN desde sangre extraída usando distintos kits:

- *Puregene DNA isolation Kit* de *Gentra*[®], siguiendo el protocolo de la casa comercial.
- *Quantum prep aquapure genomic DNA Kit* de *Biorad*[®], siguiendo también al pie de la letra el protocolo recomendado por la casa comercial.
- *DNeasy blood and tissue* de *Qiagen*[®], variando algún paso como se explica a continuación.

Al tratarse de sangre de ave, los eritrocitos también están nucleados, y se necesita muy poco material para obtener una buena cantidad de ADN. Se pipetea 20µl de proteinasa K en una pipeta de 1,5ml a la que se añade 8µl de sangre sin coagular. El volumen se ajustó a 220µl con tampón PBS, pH 7,2 (50mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl). Para evitar posteriores interferencias en la ligación entre el ADN y el plásmido, se eliminó el ARN añadiendo 4µl de RNasa A (100 mg/ml) de Qiagen, y se mezcla e incuba a temperatura ambiente durante 2 min. El resto del protocolo

se siguió al pie de la letra según la casa comercial. Para la elución final del ADN desde el filtro se emplearon 70ul de H₂O libre de nucleasas o Buffer AE (10mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0), previamente calentados a 55°C. De esta manera se obtiene una concentración mucho mayor. Hay que tener en cuenta que el ADN extraído en agua se puede conservar menos tiempo por estar sujeta a reacciones de hidrólisis ácida.

El control de la calidad detecta el nivel de degradación de ADN durante la extracción, y se realizó migrando la muestra en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE. Para medir la concentración se utilizó un espectrofotómetro nanodrop (*NanoDrop Grupo Thermo Fisher Scientific*).

C) Extracción de ADN a partir de plumas con *Chelex*[®].

- 1.- Se cortan dos secciones de unos 2mm en la base de la pluma, que es donde se encuentran las células que contiene material genético y se depositan en un eppendorf de 0,5ml. La pluma, por tanto, debe ser arrancada; no sirven plumas de muda ni plumas cortadas con tijeras. Deben extraerse antes de que hayan pasado pocas semanas (García y Arruga, 2005).
- 2.- Se añaden 200μl de *Chelex*[®] al 5% en constante agitación.
- 3.- Se añaden 10μl de proteinasa K a partir de un stock de 25mg/ml.
- 4.- Se mezcla con un vortex y se incuba toda la noche en agitación a 55°C.
- 5.- En el termociclador se aplican dos pasos de 10 min a 100°C, sacándolo entre medias para mezclarlo bien en el vortex.
- 6.- Se recupera el sobrenadante tras centrifugar la muestra durante un minuto, dejando de esta manera la resina en el fondo del eppendorf.
- 7.- La conservación de la muestra se hace por congelación. En este caso, cuando se vaya a emplear para PCR, no precisará vortex y spin previo.
- 8.- En caso de que exista ARN que estorbe en la interpretación de geles, se añaden 10ug de RNasa por cada 100μl de muestra recuperada, y se incuba 3h a 37°C.

D) Extracción de ADN a partir de lenguas en formol.

El primer problema que presentaron es el endurecimiento del tejido al haber estado conservadas así durante meses. Tras diversas pruebas de extracción de ADN con distintos métodos, con el que se obtenían mejores resultados fue, una

vez más, *DNeasy blood and tissue* de *Qiagen*®. La clave fue el utilizar la parte de lengua que había estado menos en contacto con el alcohol y, por lo tanto, menos degradada. Se utilizó el mismo protocolo de extracción que el recomendado por la casa comercial.

E) Extracción de ADN a partir de una migración electroforética en gel de agarosa.

Tiene como objetivo la recuperación de ADN con un tamaño específico. Para ello se empleó el kit: *Montage™ DNA Gel Extraction* (Millipore), que permite extraer fragmentos de 100bp hasta 10kb en unos 10 min. Se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial.

V.3 Sexaje de perdices.

Para determinar el sexo en estos casos, la metodología empleada fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera se amplificó el gen de la helicasa CHD (Chromobox-helicase-DNA-binding gene) descrito por Griffiths y Tiwari (1995). Los cebadores utilizados han sido P2 y P8 descritos por Griffiths et al. (1998). Las condiciones de PCR para un $V_t = 18\mu\text{l}$ se indican en la tabla I.

La Polimerasa utilizada en todas las reacciones PCR ha sido: Taq polimerasa (*Ecotaq*®), y su tampón (*Ecogen*®) tiene una composición de 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM Tris-HCl (pH=8) y 0.01% Tween-20.

Reactivo	Tampón	MgCl ₂	dNTP's	Cebador P8 y P2	Taq pol.	ADN
Concentración	1x	1,5mM	0,2mM	1,6μM	0,5U	4μl

P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT

Proceso	T ^a	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5min	1
Desnaturalización	94°C	30seg	42
Hibridación	48°C	45seg	
Extensión	72°C	45seg	
Extensión final	72°C	5min	1

Tabla I: Condiciones PCR para el sexaje de perdices. 2.-Secuencia de los cebadores. 3.-Programa Termociclador.

Los fragmentos de amplificación que se obtienen son digeridos con la enzima de restricción *HaeIII* (Roche®) a 0,25 U/μl y tampón *SuRE/Cut* 1X. Se incubaba durante 4h a 37°C.

Composición *SuRE/Cut* 10X: (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritol, pH 7.5).

Los productos de restricción se migran por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt en tampón TAE, y las bandas son visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta.

V.4 Estudios poblacionales.

Se han estudiado dos poblaciones de perdices, una de 27 perdices silvestres procedentes de Extremadura, y otra de 22 ejemplares criados en cautividad procedentes de una granja de Cataluña. Para el estudio de caracterización genética de ambas poblaciones se utilizaron dos microsatélites con contrastado polimorfismo, denominados p58 y m27 (García *et al.* 2007)

Para la población extremeña, las muestras llegaron al laboratorio en forma de lenguas fijadas en formol. Para la población ilerdense, las muestras se presentaban en tarjetas FTA.

Para estudiar la existencia o no de hibridación se realizaron pruebas RFLP y RAPD (García, 2005) patentadas por el laboratorio de Citogenética y Genética molecular de la Universidad de Zaragoza. Seleccionando únicamente las perdices pertenecientes a la especie *A.rufa* se procedió a estudiar los microsatélites p58 y m27. Los cebadores utilizados para la amplificación de ambos microsatélites se marcaron con el fluorocromo FAM (Sigma-Aldrich), ya que los fragmentos amplificados para cada uno difieren considerablemente.

Se amplificaron mediante PCR con las condiciones que se indican en la tabla II en un volumen total de 12,5μl/muestra.

Reactivo	Tampón	MgCl ₂	dNTP's	Cebador F.y R.	Taq pol.	ADN
Concentración	1x	3mM	0,2mM	0,3μM	0,5U	2,5μl

p58	F: 5'-6GCGCATCACTCTCTTTCTCA	R: 5'-TGCCCTAGATGTCTGGCTTC
m27	F: 5'-6ATGCAGAATGAAACCCGAAG	R: 5'-CAAGCTGGCATGTTTTGAGA

Proceso	T ^a	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5min	1
Desnaturalización	94°C	45secs	40x
Hibridación	p58 62°C	45secs	
	m27 60°C	45secs	
Extensión	72°C	1min	
Extensión final	72°C	5min	1

Tabla II: 1.-Condiciones de PCR para los estudios poblacionales. 2.-Secuencia de los cebadores. 3.-Programa Termociclador.

El producto de PCR se migra por electroforesis con tampón TAE, en un gel de agarosa al 1% teñido con BrEt, y se revela en un transiluminador ultravioleta. Los tamaños esperados para cada microsatélite: ms. p58 $\approx$ 120pb; ms. m27 $\approx$ 350pb. Se mandan a genotipar al servicio de secuenciación de la Universidad de Zaragoza. Los datos obtenidos se tratan mediante los programas informáticos Genetix (Belkhir *et al.* 1996-2004) y Cervus (Kalinowski *et al.* 2007).

V.5 Construcción de una genoteca.

Para la realización de la genoteca se empleó como animal de experimentación una perdiz macho previamente analizada como *A.rufa* pura, de edad aproximada de un año (fig. 7).

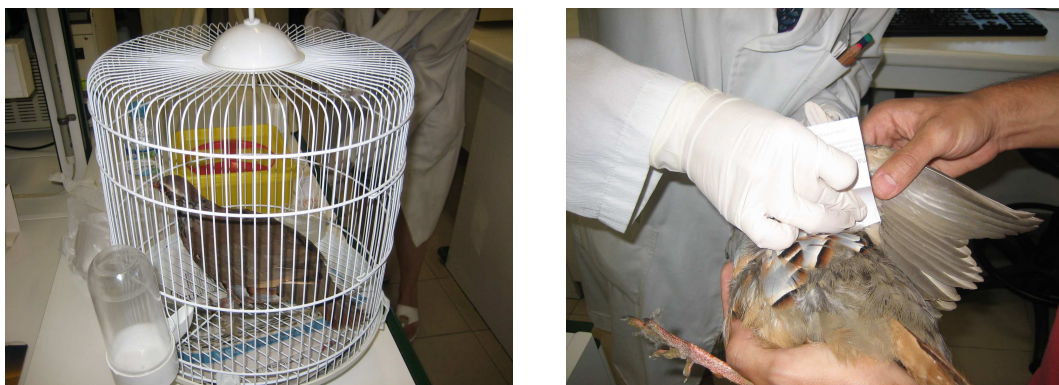


Figura 7: A la derecha se muestra el individuo conservado vivo en una jaula, y a la izquierda el proceso de extracción de sangre con tarjeta FTA.

Preparación de los insertos.

Una vez extraído el ADN genómico, el siguiente paso es prepararlo para insertarlo en el plásmido. El tamaño aceptado por el plásmido vector es de 1 a 4

kb, con la particularidad de que los extremos tiene que ser romos. La mejor manera de degradar el ADN y obtener una genoteca con el menor sesgo posible es mediante degradación mecánica. De esta manera, la ruptura del ADN será totalmente aleatoria, obteniéndose tanto extremos romos, como cohesivos, seguida por un paso de reparación de los fragmentos mediante una enzima (y así obtener extremos romos). Por último, la selección de fragmentos con un tamaño adecuado se haría tras una migración electroforética en un gel de agarosa al 1% teñida con BrEt, en tampón TAE.

Al no poseer el laboratorio ningún aparato de degradación del ADN (sonicación, nebulización, etc.) la primera opción que se empleó para degradar el ADN fue mediante **pipeteos sucesivos**. El método se basa en que, al pasar el ADN a través de una abertura estrecha como puede ser la punta de una pipeta, la hebra se romperá por sus puntos más frágiles. Cuanto más pequeña sea la abertura, más traumático será el paso de las hebras. Por ello se emplearon puntas de pipeta pequeñas transparentes (0,5-20µl, 46mm abertura). Se utilizaron diluciones 1:10 y 1:1000 en H₂O a partir del producto de extracción de ADN. Se pipetearon 200, 50 y 0 (como control negativo) veces, para comprobar si se producía degradación aparente.

La segunda opción de degradación mecánica fue mediante **congelaciones y descongelaciones** repetidas. El método se basa en que al congelar (-20°C) una muestra en tampón con alto contenido en H₂O, se formarán cristales que desestabilizarán las hebras de ADN, produciendo puntos de fractura. Al descongelar (a 50°C) y congelar de nuevo, el proceso irá rompiendo las moléculas de ADN en múltiples tamaños.

La tercera y última opción empleada fue realizar **digestiones parciales** usando una enzima de restricción. Las características debían ser por un lado que cortara dejando los extremos romos, y por otro que tuviera un sitio de restricción no demasiado complejo, acorde con el tamaño de fragmento que queríamos obtener. Si la posibilidad de encontrar una base en un sitio determinado es de $\frac{1}{4}$, con esta enzima que tiene un sitio de reconocimiento de 4pb la posibilidad de que corte en este punto es de $(\frac{1}{4})^4 = \frac{1}{256}$. Por lo tanto, si la dejamos actuar el tiempo suficiente obtendríamos teóricamente fragmento pequeños, en torno a 256pb de media. No obstante, el que tenga un sitio de restricción muy común no implica

obtener tamaños relativamente grandes, ya que la técnica consiste en variar los tiempos de restricción, dejando así actuar a la enzima más o menos tiempo.

La enzima elegida fue *AluI* (New England Biolabs 10.000 U/ml), con temperatura óptima de incubación a 37°C y capacidad de inactivarse por calor a 65°C. Se preparó un mix de reacción con el ADN extraído de perdiz, el tampón indicado para la enzima de restricción *AluI*, *NETampón4* (10X), y H₂O, hasta completar un volumen total de 150µl. El mix se reparte en 9 tubos eppendorf, de manera que el primero de ellos contenga 30µl y los restantes 15µl como se explica en la figura 8. Se añade un volumen de enzima al primer eppendorf y a partir de este se traspasan 15µl al siguiente, y así sucesivamente dejando el último como control negativo, en el que no se añade enzima. De esta manera la cantidad de enzima por eppendorf se reducirá a la mitad con cada transferencia. Se realizaron varias series de digestión usando 0,5µg ADN/eppendorf, variando la cantidad de enzima de partida (desde 4U a 1U), y manteniendo el tiempo de digestión 30min y la temperatura a 37°C. De esta manera obtendremos las mejores condiciones de restricción para obtener la mayor cantidad de fragmentos de 1 a 4kb.

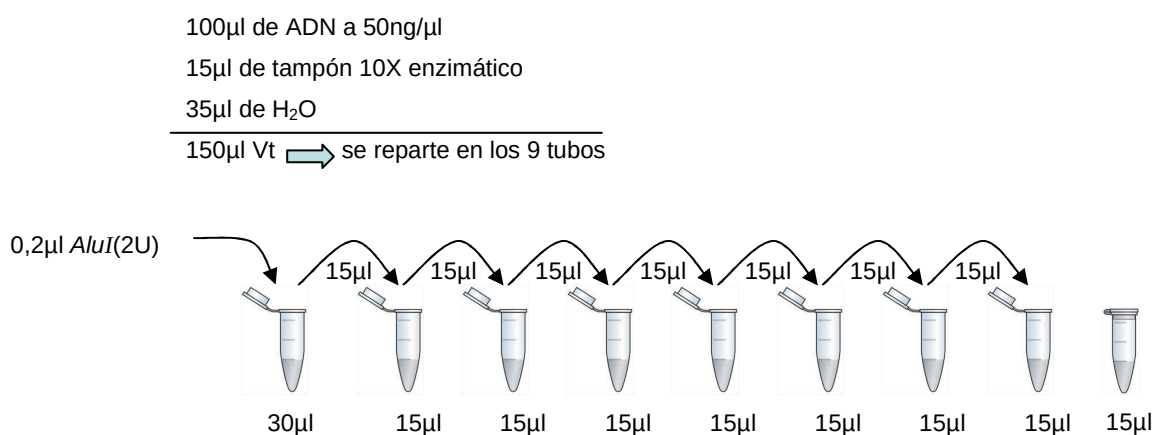


Figura 8: representación esquemática de las digestiones parciales

El conocer la concentración de enzima adecuada, permite realizar una digestión a gran escala, con todo el ADN necesario para los posteriores pasos de clonación.

Para constatar que se ha digerido en ADN en los tamaños considerados, ha de comprobarse migrando un pequeño volumen de la reacción de restricción en un gel de agarosa al 1% con BrEt, en buffer TAE.

Otras posibilidades de degradación mecánica son la nebulización (Sambrook and Russell, 2006), sonicación (Sambrook and Russell, 2006b) y ruptura hidrodinámica (Joneja and Huang, 2009). Estas técnicas fueron desechadas al no poseer el material adecuado para realizarlas

Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo recomendados por la compañía Lucigen para el crecimiento de su cepa bacteriana *E. cloni* son YT y TB. Se ha utilizado el medio YT de manera general, y el medio LB para cultivos en los que no hace falta un rápido crecimiento ni uso de antibiótico.

Un litro de medio enriquecido YT se prepara con 8g de Bacto-tyrptona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl, 15g de agar y el antibiótico Kanamicina en una concentración final de 30µg/ml.

Un litro de medio LB se prepara con 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de cloruro de sodio.

Se esteriliza a 121°C durante 20 min. Se atempera el medio a 55° conservándolo en una estufa a esta temperatura hasta que alcance la temperatura correcta. En el caso de añadir antibiótico debe hacerse en este punto, ya que si la temperatura fuera superior podría destruirlo.

Para la preparación de la kanamicina se preparó un stock a 40mg/ml. Se esteriliza mediante un filtro de 0,22µm de diámetro. Posteriormente se añaden 750µl al medio preparado.

Se reparten 20-25ml por placa de Petri. Se dejan enfriar en una campana de extracción para evitar su contaminación, y cuando se han solidificado y perdido parte de su contenido acuoso, se conservan en refrigeración a 4°C. De esta manera se pueden conservar hasta 2 meses.

Para el control de transformación con el plásmido pUC19 se preparan placas YT con antibiótico ampicilina. La metodología empleada ha sido la misma que para el medio con kanamicina.

Ligación.

Para la ligación y la transformación se ha empleado el kit *CloneSmart* de Lucigen® siguiendo las indicaciones de su manual. El vector utilizado es un plásmido modificado de los pUC19 denominado pSMART-HCkan de Lucigen® con las características de alta replicación y resistencia a la kanamicina. Los vectores vienen comercialmente predigeridos, con los extremos de tipo romo y desfosforilado para impedir la unión de forma natural. La ligación se lleva a cabo según las indicaciones del fabricante. Se han empleado 500ng de ADN digerido con el enzima *AluI*, fosforilado en 5´.

En la tabla III se indican los componentes utilizados para preparar el mix de ligación.

Volumen	Tipo de producto
3,7µl [135ng/µl]	Inserto de ADN (500ng de una digestión parcial con <i>AluI</i>).
2,5µl [4X]	CloneSmart Vector Premix (pSMART, ATP y Tampón)
1µl [2U/µl]	Ligasa CloneSmart
2,3µl	H ₂ O
10µl	Volumen total de reacción

Tabla III. Componentes del mix de ligación

Se incuba a temperatura ambiente a 21-25°C durante 2h para obtener un máximo rendimiento. Una vez transcurrido el tiempo suficiente para que actúe la enzima ligasa, se paraliza la reacción sometiendo la reacción a una temperatura de 70°C durante 15 min.

Transformación.

Antes de comenzar la transformación, las bacterias conservadas a -80°C se descongelan lentamente colocándolas en un baño de hielo. Se añade 1µl de producto de ligación al vial que contiene 40µl de bacterias *E.coloni* descongeladas. Todo el proceso debe llevarse a cabo en hielo para evitar que las membranas bacterianas comiencen a abrirse con el calor. Se mezcla bien el contenido evitando introducir burbujas de aire. La mezcla se reposa en hielo durante 30seg.

El siguiente paso es un golpe de calor para permitir la apertura de las membranas plasmáticas. Los vectores ya preparados con el inserto podrán durante este tiempo atravesar la membrana y pasar al interior celular. El eppendorf se deposita en un baño a 42°C durante 45 segundos. Rápidamente se pasa el vial al hielo y se mantiene 2 minutos para que las membranas bacterianas se cierren. Se añaden 960µl de medio de recuperación al vial de cultivo, que no es sino medio de cultivo para permitir a las bacterias comenzar a duplicarse. El vial contiene en este momento 1ml y se deja incubando en un baño a 37°C en agitación durante 1h.

Para comprobar que las colonias poseen el plásmido recombinado, se sembraron en masa 50µl del vial obtenido en una placa de Petri con medio YT+Kanamicina. Se mantienen durante 24h en una estufa a 37°C para obtener crecimiento.

Medida de la **eficiencia de transformación**.

Representa la eficacia con la que se ha producido la introducción de material genético externo a la célula hospedadora. Esto se calcula sembrando un volumen de la genoteca obtenida en una placa de Petri, se deja incubar 24h a 37°C y una vez obtenido crecimiento se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{nº de colonias resistentes al antibiótico/placa}}{\mu\text{g ADN/placa}}$$

Y para calcular en **número de colonias** que forman la genoteca:

$$\frac{\text{nº colonias resistentes}}{\text{Volumen sembrado}} \times V_t \text{ del producto de genoteca} = \text{nº colonias}$$

El número de clones recombinantes necesarios para tener una probabilidad alta de poseer el genoma completo es según la fórmula de Clarke y Carbon (1976).

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

P: probabilidad deseada, 99%
N: recombinantes necesarios como mínimo.
f: fracción del genoma en un solo recombinante.

Para calcular la probabilidad de tener representada la totalidad del genoma en el conjunto de clones que forman una genoteca, se despeja P a partir de la fórmula anterior:

$$P = 1 - e^{N \cdot \ln(1-f)} .$$

Controles.

- 1) Control positivo. Se utiliza un ADN conocido. Para ello se usó 1µl (500ng) de fragmentos de ADN digerido con *HincII* (cortado en extremos romos) provisto por el kit en la ligación. Se hace crecer 5µl de producto de transformación durante 24 h en medio YT+Kan. Existen unas tablas creadas por la casa comercial, para relacionar el crecimiento experimental con el teórico. Se comprueba por PCR que los plásmidos, contienen el inserto lambda *HincII*.
- 2) Control negativo. Sirve para poner de manifiesto que las bacterias utilizadas no tienen por sí mismas capacidad de resistencia al antibiótico kanamicina. Para ello se sembraron 25µl de bacterias *E.coli* sin transformarlas con el vector plasmídico en medio YT+Kan. No se observó crecimiento tras 24h ni 48h.
- 3) Control sin inserto (Background del vector): Se omitió el paso de añadir el inserto en la reacción de ligación sin variar el resto de pasos del protocolo. De esta manera, se conocerá el grado de autoligación del plásmido. Se siembran 50µl por placa y se hace crecer en medio YT+ Kan a 37°C. Según el fabricante cualquier número de colonias obtenidas menor de 25 significa que existe un background menor al 0,1%. La explicación es que al mantenerse el vector de forma lineal, no se transcribe el gen que codifica para la resistencia al antibiótico.
- 4) Control de transformación. Se usó un plásmido del que se conoce su rendimiento de transformación como es el plásmido pUC19. El proceso de ligación y transformación se realizó siguiendo el protocolo marcado por el kit.

La única variación fue a la hora de sembrar, ya que se consideró la cantidad recomendada como muy pequeña para obtener un resultado sin sesgo (2µl por placa). Se optó por sembrar una segunda vez con una mayor cantidad (100µl/placa). El número de colonias que se deben obtener en condiciones óptimas viene calculado por la casa comercial.

Conservación.

Las células obtenidas son directamente congeladas en un vial con glicerol para evitar la ruptura de las células, a -80°C para una conservación a largo tiempo. En posteriores usos se recoge una pequeña alícuota con la ayuda de una punta de pipeta, con la precaución de no descongelar totalmente el vial.

V.6 Estudios de la genoteca.

Miniprep.

Esta técnica se emplea para aislar el plásmido del resto de la célula y sus componentes. Para ello se utilizó el kit *Qiaprep® Miniprep* de Quiagen, que se fundamenta en la lisis alcalina de las células (Birnboim y Doly 1979) seguidas por una adsorción del ADN en una membrana de silica-gel.

Los tres pasos para su realización son:

- 1.- Cultivo de colonias de la genoteca y lisado de las células.
- 2.- Adsorción del ADN en la membrana de silica-gel.
- 3.- Lavado y elución del plásmido aislado.

Para comprobar que los clones poseen los fragmentos de ADN del genoma de perdis insertados en los plásmidos, se amplifican por PCR usando como cebadores los extremos flanqueantes del inserto. Esta prueba complementa al control positivo de ligación.

Para ello se cultivaron 10 colonias individualizadas en 5ml de medio líquido LB + Kanamicina [30µl/ml] a 37°C y en agitación durante toda la noche. Tras observar que existe crecimiento y que la muestra no está contaminada, se

centrifuga para obtener el pellet. Las células bacterianas son lisadas con SDS a alto pH (NaOH 0,2M), con lo que se consigue la desnaturalización del ADN. Al neutralizar posteriormente la preparación, el ADN del plásmido renaturaliza, pero no así el ADN bacteriano de mayor peso molecular, que precipita formando un complejo de proteínas-ADN-SDS. Se hace pasar el sobrenadante a través de una membrana de sílica-gel, que adsorberá el plásmido. Los componentes celulares desnaturalizados y precipitados pasan a través del filtro. La extracción del plásmido se realiza mediante un tampón (10mM Tris.Cl, pH 8.5) bajo en sales o H₂O.

Amplificación directa desde colonia.

Para amplificar el inserto de genoma bacteriano, se procede a la recogida directa de las colonias. Esta técnica es mucho más rápida y barata, ya que evita el empleo de Kits comerciales.

La particularidad que presenta es que el ADN necesario para la reacción de PCR se toma sin “depurar”, es decir, se utiliza una punta de plástico y se recoge cierta cantidad de la colonia crecida que puede considerarse como 1µl. Esto se mezcla con el resto de mix de manera homogénea (ver figura 9). Puede aparecer algo de material celular decantado tras la amplificación en el termociclador, que es fácilmente eliminado si se recoge el sobrenadante y se traspasa a otro tubo eppendorf.

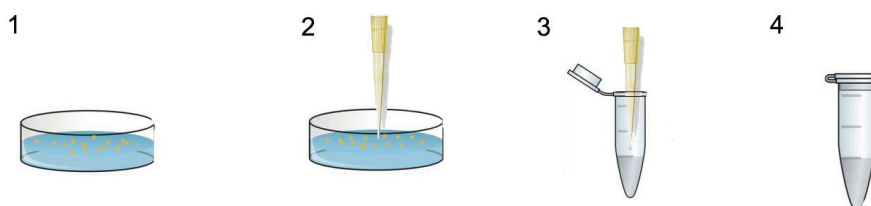


Figura 9: 1) Placa de Petri con medio YT+Kan y colonias de la genoteca que han crecido de manera individualizada. 2) Recogida de colonia usando una punta de pipeta. 3) Mezcla de la colonia con el mix de PCR. 4) El eppendorf ya está listo para termociclar.

Debido a las características de la PCR, la elevación de temperatura que se produce en la primera etapa (94°C, 10 min), es suficiente para romper la pared y

membranas celulares y así facilitar la mezcla de material genético con los productos de PCR. Como los cebadores usados (SL1 y SR2), solo hibridan a ambos lados del inserto, se amplificará tan solo esta región. El producto obtenido se visualiza haciéndolo migrar en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE.

Las condiciones de amplificación por PCR en un $V_t=13\mu\text{l}$ se presentan en la tabla IV.

Reactivo	Tampón	MgCl ₂	dNTP's	Cebador SL1 y 2	Taq pol.	ADN
Concentración	1x	3,85mM	0,48mM	0,096 μM	1U	$\approx 1\mu\text{l}$

SL1	5'-CAGTCCAGTTACGCTGGAGT
SR2	5'-GGTCAGGTATGATTAAATGGTCAGT

Proceso	T ^a	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10min	1
Desnaturalización	94°C	1min	42x
Hibridación	58°C	1min	
Extensión	72°C	3min	
Extensión final	72°C	10min	1

Tabla IV: Condiciones PCR para una amplificación directa desde la colonia. 2.- Secuencia de los cebadores. 3.- Programa Termociclador.

Preparación de un stock de ADN.

En los casos en que se obtuvieron insertos, que por sus características eran interesantes para el estudio pormenorizado, se procedió a su conservación. La metodología empleada se basa en la capacidad del NaOH para romper las células bacterianas, obtener el ADN concentrado, y su no interferencia en PCR. (Sambrook and Russell, 2001).

Se cultiva la colonia en 5ml de medio YT+Kan líquido 37°C en agitación durante 24h en un tubo de ensayo. Se centrifuga el tubo para separar la fase celular de la acuosa y así obtener el pellet. Se pasa a un tubo eppendorf y a este se añaden 100 μl de NaOH [0,5M] se mezcla con un vortex, y se deja actuar 15 minutos. Durante este tiempo el hidróxido de sodio actuará rompiendo las células y atacando las ribosas del ARN. Se centrifuga durante 10min a 10.000rpm obteniéndose, por una parte el pellet con los restos bacterianos, y por otra el ADN en el sobrenadante. Para guardarlo como stock se recogen 5 μl de este sobrenadante y se añade 200 μl de H₂O, o de tampón TE si se considera conservarlo por más tiempo. El ADN quedará como ssADN (ver figura 10). Se mide la concentración final con un nanodrop.

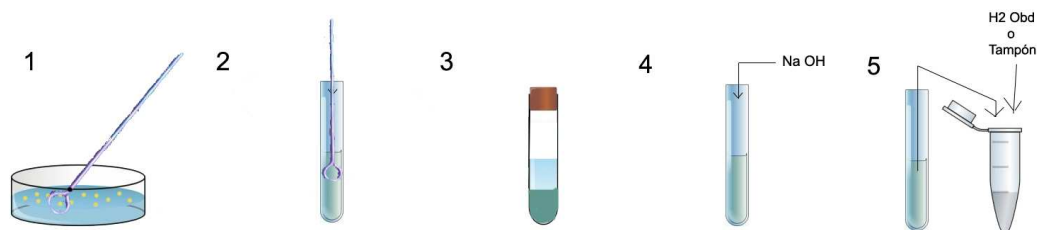


Figura 10: Extracción de ADN para su preparación como stock por el método del NaOH.

Otro método para conservar los insertos de interés mostrado en la figura 11, se hace recogiendo desde el mismo producto de PCR un pequeño volumen y diluirlo 1:1000 en H₂O_{bd}.

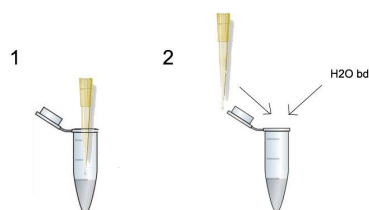


Figura 11: Método para preparar stock de ADN a partir del producto de PCR.

Secuenciación de las muestras.

La secuenciación de las muestras se realiza en el servicio de secuenciación de la Universidad de Zaragoza mediante un secuenciador de ADN Megabace 500 (GE Healthacare) que permite la separación de fragmentos de ácidos nucleicos por electroforesis capilar. El tamaño óptimo para secuenciar es de unas 600-800bp.

Para comprobar si el método por el que se han amplificado los fragmentos influye en la secuenciación, se mandó secuenciar un mismo fragmento amplificado:

- 1.- Tras extraer el plásmido con miniprep.
- 2.- Tras recoger su colonia directamente con el método de la punta.

El estudio se hizo con 4 insertos distintos. Para el Tratamiento de secuencias nucleotídicas se empleó el programa Bioedit 7.0 (Hall, 1999).

Para las búsquedas y comparativas de secuencias, se empleó la base de datos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Se usó para comprobar si

existían estudios previos de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de la genoteca, y en tal caso conocer las diferencias entre ellas.

Para la obtención de cebadores en los distintos estudios de la genoteca, se utilizó el programa Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). Para dar validez a los cebadores se chequea en BLAST para secuencias similares en *Alectoris* y otras especies emparentadas como *Gallus gallus*, y se comprueba que no existan hibridaciones en otras zonas.

Selección de colonias para su estudio.

Se estudian las colonias que poseen insertos con un tamaño adecuado para su secuenciación: de 0,5 a 1,5kb. Fragmentos menores a estos tamaños serán poco informativos y fragmentos mayores presentan problemas de fidelidad de secuencia en la lectura. Para ello se eligen colonias al azar que hayan crecido de manera individualizada del resto, y de esta manera evitar una posible contaminación con bacterias de otras colonias vecinas. Se amplifican por PCR empleando el método de la punta de pipeta y para su visualización, se hace en un gel de agarosa teñido con BrEt al 1%.

Para la amplificación de los microsatélites obtenidos mediante selección de colonias al azar (GTTTT)_n y (AG)_n, las condiciones de PCR para un volumen total por muestra de 13µl fueron las indicadas en la tabla V.

Reactivo	Buffer	MgCl ₂	dNTP's	Cebador F. y R.	Taq pol.	ADN
Concentración	1x	3,85mM	0,48mM	0,25µM	1U	1µl

Para ms. (GTTTT) _n	R: 5'-CGGAAGAGATCTGTTTGAAGATG
	F: 5'-ACTCTAGGTGCATGCAAGCC
Para ms. (AG) _n	R: 5'-TGTGGACCAGCAGCTGTACT
	F: 5'-GCTGAGATAGGTGTGCGTTC

Proceso	T ^a	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10min	1
Desnaturalización	94°C	1min	30x
Hibridación	61°C para (GTTTT)n	1min	
	57°C para (AG)n		
Extensión	72°C	3min	
Extensión final	72°C	10min	1

Tabla V: 1.- Condiciones PCR para amplificar los microsatélites (GTTTT)_n y (AG)_n. 2.- Secuencia de los cebadores. 3.- Programa Termociclador.

Búsqueda de microsatélites mediante PCR.

Se diseñó, utilizando como herramienta la PCR, una vía directa para la obtención de marcadores microsatélites a partir de colonias. Se trata de una búsqueda orientada hacia aquellos microsatélites más comunes en perdiz (Gonzalez *et al.* 2005; Ansón *et al.* 2009) que son repeticiones en tandem de (TG)_n o (AC)_n (según el sentido desde donde se mire). Son estas repeticiones en número de 12, las que se usaron como cebadores tras comprobar previamente con el programa primer3 que funcionan en combinación con los cebadores que amplifican el inserto, que no hibridan con ninguna región propia del plásmido ni del genoma bacteriano. De esta manera se diseñó una metodología consistente en 5 amplificaciones PCR por clon, variando las combinaciones de las parejas de cebadores (fig.12). El número de amplificaciones esperadas, en el caso de que el inserto contenga el microsatélite en cuestión, será de dos reacciones complementarias (SL1/(TG)₁₂ con SR2/(AC)₁₂, o SL1/(AC)₁₂ con SR2/(TG)₁₂), más el control SR1-SR2 que amplifica el inserto en su totalidad. Ambas bandas complementarias deberían sumar el tamaño del inserto (fig.13). Las colonias que resultaron positivas se secuenciaron y con el programa Bioedit 7.0 (Hall, 1999) se comprobó el tipo y número de repeticiones que presentaba.

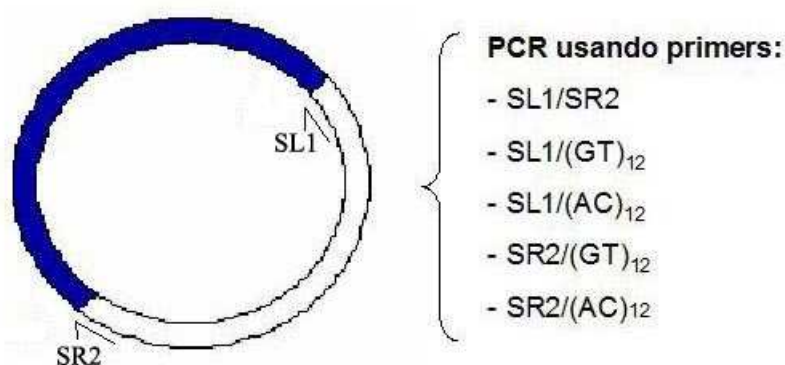


Figura 12: Combinaciones de cebadores usados.

En el caso en que tengamos el microsatélite situado en una zona interior del fragmento, las combinaciones de cebadores (SL1-TG) y (SR2-AC), amplificarán obteniéndose al sumar ambas el equivalente al tamaño del inserto al completo (SL1-SR2). Como se ve en la figura 13, las combinaciones (SL1-AC) y (SR2-TG) no producen amplificación, al unirse en la misma hebra de ADN.

En el caso de tener el microsatélite cercano al extremo del inserto, se obtendrá un fragmento muy grande y otro muy pequeño, cuya suma será igual a la de fragmento al completo (SL1-SR2). Puede dar lugar a confusiones en la lectura, sobre todo en la visualización del fragmento más pequeño (fig.13).

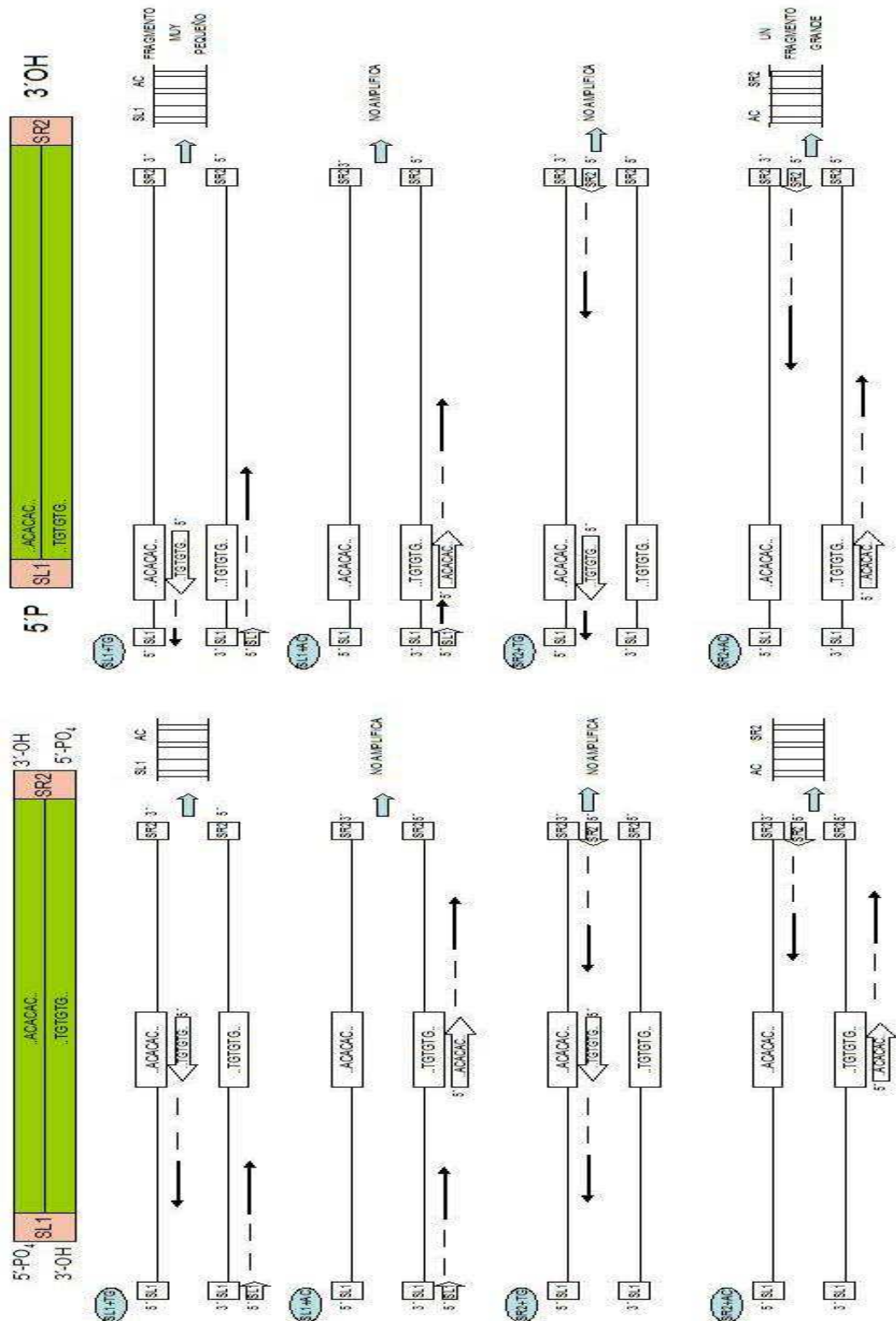


Figura 13: Reproducción esquemática de los resultados teóricos que se deben obtener en PCR con las combinaciones de cebadores anteriormente indicados.

Las condiciones de amplificación por PCR en un $V_t=13\mu\text{l}$ se presentan en la tabla VI:

Reactivo	Tampón	MgCl ₂	dNTP's	Cebador F. y R.	Taq pol.	H ₂ O
Concentración	1x	3,85mM	0,48mM	0,2 μ M	1U	5 μ l

SL1	5'-CAGTCCAGTTACGCTGGAGTC
SR2	5'-GGTCAGGTATGATTAAATGGTCAGT
AC	5'-ACACACACACACACACACACAC
GT	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

Proceso	T ^a	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10min	1
Desnaturalización	94°C	1min	30x
Hibridación	58°C	1min	
Extensión	72°C	3min	
Extensión final	72°C	10min	1

Tabla VI: 1.- Condiciones de PCR para la búsqueda de microsatélite usando cebadores con las repeticiones buscadas. 2.- Secuencia de los cebadores. 3.- Programa Termociclador.

Hibridación de la genoteca con sondas fluorescentes.

Se pretende estudiar colonias de la genoteca de una manera encaminada a la búsqueda de microsatélites complementarios a la sonda empleada. En este caso dos repeticiones de las más comunes en aves (AC)_n y (AG)_n.

El método elegido en un método de observación directo, en la que las sondas específicas para el análisis están directa y covalentemente unidas con el grupo que genera la señal.

1.- Preparación de las colonias.

Se parte del vial en el que está contenida la genoteca. Como se encuentra guardado en congelación a -80°C, el tránsito de medio sólido a líquido debe hacerse de la manera menos traumática posible para las bacterias. De esta manera se deja descongelar lentamente en hielo picado, hasta que tenga la consistencia adecuada para su captura con una pipeta. Se pretenden conseguir colonias individualizadas a partir del vial. Por ello se hacen diluciones, de tal manera que se mezclan 75 μ l de genoteca + 925 μ l de YT líquido. A partir de esto se

diluyó 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} . Se sembraron 200 μ l de cada dilución en placas de Petri YT+Kan y se incubaron en una estufa a 37°C 24h.

Una vez obtenidas suficientes colonias individualizadas para la experiencia, es necesario ordenarlas y para ello se usaron placas con forma cuadrada de 10x10cm con medio YT. El uso de este tipo de placa es debido a su particular tamaño y forma, en las que se pueden obtener 144 colonias/placa (fig.14). Se obtienen una mayor cantidad de colonias bien aislada por superficie, además de una mejor ordenación y fácil manipulación a la hora de superponer la membrana. Se utilizan puntas de pipeta estériles para transferir las colonias desde las placas de Petri hasta las placas cuadradas. Es una manera directa, limpia, y muy difícil que se produzca contaminación si se lleva a cabo en el entorno adecuado. Se preparó una replica por placa para conservarla como placa maestra. Para ordenar las colonias se construyó una plantilla cuadriculada transparente que sirviera de guía para la colocación de las distintas colonias (fig.18).

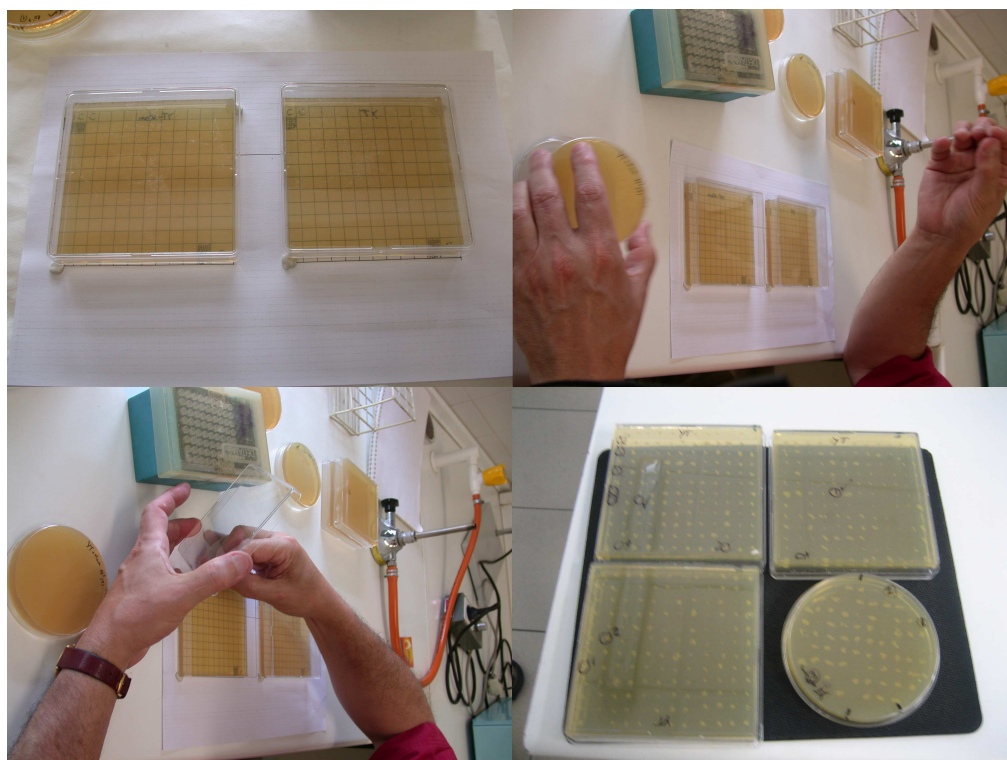


Figura 14: 1) Placa de cultivo cuadrada y su réplica. 2) y 3) Transferencia de colonias de manera individual colocándolas en su casilla correspondiente. 4) Crecimiento ordenado de las colonias.

2.-Preparación de la membrana.

Se utilizaron membranas *hybond nylon(-) healthcare*. Este tipo de membranas permite la unión de moléculas de ADN de forma covalente a su matriz. Debido a su comercialización en grandes láminas, es el investigador el que las corta con el tamaño y la forma de interés. En nuestro caso se cortaron cuadradas y como referencia se cortó una muesca en un extremo, en donde se numera la membrana a lápiz. De esta manera y teniendo en cuenta la cara donde está escrito el número, se conoce la orientación de la membrana y donde están situadas las colonias.

1.- La membrana se extiende en la placa de tal manera que la humedad presente embeba y se quede fijada, y así las colonias queden impresas en ella.

A continuación se realizaron una serie de tratamientos (Sambrook and Russell, 2001) utilizando una bandeja lavadora como contenedor. En el fondo se coloca papel de filtro para que, estando totalmente empapado y con un poco de líquido en exceso, las membranas de nylon queden totalmente expuestas y así no floten.

2.- El primer tratamiento es la aplicación de una solución desnaturalizante (para 200ml: 4g NaOH +17,5g NaCl + H₂O) durante 6min. El NaOH lisa las células y desnaturaliza las cadenas de ADN separándolas. El NaCl pegará el ADN a la membrana previamente a la fijación con U.V.A.

3.- Seguidamente, se aplica una la solución de neutralización (para 200ml: 12,1g TrisBase + 150ml H₂O). Esto se ajusta a ph 7,4 con alrededor de 7ml de HCl. Por último, se añade 17,5g de NaCl y se completa con H₂O.

4.- El tercer tratamiento es con SSCx2 para equilibrar el contenido de sales.

Para preparar 200ml de SSS X 20: 35,06g NaCl + 17,64g Na₃citrato + H₂O hasta completar. Tras ajustar el ph a 7 con NaOH se debe autoclavar.

5.- Se prepara una lámina de papel secante plegado sobre sí mismo, en el que se depositan las membranas. Todo esto se mete en un horno a 80°C para que el secado sea completo y así durante la posterior manipulación no se pierda material.

6.- Las membranas de nylon se cubren con papel film de cocina transparente. De esta manera se introducen en un transiluminador y se les somete a un golpe de luz ultravioleta durante 1min (se considera poco tiempo para que se formen dímeros de timina) para fijar el ADN a la membrana. Las membranas ya pueden guardarse en refrigeración durante unos días.

3.- Preparación de las sondas.

Como sonda se han elegido las dos repeticiones más comunes en el genoma aviar (Primmer *et al.* 1997; Brandström and Ellegren, 2008) (AC)₁₃ y (AG)₁₃ (Sigma®), marcadas con los fluorocromos TexasRed y Fluoresceína con el fin de que fueran compatibles con el microscopio de fluorescencia utilizado (Nikon Eclipse E400).

(AC)₁₃ marcada con Texas Red -----→ Emisión roja. λ_{max} emisión = 527

(AG)₁₃ marcada con Fluoresceína -----→ Emisión verde. λ_{max} emisión = 622

Antes de comenzar a hibridar con las secuencias tandem diseñadas, hay que asegurarse de que no existen repeticiones en el genoma de la bacteria que puedan producir interferencias y falsos positivos. Como la cepa utilizada ha sido *E.coli* 10G de Lucigen y tiene copyright, su secuencia no se encuentra publicada en bancos de datos públicos. Por tanto, la búsqueda de estas posibles hibridaciones se hizo poniéndolas de manifiesto frente al genoma de *E.coli* en BLAST (ya que *E.coli* 10G es una cepa derivada de esta). Se hizo lo mismo para el vector usado pSMART-HCKan®.

4.- Hibridación.

1.- Prehibridación. Previamente a la hibridación, es necesario preparar las membranas para retirar el exceso y los restos de las colonias, pero, sobre todo, para saturar los espacios que quedan vacíos, para que no unan nada más. Se utiliza un baño con agitación a 65°C. Se realizan 2 lavados de 1h con 150ml de

solución de prehibridación, utilizando un Tupperware profundo como soporte (fig.15).

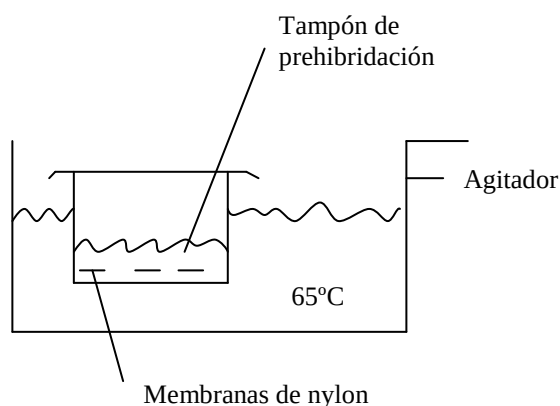


Figura 15: Esquema explicativo del proceso de prehibridación

Composición de la solución de prehibridación según Sambrook y Russell, 2001.

2g de leche desnatada en polvo.....	0,5% p/v.
120ml de 20X SSC.....	6X
0,8ml de 10% SDS.....	0,02% p/v.
4ml de 10% N-laurylsarcosina.....	0,1%.
275,2ml de agua.	
400ml de volumen total.	

2.- Para la hibridación es necesario poseer unas bolsas con cierre hermético, que impida la pérdida de líquidos como se muestra en la fig.16. La preparación de la solución de hibridación se hace con la misma solución de prehibridación a la que se le añaden las sondas marcadas. La concentración necesaria de sondas es de 50-200ng/ml (Sambrook and Russell, 2001). La concentración media empleada fue 125ng/ml. Se mantiene en agitación durante toda la noche a una temperatura de hibridación de 45°C.

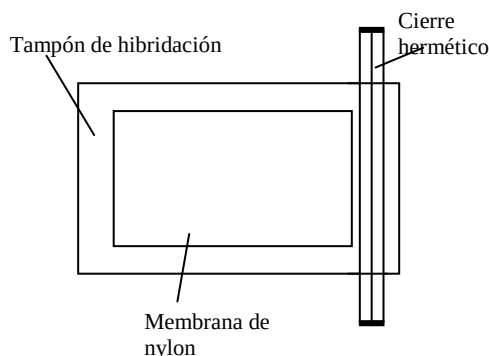


Figura 16: Esquema de la preparación de las bolsas de hibridación.

3.- Una vez efectuada la hibridación de la membrana, el siguiente paso fueron una serie de lavados a distintas concentraciones en sales como se indica en la tabla VII. Muchos investigadores consideran el lavado como el más importante de los pasos para obtener la especificidad buscada. Las sales permiten que se formen puentes de hidrógeno y se ira reduciendo esta concentración de tal manera que se mantengas las uniones entre el ADN y la sonda. Se lleva a cabo en un baño a 35°C para facilitar de esta manera la eliminación de uniones inespecíficas y que permanezcan las específicas.

Volumen (ml)	Concentración de sales	Tiempo (minutos)
150	4 X SSC	10
150	2 X SSC	15
150	2 X SSC	15
150	0,2 X SSC	5
150	0,2 X SSC	5

Tabla VII: Se muestran los sucesivos lavados a los que se sometieron las membranas.

4.- Por último, se secan las membranas depositándolas sobre papel secante durante 1h a temperatura ambiente. De esta manera ya están listas para su visionado en microscopio.

5.- Visionado con el microscopio.

Para la observación de las colonias hibridadas con las sondas ADN marcadas con Texas-Red y Fluoresceína se empleó un microscopio de

fluorescencia modelo Nikon Eclipse E400 con iluminador vertical. El filtro utilizado tiene la característica de emitir una triple banda de excitación y así poder visualizar tres fluorocromos simultáneamente; azul, verde y rojo (en nuestro caso los dos últimos), con un mínimo de interferencia. Las longitudes de onda de excitación:

$\lambda = 385\text{-}400\text{nm}$. Excitación violeta y señal en azul.

$\lambda = 475\text{-}490\text{nm}$. Excitación en azul y emisión en verde.

$\lambda = 545\text{-}565\text{nm}$. Excitación en verde y repuesta en rojo.

Se empleó un objetivo de 10x y un ocular 10x. Para realizar la captura de las imágenes se empleó una cámara digital acoplada con salida a un ordenador (ver montaje en fig.17). Para lograr una visión de la membrana al completo sin tener que cortarla en partes más pequeñas, se utilizó una porta de 10cm x 8cm. De esta manera se logró situar la mayor parte de la membrana encima del porta, y tan solo realizando dos cambios de posición se conseguía revisar toda la superficie. La fabricación de una plantilla transparente, cuadrículada y con la posición de los controles indicada, sirvió para correlacionar la posición de los híbridos en la membrana y el la placa maestra.



Figura 17: Fotos tomadas en la visualización con microscopio de fluorescencia de las colonias hibridadas.

6.- Controles de hibridación.

La disposición de los controles en la membrana de hibridación pueden observarse en la figura 18.

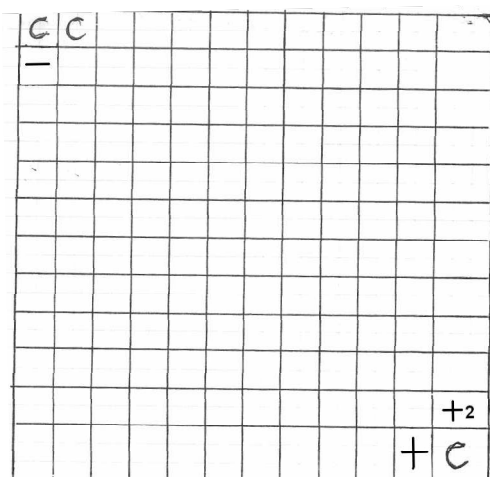


Figura 18: Detalle de la disposición de los controles en las placas en la plantilla usada para disponer las colonias.

- (C): Se trata de un control negativo. Son colonias de bacterias *E.coloni* 10G sin transformar y, por tanto, sin plásmido. No debe dar señal.
- (-): Control negativo. Contiene tan solo el plásmido pSMART HC-Kan sin inserto y, por lo tanto, tampoco ha de dar señal.
- (+): Control positivo que contiene la secuencia (TG)₁₂. En este caso debe obtenerse señal luminosa en rojo, ya que su sonda complementaria (AC)₁₃ está marcada con TexasRed .
- (+2): Se utiliza también como control positivo 1μl de las sondas diluidas 1:10 (10μM) en un trozo de membrana para comprobar la emisión de fluorescencia verde y roja. Las sondas se colocan justo antes de visualizar la membrana, por lo que no reciben ningún tipo de tratamiento.

7.- Examen de los positivos.

Tras localizar en la membrana las colonias que emiten fluorescencia, se correlacionan con la placa maestra, y se recoge una pequeña muestra de las colonias correspondientes. Después se siembran en medio sólido TY+Kan cultivándose 24h a 37°C, y se amplifica el inserto por PCR.

Las condiciones de PCR utilizadas para un Vt = 13μl se muestran en la tabla VIII. La manera de introducir la fracción de ADN en el mix de reacción es la misma que la usada en el apartado de “amplificación directa desde colonia”.

Reactivo	Tampón	MgCl ₂	dNTP's	Cebador SL1 y 2	Taq. Pol.	ADN
Concentración	1x	3,85mM	0,5mM	0,1mM	1U	≈ 1μl

Proceso	T ^a	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5min	1
Desnaturalización	94°C	45secs	30x
Hibridación	60°C	45secs	
Extensión	72°C	2min	
Extensión final	72°C	5min	1

Tabla VIII: Condiciones de PCR para los positivos en el examen de hibridación.

La lectura de los fragmentos amplificados se realiza en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt, en tampón TAE y tras una exposición a luz ultravioleta en un transiluminador. Los insertos amplificados se envían al servicio de secuenciación de la Universidad de Zaragoza. Para el análisis de las secuencias se usó el programa Bioedit 7.0 (Hall, 1999). En los casos en que se obtuvieron secuencias candidatas a microsatélites, el siguiente paso fue obtener unos cebadores con los que se amplificara la repetición en cuestión. De esta manera se podrá amplificar en individuos con distinto origen y se comprobará la variabilidad alélica del microsatélite.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VII.1 Extracción ADN.

Sangre fresca.

Se probó a realizar la extracción de ADN desde sangre extraída con heparina usando distintos kits:

- Puregene DNA isolation Kit de Gentra. Se obtuvo el material muy degradado.
- Quantum prep aquapure genomic DNA Kit de BioRad. La concentración del ADN aislado fué muy baja.
- DNeasy blood and tissue de Qiagen. Los resultados obtenidos con este fueron los mejores en comparación con los kit anteriores.

La concentración media de ADN obtenida en las extracciones con este último kit de Qiagen fue de 180ng/μl. El rendimiento teórico según el protocolo predice que usando 5μl de sangre se obtienen 9-40μg de ADN, y el rendimiento real obtenido usando 8μl de sangre fue de de 12,6μg (1,57μg ADN/μl sangre).

Para comprobar la integridad de la muestra obtenida se migró en un gel de agarosa (fig.19). Al compararlo con un marcador molecular que, como máximo registra 2,6Kb, se puede concluir que la integridad es buena por obtener tamaños muy superiores a este último.

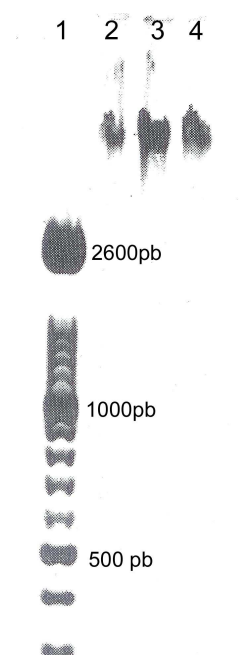


Figura 19: Comprobación de la calidad en la extracción con el kit de Quiagen. Calle 1 Ladder XIV Roche®, calles 2,3 y 4 muestras extraídas con DNeasy blood and tissue de Qiagen.

VII.2 Sexaje de perdices.

El trabajo de Griffiths *et al.* de 1998 indica que en la especie *Gallus domesticus*, que pertenece a la misma familia que la perdiz, la Phasianidae, es susceptible de sexaje por PCR sin necesidad de una digestión enzimática. Simplemente, se visualizarían una o dos bandas en un gel de agarosa al obtenerse distinto tamaño de bandas según amplifique en el cromosoma Z o W.

Tras sexar *Alectoris rufa* siguiendo la misma metodología, se ha visto que en el caso de perdices, al igual que en otras familias de aves, la visualización directa de dos bandas no es posible (fig.20). Esto puede ser debido a la obtención de bandas para machos y hembras con tamaño idéntico, o con muy pocas pares de bases diferentes. Si la diferencia se debe a unas pocas pares de bases, sería necesario un gel de agarosa lo suficientemente concentrado como para que ambos fragmentos migraran a distinta velocidad, o utilizando geles de acrilamida. La opción de digerirlo utilizando una enzima de restricción como *HaeIII* (fig.20), sí ha dado resultados aparentes, por lo cual en nuestro caso la metodología aplicada fue una RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). En este caso, el corte por la enzima de restricción al producto amplificado es selectivo para CHD-Z, pero no para W; de esta manera se visualizan las hembras con dos bandas y los machos con una (Reddy *et al.* 2007).

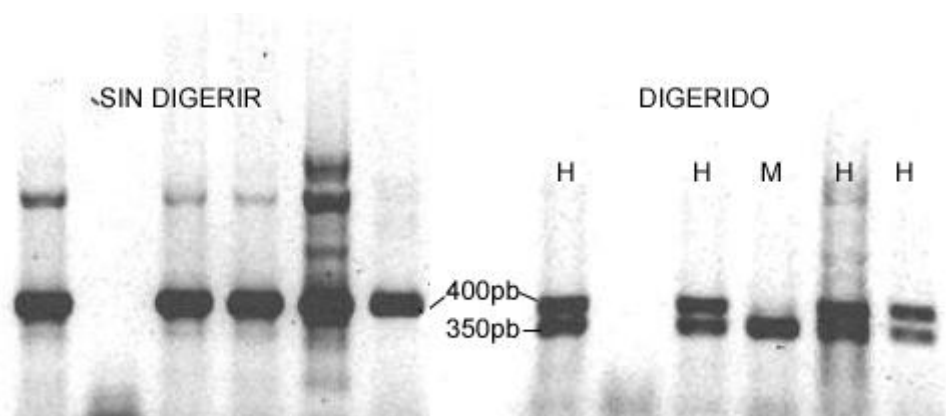


Figura 20: Sexaje con cebadores P2-P8 de 6 muestras pertenecientes a 6 individuos diferentes de *Alectoris rufa*. H: hembras. M: machos.

En la figura 20 se observa cómo en las 6 primeras muestras migradas directamente a partir del producto de PCR no se dilucidan las dos bandas. En las 6 siguientes, que sí están digeridas con *HaeIII*, se ven dos bandas en el caso de las

hembras y una banda en los machos. La tercera banda esperada según el trabajo de Griffiths *et al.* (1998) tendría unas 43pb y tendría que verse cerca del frente de migración, en la parte baja de la imagen. Como puede comprobarse, no aparece ni rastro del fragmento, salvo una pequeña mancha difuminada, debida seguramente a un exceso de cebadores. El individuo sexado en la calle 2 no ha amplificado y por ello se ve vacío.

Esta metodología PCR-RFLP tiene la limitación de la necesidad de una secuencia específica para que el corte con la enzima de restricción ocurra, ya que, cuando ésta ha mutado y no ocurre tal reconocimiento, dificulta la diferenciación sexual (Bermúdez-Humarán *et al.* 2002).

VII.3 Estudios poblacionales.

Mediante la aplicación de los 2 sistemas de marcadores microsatélites p58 y m27, se han obtenido los resultados que se indican en la tabla IX. Se refieren a las poblaciones de perdices rojas estudiadas: población silvestre (27 individuos) y la población en cautividad (22 individuos).

Frecuencias alélicas

Población silvestre											
Locus p58						Locus m27					
Alelo	Nº	Het.	Hom.	Frec.	Frec-n.	Alelo	Nº	Het.	Hom.	Frec.	Frec-n.
104	2	2	0	0.0370	0.0374	338	1	1	0	0.0200	0.0202
110	4	4	0	0.0741	0.0762	340	25	13	6	0.5000	0.5092
112	3	3	0	0.0556	0.0566	342	1	1	0	0.0200	0.0202
114	12	12	0	0.2222	0.2516	344	8	8	0	0.1600	0.1752
116	21	17	2	0.3889	0.4491	346	2	2	0	0.0400	0.0408
118	6	6	0	0.1111	0.1168	352	4	4	0	0.0800	0.0834
120	4	4	0	0.0741	0.0762	354	2	2	0	0.0400	0.0408
122	1	1	0	0.0185	0.0185	356	3	3	0	0.0600	0.0618
124	1	1	0	0.0185	0.0185	358	1	1	0	0.0200	0.0202
						360	3	3	0	0.0600	0.0618

Tabla IX: Resultados obtenidos en la población silvestre para los dos loci estudiados: locus p58 y m27. Nº: nº de veces que está representado el alelo. Het: nº de heterocigotos. Hom: nº de homocigotos. Frec: frecuencia génica. Frec-n: frecuencia génica teniendo en cuenta los alelos nulos.

Como se indica en dicha tabla, para el **locus p58** se han obtenidos 9 alelos diferentes. La frecuencia génica más elevada corresponde al alelo 116 (0.3889), y la menor corresponde a los alelos 122 y 124 con un valor de 0.0185. A pesar de estas frecuencias génicas bajas, tal y como indican Joyce y Tavaré (1995), la consideración de alelo raro se hace dependiendo del tamaño de la población. Se considerarían alelos raros si aparecieran 2 veces o menos en una población de 100 individuos (0.01 de frecuencia en el total de alelos). Hay que destacar el hecho que de los 27 animales estudiados en esta población, tan solo 2 de ellos resultaron homocigóticos.

Para el **locus m27** se han obtenido 10 alelos diferentes. La frecuencia génica más elevada corresponde al alelo 340 (0.5000), frente a los alelos 338, 342, 358 que presentan las frecuencias más bajas. En este locus se han obtenido 6 individuos homocigotos, todos ellos para el alelo 340.

Para la población en cautividad los resultados se indican en la tabla X.

Población en cautividad											
Locus p58						Locus m27					
Alelo	Nº	Het.	Hom.	Frec.	Frec-n.	Alelo	Nº	Het.	Hom.	Frec.	Frec-n.
108	2	2	0	0.0455	0.0433	340	18	10	4	0.4286	0.4226
112	1	1	0	0.0227	0.0214	344	5	3	1	0.1190	0.1003
114	21	5	8	0.4773	0.3293	346	2	2	0	0.0476	0.0488
116	14	4	5	0.3182	0.2132	348	1	1	0	0.0238	0.0241
118	1	1	0	0.0227	0.0214	352	11	9	1	0.2619	0.2762
120	3	3	0	0.0682	0.0656	354	1	1	0	0.0238	0.0241
124	2	2	0	0.0455	0.0433	356	4	4	0	0.0952	0.1003

Tabla X: Resultados obtenidos en la población en cautividad para los dos loci estudiados: locus *p58* y *m27*. Nº: nº de veces que está representado el alelo. Het: nº de heterocigotos. Hom: nº de homocigotos. Frec: frecuencia génica. Frec-n: frecuencia génica teniendo en cuenta los alelos nulos.

Se obtuvieron resultados de 22 individuos para el **locus p58** en esta población, de los que 9 resultaron heterocigotos y 13 homocigotos. Como se observa en la tabla X, para el locus *p58* se han obtenido 7 alelos diferentes. La secuencia mayor corresponde al alelo 114 (0.4773), y la menor corresponde a los alelos 122 y 118, con una frecuencia de 0.0227.

En cuanto al **locus m27** se han obtenido resultados de 21 individuos. De ellos 15 fueron heterocigotos y 6 homocigotos. El número de alelos encontrados para esta población fue de 7, correspondiendo la mayor frecuencia génica al alelo 340 (0.4286). Este mismo alelo también aparece con la mayor frecuencia en la población silvestre. La menor frecuencia corresponde a los alelos 348 y 354, con una frecuencia de 0.0238.

Heterocigosidades y PIC.

Respecto a los valores de heterocigosidades y de PIC los resultados obtenidos se muestran en la tabla XI.

	Locus p58			Locus m27		
	He	Ho	PIC	He	Ho	PIC
Silvestre	0.7855	0.9259	0.7440	0.7208	0.7600	0.6834
Cautividad	0.6765	0.4091	0.6085	0.7387	0.7143	0.6820

Tabla XI: Resultados obtenidos para las heterocigosidades esperadas (He), observadas (Ho), y PIC en las dos poblaciones, y para los dos loci analizados.

Como se observa en la tabla, para la población **silvestre** la heterocigosidad observada ha resultado mayor que la esperada para los dos loci, lo que indica una importante variabilidad genética existente en la población. Teniendo en cuenta que el valor de PIC ha sido elevado en ambos loci, y de una manera especial para el locus p58 (0.7440), se revela como un marcador interesante para los estudios de variabilidad genética en perdices.

Con relación a la población en **cautividad** los resultados han sido diferentes a los de la población silvestre, puesto que, este caso, la heterocigosidad observada ha sido siempre menor a la esperada. Por otra parte, los valores de PIC para cada uno de los marcadores han revelado que el marcador con un mayor contenido de información polimórfica ha sido el microsatélite m27 (0.6820).

Estadísticos F y distancias génicas

Para el estudio del coeficiente de consanguinidad y de distancias genéticas entre las poblaciones, se han utilizado los F-estadísticos de Wright (Weir and Cockerham, 1984): **Fis**, **Fit**, **Fst**. Estos resultados se indican en la tabla XII.

	Fis	Fit	Fst
Silvestre	-0.12188 (-0.22853 - -0.06258)	0.04615	0.02399
Cautividad	0.21011 (0.02138 - 0.36380)	(-0.00373 -0.09410)	(0.01041 - 0.03704)

Tabla XII: Resultados obtenidos en la población silvestre y cautiva para los estadísticos de Wright.

Como se indica en esta tabla, en la población silvestre el valor obtenido para Fis es de -0.12188, lo que indica que no hay consanguinidad en esta población, puesto que como ya se indicó en el apartado de introducción, el estadístico **Fis** mide la correlación que existe entre los genes de los individuos de una población. El hecho de que sea un valor negativo, indicaría que no habría genes compartidos y, por tanto, no hay consanguinidad. La situación genética de esta población silvestre es de una amplia variabilidad y no habría individuos emparentados entre ellos. En cambio el valor de Fis es positivo para la población en cautividad, aunque bajo (0.21), lo que no es preocupante. Sí sería necesario un control genético cada cierto tiempo para controlar que este valor no aumente debido a la endogamia local.

Respecto a **Fit**, estima la correlación entre los genes en el total de individuos analizados, poniendo en evidencia la consanguinidad media estimada en el conjunto de las dos poblaciones (0.04615), que sigue siendo un valor muy bajo, aunque sea un valor positivo.

En cuanto a **Fst**, que estima la correlación que existe entre los genes de los individuos de una población respecto a la otra (silvestres-cautivas), midiendo la distancia genética entre ambas. A pesar de haberse obtenido un valor bajo (0.02399), al ser positivo, estaría indicando una diferencia genética entre ambas poblaciones, y no se estaría produciendo una fijación de alelos.

En definitiva, la población silvestre presenta una situación genética muy positiva, con un alto grado de heterocigosidad, una elevada variabilidad genética y ausencia de consanguinidad. En cambio, la población en cautividad presenta una población con una heterocigosidad baja, un número medio de alelos aceptables, y una presencia de consanguinidad que, aunque no muy elevada, está señalando la necesidad de un control genético para evitar los cruzamientos entre los individuos emparentados.

Hay que señalar que este aspecto es enormemente práctico en el manejo de una población en cautividad, ya que los cruzamientos se pueden dirigir

seleccionando para ello los individuos más alejados genéticamente, eliminando así la consanguinidad en una sola generación.

Según las **distancias genéticas de Nei** (Nei, 1973), los resultados que se acercan al 0 indican que los individuos son próximos genéticamente, hasta tal punto que, si es exactamente 0, los individuos son genéticamente idénticos para los loci estudiados. Al contrario, cuanto más se aleje el resultado de 0, mayores serán las distancias genéticas entre los individuos. En la población silvestre puede observarse como los individuos 5 y 21, 8 y 12, 16 y 18 son idénticos en dotación alélica (tabla XIII). Las distancias en negativo no se tienen en cuenta al ser un artefacto matemático. En la figura 21 puede verse la representación en una gráfica bidimensional y tridimensional de toda la población silvestre.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	0,000	0,693	0,288	0,693	0,490	0,896	0,693	0,490	0,693	0,288	1,386	0,490	0,288	0,288	0,490	0,490	0,490	1,386	1,386	0,490	1,386	0,693	0,693	0,693	1,040	1,040
2	0,000	0,000	0,288	0,693	0,896	1,386	0,490	0,693	0,693	1,386	0,490	1,386	0,693	0,693	0,896	0,490	0,896	1,386	0,693	0,896	0,693	1,386	0,693	0,693	-1,000	-1,000
3	0,000	0,000	0,000	0,693	0,490	0,896	0,693	0,490	0,288	1,386	0,490	0,693	0,288	0,203	0,490	0,203	0,203	0,693	0,693	0,490	0,693	0,693	0,693	1,386	1,040	1,040
4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,490	1,386	0,203	0,693	0,693	-1,000	0,203	1,386	0,288	0,693	0,490	0,896	0,490	1,386	-1,000	0,490	1,386	1,386	0,693	1,040	1,040	1,040
5	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,405	1,589	0,182	0,490	0,490	-1,000	0,182	1,589	0,490	0,405	0,405	0,405	1,589	1,589	0,000	0,896	1,589	0,490	0,896	1,242	1,242
6	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	-1,000	0,405	0,896	0,896	1,589	0,405	-1,000	0,896	0,896	1,099	1,099	1,589	-1,000	0,405	0,203	-1,000	0,896	0,896	1,242	-1,000
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,589	1,386	0,693	1,589	0,693	1,386	0,693	0,896	1,589	0,896	1,386	1,386	-1,000	0,288	0,288	0,693	-1,000	1,040	1,040
8	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,490	0,490	-1,000	0,000	0,203	0,490	0,405	0,405	0,405	0,405	1,589	-1,000	0,182	0,896	1,589	0,896	0,490	1,242	1,242
9	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,693	-1,000	0,490	1,386	0,693	0,693	0,203	0,896	0,203	0,693	1,386	0,490	0,693	1,386	1,386	1,040	1,040	0,347
10	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,693	0,490	0,693	0,288	0,288	0,490	0,490	0,490	1,386	1,386	0,490	1,386	0,693	1,386	1,040	1,040	1,040
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	1,386	-1,000	1,386	-1,000	1,589	-1,000	-1,000	1,386	-1,000	1,386	1,386	1,386	-1,000	1,040	-1,000
12	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,589	0,203	0,490	0,405	0,405	0,405	1,589	-1,000	0,182	0,896	1,589	0,896	0,490	1,242	1,242
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,693	0,693	0,896	1,589	0,896	0,693	1,386	1,589	-1,000	0,693	1,386	1,386	1,040	1,040
14	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,693	0,490	0,896	0,490	1,386	-1,000	0,490	1,386	1,386	0,288	1,040	1,040	1,040
15	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,490	0,490	0,490	1,386	0,693	0,490	1,386	0,288	1,386	1,040	1,040	1,040
16	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,099	0,000	0,490	1,589	0,405	0,896	0,896	1,589	1,589	0,549	0,549	0,549
17	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,099	-1,000	1,589	0,405	0,896	1,589	0,490	0,896	-1,000	-1,000	-1,000
18	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,490	1,589	0,405	0,896	0,896	1,589	1,589	0,549	0,549	0,549
19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,386	1,589	0,693	1,386	-1,000	1,040	1,040	1,040
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,589	1,386	0,693	0,693	-1,000	-1,000	-1,000
21	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,896	1,589	1,386	1,040	1,242	1,242
22	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	1,386	1,386	-1,000	-1,000
23	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,288	1,386	0,490	0,693	0,288	0,203	0,490	0,203	0,203	0,693	0,693	0,490	0,693	0,693	0,693	-1,000	1,040	1,040
24	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,386	-1,000	-1,000	-1,000
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	-1,000	-1,000
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,693	0,693
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla XIII: Distancias genéticas de Iso individuos de la población salvaje.

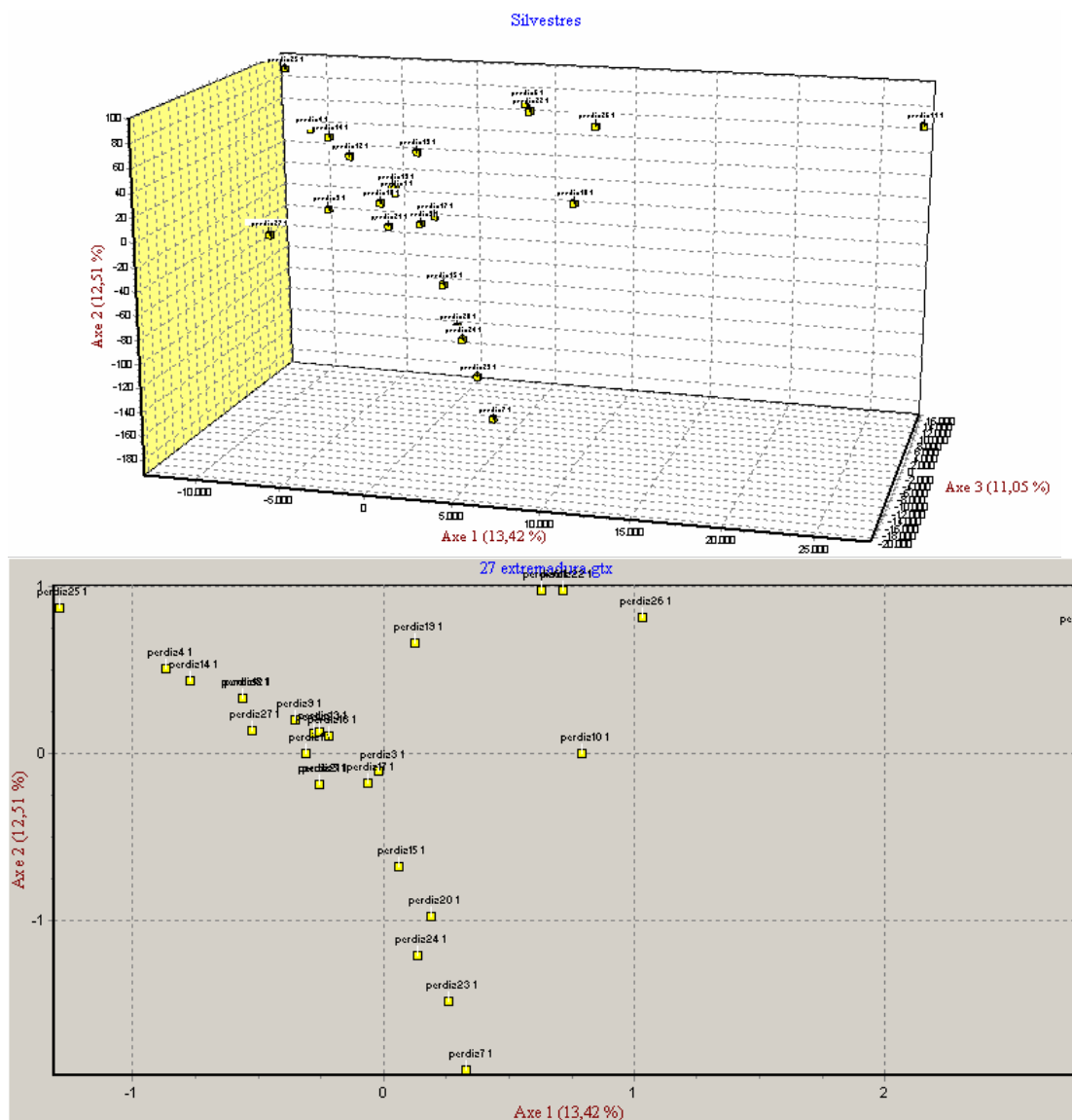


Figura 21: gráficas 3D y 2D mostrando las distancias génicas entre los individuos de la población silvestre.

Para la población en cautividad existen individuos para los que la distancia también es 0 (tabla XIV) y, por tanto, compartirán el contenido alélico para los loci p58 y m27. Estos son 1 y 10, y 13 con 16 y con 20. En la figura 22 se representan las distancias entre individuos en 2D y 3D. Gracias al conocimiento de los individuos que están genéticamente más alejados, se pueden planificar cruzamientos entre estos, para así solucionar el problema de la endogamia en esta población en tan solo una generación.

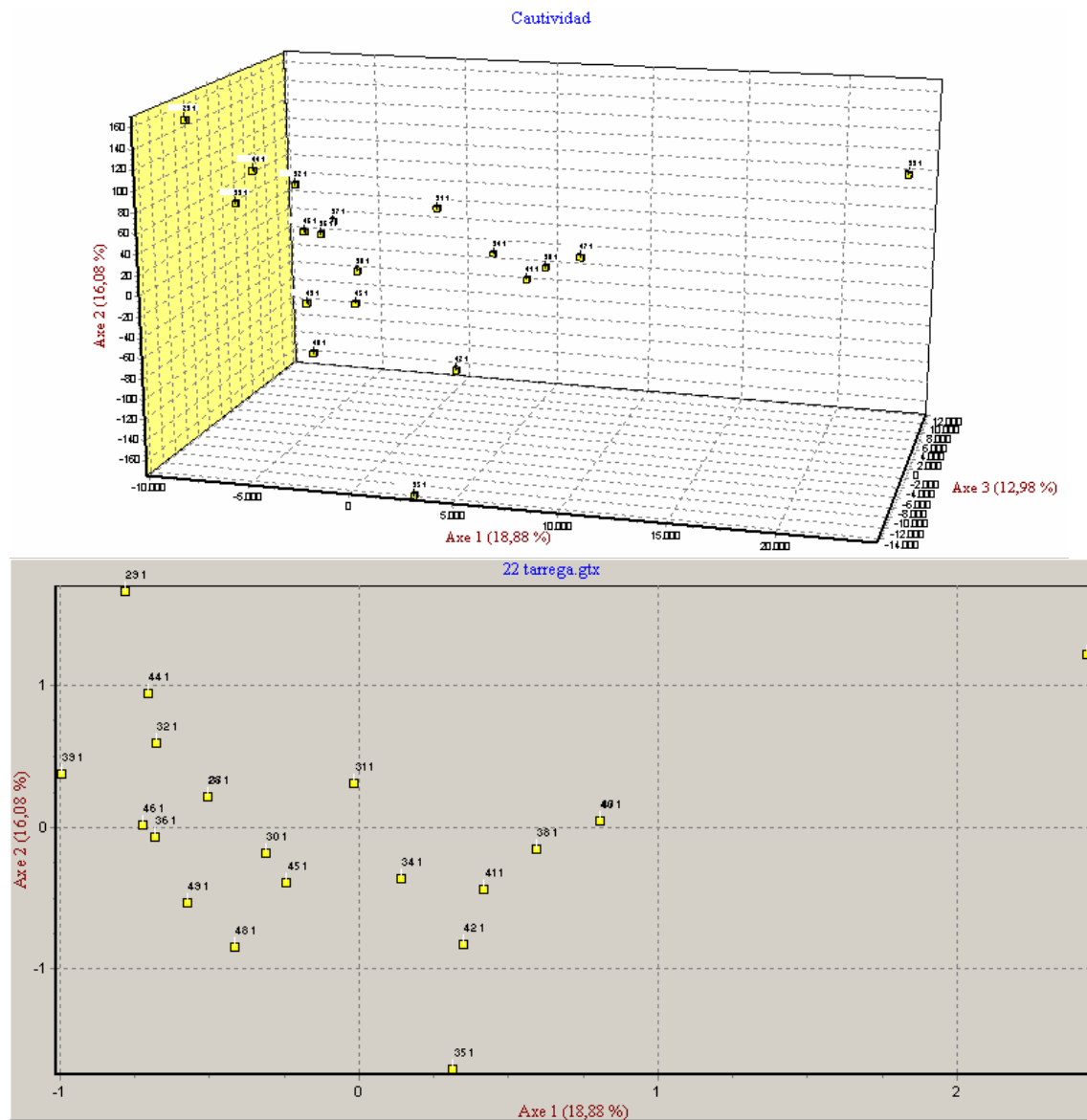


Figura 22: Gráficas 3D y 2D mostrando las distancias génicas entre los individuos de la población en cautividad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	0,000	0,490	0,203	0,405	0,182	1,589	1,589	-1,000	0,182	0,000	1,099	0,203	1,242	1,792	1,589	1,242	0,182	0,203	0,144	1,242	0,490	0,405
2	1,000	0,000	0,693	0,490	0,490	1,386	-1,000	-1,000	0,896	0,490	1,589	0,693	1,040	-1,000	1,386	1,040	0,203	0,693	1,040	1,040	1,386	0,896
3	1,000	0,000	0,000	0,490	0,490	1,386	1,386	-1,000	0,490	0,203	0,896	0,693	1,040	1,589	0,693	1,040	0,490	0,288	0,347	1,040	0,288	0,896
4	1,000	1,000	1,000	0,000	0,405	0,896	1,589	-1,000	1,099	0,405	1,099	0,896	0,549	-1,000	0,896	0,549	0,405	0,490	1,242	0,549	1,589	1,099
5	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,589	-1,000	-1,000	0,405	0,182	1,792	0,203	1,242	-1,000	1,589	1,242	0,182	0,490	0,549	1,242	0,896	0,405
6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,386	1,589	-1,000	1,589	0,490	-1,000	0,347	0,896	0,693	0,347	1,589	1,386	-1,000	0,347	-1,000	-1,000
7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,589	0,896	1,589	0,490	-1,000	1,040	0,203	1,386	1,040	-1,000	1,386	1,040	1,040	1,386	1,589
8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	-1,000	1,099	-1,000	1,242	1,099	0,490	1,242	-1,000	1,589	-1,000	1,242	0,896	1,099
9	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,182	1,792	0,203	-1,000	1,099	-1,000	-1,000	0,405	0,490	0,144	-1,000	0,490	0,182
10	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,099	0,203	1,242	1,792	1,589	1,242	0,182	0,203	0,144	1,242	0,490	0,405
11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	0,144	0,182	0,490	0,144	1,792	0,896	1,242	0,144	1,589	-1,000
12	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	0,203	0,693	0,347	-1,000	0,693	0,203
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,549	0,347	0,000	1,242	1,040	-1,000	0,000	-1,000	-1,000
14	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,896	0,549	-1,000	1,589	1,242	0,549	1,589	1,792
15	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,347	1,589	1,386	-1,000	0,347	0,693	1,589
16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,242	1,040	-1,000	0,000	-1,000	-1,000
17	0,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,490	0,549	1,242	0,896	0,405
18	1,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,347	1,040	0,693	0,896
19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	0,347	0,549
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-1,000	-1,000
21	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,490
22	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000

Tabla XIV: Distancias genéticas de Nei entre los individuos de la población en cautividad

En la figura 23 se muestran las dos poblaciones en una representación gráfica 2D y 3D. Puede observarse cómo la población salvaje contiene individuos más distribuidos en la gráfica, lo que se traduce en una mayor distancia genética entre ellos. Por el contrario, la distribución de los individuos en cautividad es más agrupada, señalando la posible endogamia que puede tener esta población.

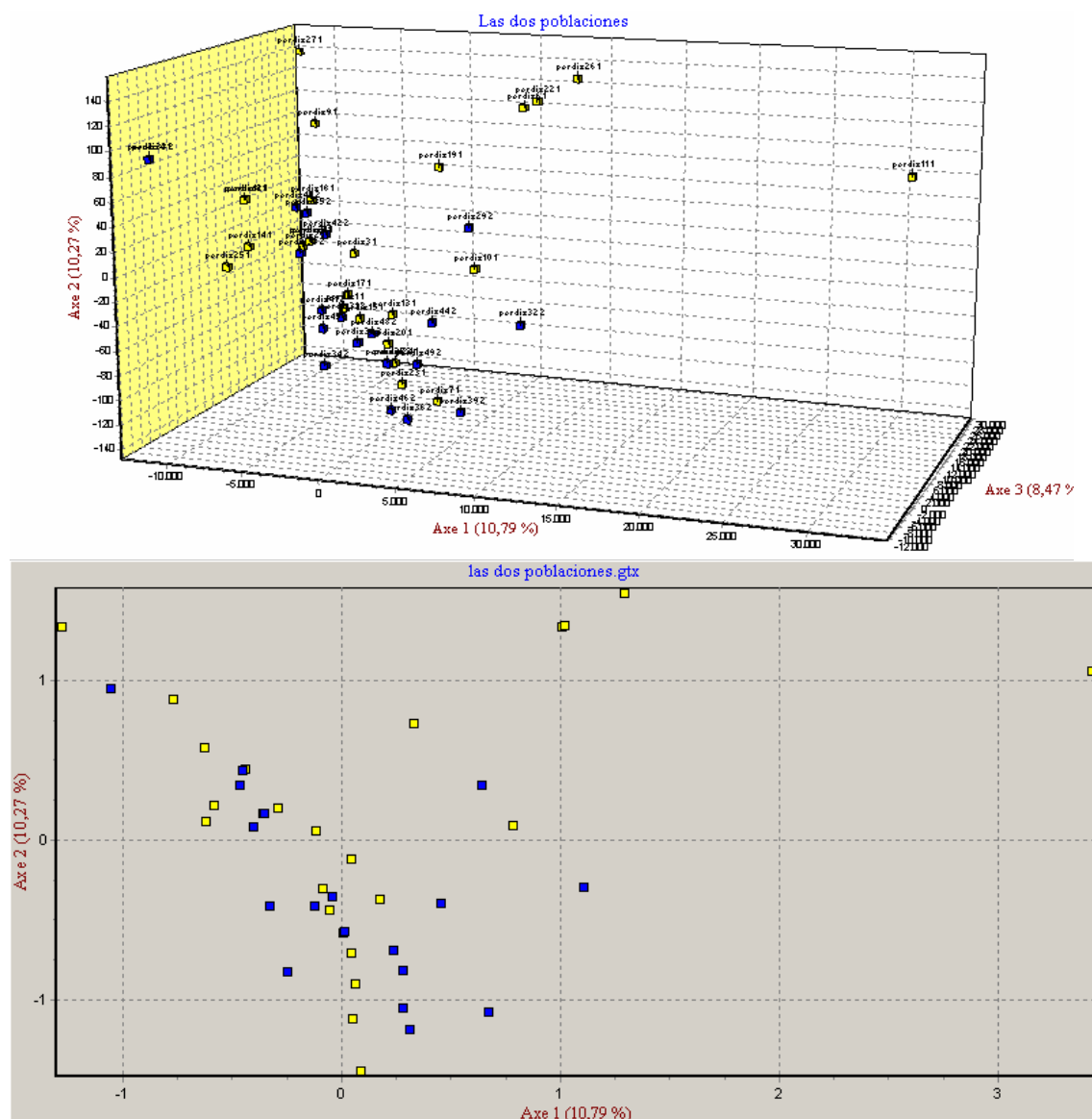


Figura 23: gráficas 3D y 2D mostrando las distancias génicas entre los individuos de las dos poblaciones. Amarillo (claro): población salvaje. Azul (oscuro): población en cautividad.

VI.4 Resultados de la genoteca.

Preparación del ADN para clonar.

Como se indica en el apartado de métodos, hace falta preparar el ADN para el paso de ligación. El objetivo es degradar el genoma para así obtener fragmentos compatibles en tamaño con el plásmido vector. Se probaron tres métodos con los resultados que se detallan a continuación:

A) Método de pipeteo continuado. Como se puede observar en la figura 24, a pesar de llegar a pipetear hasta 200 veces, con los sucesivos 200 pasos del ADN a través de la obertura de la pipeta, la degradación no parece significativa.

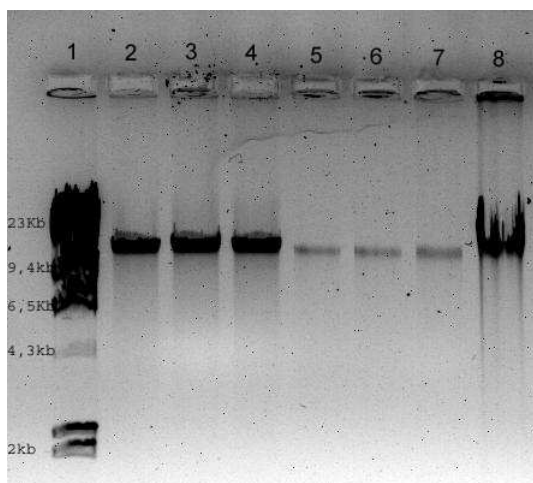


Figura 24: Comprobación de la degradación del ADN mediante pipeteo. Calle 1: marcador molecular II Roche®. Dilución 1:10; Calle 2: 200 pipeteos. Calle 3: 50 pipeteos. Calle 4: sin degradar. Dilución 1:1000; Calle 5: 200 pipeteos. Calle 6: 50 pipeteos. Calle 7: sin degradar. Calle 8: muestra sin diluir. Tamaño aproximado de las bandas, 10kb.

En la figura se observa cómo el método de pipeteo continuo no parece ejercer degradación alguna. Las tres primeras calles se ven con más intensidad, ya que la muestra está más concentrada que en las tres siguientes. El grado de dilución parece no influir tampoco en la degradación. En la calle que presenta la muestra directamente migrada de la extracción previa de ADN, se ve un pequeño gradiente a partir de 10kb. A pesar de que el kit de extracción indica que los fragmentos de ADN extraídos tendrán un tamaño comprendido entre 100pb-50000pb (con una media de 30kb), los obtenidos han resultado tener una media de 10-20kb. Esto podría ser debido a que el filtro de silica-gel empleado no deje pasar fragmentos pequeños (lo que contradice el manual del kit), o que la extracción haya resultado de tal calidad que no se encuentren fragmentos tan degradados.

B) Método de congelación/descongelación. La segunda vía empleada para conseguir una degradación mecánica fue mediante congelaciones seguidas de descongelaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 25. Con este método tampoco se han obtenido los resultados esperados, ya que no se observó degradación aparente, ni con 5 series de congelación-descongelación, ni con 10.

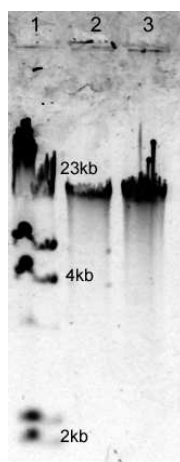


Figura 25: Degradación de la muestra mediante congelación-descongelación. Calle 1: marcador II Roche. Calle 2: tras 10 series de congelación/descongelación. Calle 3: tras 5 series de congelación-descongelación.

¿Son el número de veces congelado/descongelado suficientes? Se piensa que sí (Sambrook and Russell, 2001), ya que la degradación con una variación de temperatura de -20°C a 50°C debería ser suficientemente lesiva para la doble hebra de ADN, como para obtener algo de degradación del genoma. La no degradación podría deberse también a la composición del buffer de extracción (bajo en sales), que crearía un ambiente estabilizador de las hebras de ADN.

C) Restricción enzimática. Tras no obtener resultados aparentes mediante degradación mecánica, se optó por utilizar el método de digestiones parciales usando la enzima de restricción *AluI*. El problema que acarrea esta técnica es el sesgo que pueda introducir la enzima al cortar solo en unos puntos determinados por su sitio de reconocimiento.

La concentración óptima de enzima para obtener el máximo de fragmentos entre 0,5-4Kb resultó 0,016U (0,032U/ μg ADN), o también 0,008U (0,016U/ μg ADN) (fig.26).

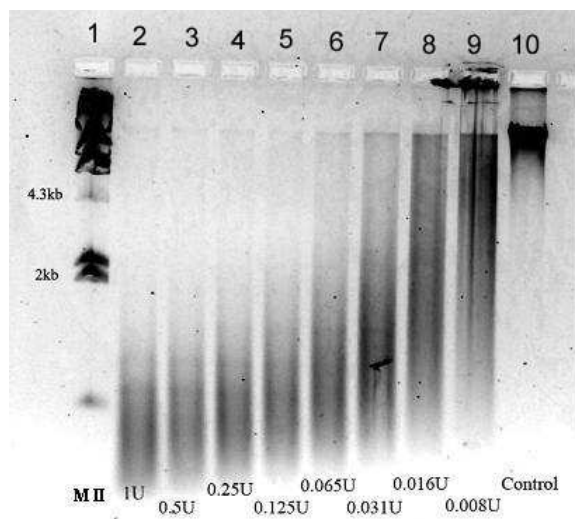


Figura 26: Restricciones parciales con AluI. Calle 1: marcador II de Roche®. Calles 2-9: digestión del ADN de menor a mayor concentración enzimática. Calle10: control (-) sin digerir.

Para extraer el ADN con los tamaños buscados a partir del gel se empleó el kit *Montage™ DNA Gel Extraction*. Tras tratar de extraerlo varias veces y comprobar con un aparato nanodrop que no se obtenía casi cantidad de ADN, ni era de calidad, se desechó la idea de obtenerlo de esta manera.

Se hizo, por tanto, una digestión a gran escala, usando la concentración de enzima calculado para obtener fragmentos de 0,5 a 4kb (fig.27). Todos estos fragmentos tienen la característica de ser solapantes, asegurando así que todas las secuencias puedan estar representadas.

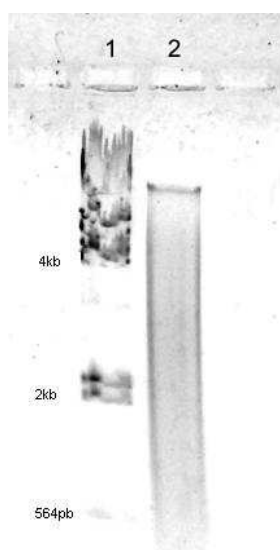


Figura 27: Comprobación de digestión a gran escala. Calle 1: marcador II de Roche®. Calle 2: Digestión a gran escala con una concentración enzimática de 0,032U/μg de ADN.

Este ADN así obtenido se utilizó directamente para las reacciones posteriores de ligación y transformación, ya que estas se pueden llevar a cabo con

la enzima empleada en la restricción *AluI* inactivada por calor (no influyendo en el proceso, Mülhardt and Beese, 2007).

Medida de la eficiencia de transformación.

Para comprobar que se habían obtenido colonias en la genoteca, se sembraron 50µl en una placa de Petri, obteniéndose 533 colonias. Conociendo que la cantidad de ADN utilizada inicialmente en la reacción de ligación es de 500 ng, se calculó la **eficiencia de transformación**:

$$\frac{533 \text{ colonias/placa}}{0,0025 \mu\text{g ADN/placa}} = 213.200 \text{ transformados/} \mu\text{gADN}$$

Y el **nº de colonias que forman la genoteca**:

$$\frac{533 \text{ colonias}}{50 \mu\text{l}} \times 1000 \mu\text{l} \times 10 \text{Vt del producto de reacción} = 106.600 \text{ colonias}$$

Comprobación:

$$\frac{213.200 \text{ Transformados}}{1 \mu\text{g ADN}} \times 0,5 \mu\text{g ADN} = 106.600 \text{ colonias transformadas}$$

Teniendo en cuenta que el tamaño medio de los insertos obtenidos ha sido aproximadamente 1,5kb, y que el genoma de perdiz es de $1,2 \cdot 10^9$ bp (Kasai *et al.* 2003), según la fórmula de Clarke y Carbon (1976), la estimación del número de colonias con una posibilidad del 99% de contener todo el genoma, es de 3.684.136 colonias; y al 95% es de 2.396.585 colonias. Estas cifras se sitúan muy por encima de las 106.600 colonias obtenidas. Esto significa que, difícilmente, estará representado en su totalidad el genoma de *Alectoris rufa*.

La probabilidad de tener representada la totalidad del genoma de perdiz roja en el conjunto de clones obtenidos es del 12%. Esta cifra representa una probabilidad muy baja de poseer el genoma representado en toda su extensión. Se barajan 4 hipótesis para explicar esta baja eficiencia:

- a. Puede deberse al empleo de una cepa de *E.Cloni 10G* quimiocompetente. El Kit recomienda el empleo de la misma cepa bacteriana, aunque con capacidad electrocompetente (2×10^{10} cfu/ μ g pUC19 ADN) para maximizar el número de transformantes.
- b. Los restos de la reacción de restricción, a pesar de que la bibliografía consultada (Mülhardt and Beese, 2007) indica que no ocurre ningún tipo de interferencia, podrían haber interaccionado en la reacción de ligación y en la posterior de transformación.
- c. La ligación podría no haberse desarrollado en las condiciones óptimas. A pesar de que el protocolo del kit indica que la ligación debe desarrollarse a temperatura ambiente de 30min a 2h, otras citas parecen orientarse (en el caso de fragmentos romos) a realizarla en ambientes a 4°C, y dejando actuar la enzima toda la noche (Mülhardt and Beese, 2007).
- d. Siempre en toda manipulación existen variables que no se pueden medir, como la habilidad del investigador, el material empleado, etc.

Controles

Controles de ligación:

- 1) Control positivo. Tras realizar el control positivo se obtuvo un crecimiento medio de 5 colonias por placa, siendo 1 colonia el número mínimo esperado para encontrar resultado positivo. De acuerdo con las tablas de equivalencia se estima que la genoteca posee un 99,9% de clones portadores del plásmido recombinante.
- 2) Control negativo. Todos los controles que se esperaba no dieran crecimiento se han obtenido negativos. Esto indica que la resistencia al antibiótico sólo es conferida si son portadoras del plásmido pSMART.
- 3) Control sin inserto (background del vector): No se obtuvo crecimiento ninguno, lo que indica que no existe autoligación del plásmido. Este dato es indicativo de que no se hace necesario el empleo de una búsqueda de las colonias con inserto, ya que todas lo tendrán.

- 4) Control de transformación. Al sembrar 2µl por placa se obtuvieron 3 colonias, cifra que estaría dentro de los límites de un buen rendimiento esperado tratándose de bacterias quimiocompetentes. Sin embargo, al sembrar 100µl/placa crecieron 65 colonias, lo que extrapolando a sembrar 2µl, daría 1,3 colonias, cifra que ya no sería suficiente para considerar una eficiencia de transformación teórica $\geq 1.10^8$ cfu/µl de plásmido, prevista por la casa comercial.

Amplificación directa desde colonia.

Tras realizar un gran número de amplificaciones por PCR de los insertos de las colonias transformadas, mediante el uso de la punta de pipeta para recoger las colonias, la técnica ha resultado ser igual o incluso más efectiva que amplificando el ADN tras una miniprep.

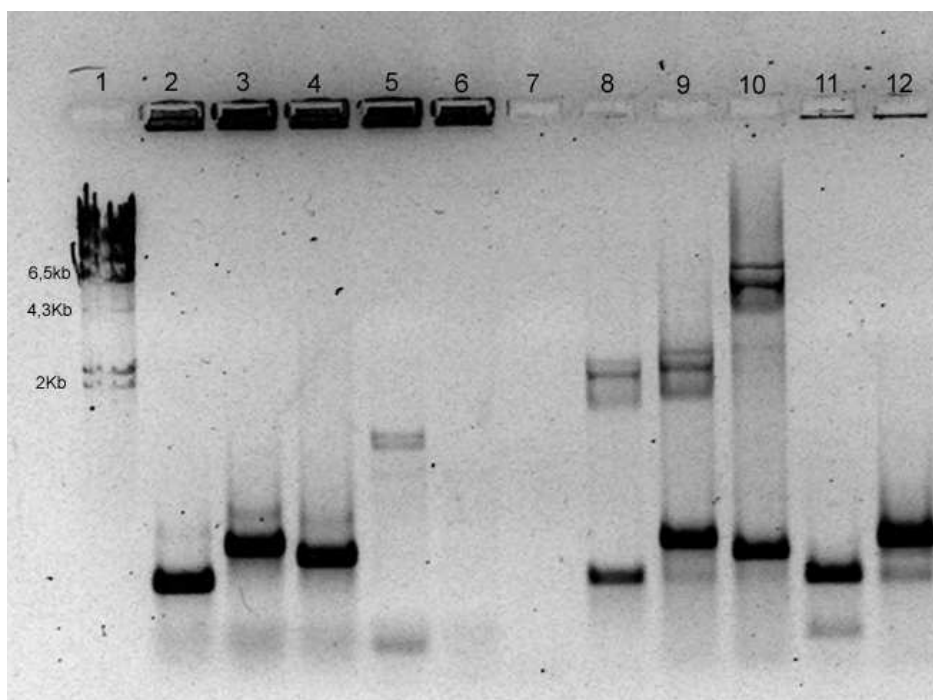


Figura 28: Calle 1: marcador II Roche®. Calles 2 y 3: amplificación con el método de la punta. Calles 5, 6 y 7: controles negativos. Calles 8,9 y 10: amplificación tras miniprep. Calles 11 y 12: amplificación a partir de medio LB líquido. Calle 13: Control.

En la figura 28 se observa cómo las calles 2 y 3 han amplificado el inserto perfectamente, usando directamente como fuente de ADN la colonia recogida con una punta. Los insertos de las mismas colonias amplificados tras una miniprep se muestran en las calles 8,9 y 10, pudiendo visualizarse una triple banda, que corresponde a las 3 formas que adopta el plásmido (mellado con una muesca en

una hebra, linearizado y superenrollado). Este resultado demuestra que las dos técnicas funcionan bien. De hecho, la elección de la técnica de amplificación directa con punta resulta más recomendable por su rapidez y su menor coste económico.

Las calles 11 y 12 son de nuevo las mismas colonias de las calles 2 y 3, y 8 y 9 respectivamente, pero procedentes de medio LB líquido. Esto demuestra que una amplificación de colonias crecidas en medio líquido funciona igual de bien que a partir de medio sólido.

Las calles 5 y 6 son controles negativos en los que se emplearon colonias sin transformar y, por tanto, sin inserto que amplificar. La calle 7 es un control negativo que sólo contiene el mix de reacción de PCR.

A la hora de secuenciar las muestras, el método con el que se han amplificado los insertos no parece influir en la calidad de lectura.

Secuenciación al azar.

En la figura 29 se muestra un ejemplo de los tamaños de insertos obtenidos amplificando el ADN de colonias recogidas al azar.

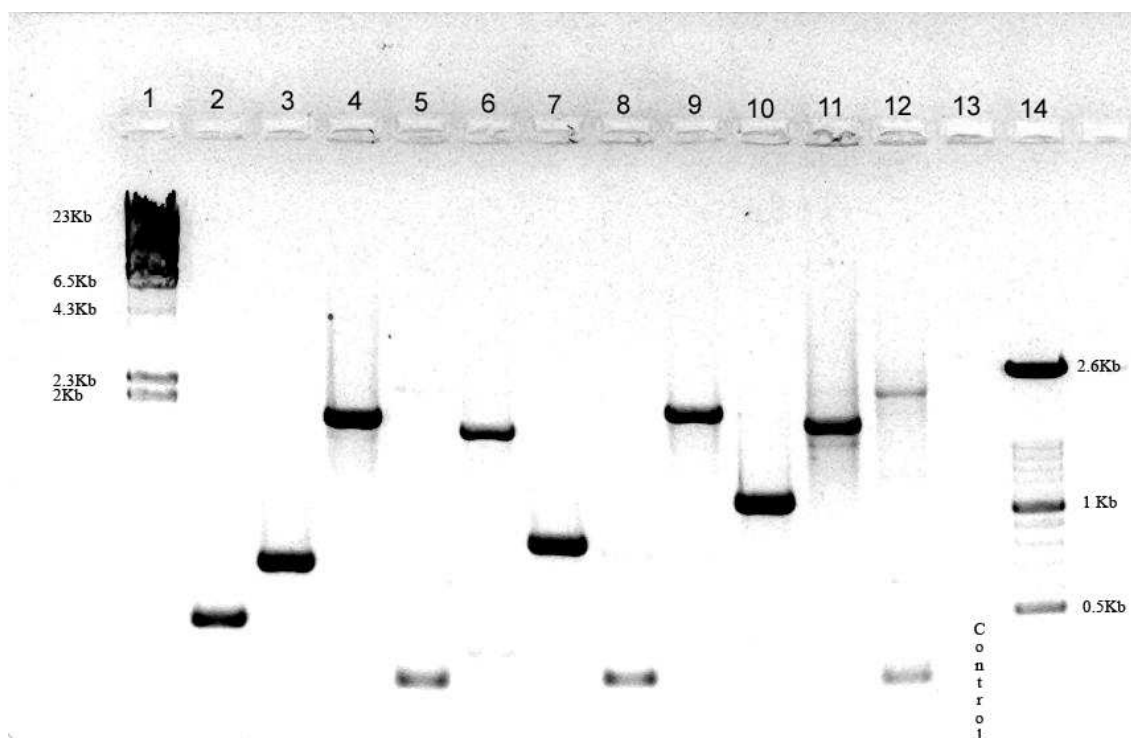


Figura 29: Imagen correspondiente a un gel de agarosa mostrando los distintos tamaños de inserto observados en 11 clones elegidos al azar. Calle 1: marcador molecular II Roche®. Calles 2-12: Insertos de las colonias amplificadas por PCR. Calle 13: Control (-). Solo lleva el mix de reacción sin el ADN. Calle 14: Marcador molecular XIV Roche®.

Se estudiaron secuencias de los insertos para 20 colonias tomadas al azar. Las colonias elegidas fueron aquellas que tras la amplificación del inserto por PCR tenían un tamaño apropiado para secuenciarla, entre 0,5 y 1,5 Kb. Las colonias seleccionadas para su estudio en el caso de la figura 29, fueron las de las calles 3, 6, 7, 10 y 11.

A pesar de que la bibliografía consultada advierte de la baja frecuencia de microsatélites en aves (Brandström and Ellegren, 2008; Primmer *et al.*, 1997), se obtuvieron 2 posibles microsatélites (Ansón *et al.* 2009b), cuya secuencia se muestra en la tabla XV.

A) Una repetición de 5pb (GTTTT)4x.

B) Una repetición de 2 bp (AG)8x.

Secuencia del clon con repeticiones (GTTTT)4x:
CGGAAGAGATCTGTTTGAAGATGACTTTGGTCATTTGTTTTGTTTTGTTTTCCATTTGCAAAG TTGCTAAATCTGTTAGTTAGAATGGGTAACATCAGCCTGAGATGTGTCAGCTTAGCCAAAAG TCAGTGTGTTGAATTCTGCCTTGTGTTTCTCTGACAAGGTGGCTGCATCAGAAATCCTA CCCTTG TGGTGAAGGCTTGGAGGTCAAAAATGCCTATTGTTAGGGCTTGCATGCACCTAGAGT GT
Secuencia del clon con repeticiones (AG)8x:
ACAGTGCTGAGATAGGTGTGCGTTCAATGTAGGAACCTGACCAAATAAAGAGAGAGAGAGA GAGCAGGGAATGACTCAATAGTACCCAGTGATAAGAGAGGAAATCTAATAGACTTAAATATC CTTAGAAGAGAGCTGTCAGATTTGATGACAGCCTCTTTCACGGCACTGATAGAGTAGAAGAT GCTTCAGTGAGATACCAAGTACAGCTGCTGGTCCAC

Tabla XV: Secuencias de los microsatélites encontrados en la secuenciación al azar de los insertos de las colonias. Resaltados en gris los cebadores usados, en subrayado el motivo repetido, y en negrita, la secuencia con similitud al genoma de pollo.

Como puede comprobarse, el núcleo de repetición es puro o perfecto, ya que son repeticiones en tandem el primero de 2 y el segundo de 4 nucleótidos. La longitud de las secuencias amplificadas es de aproximadamente 265pb para (GTTTT)*n*, y de 222pb para (AG)*n*.

El siguiente paso consistió en comprobar en otros individuos del género *Alectoris* que, efectivamente, se trataba de microsatélites con variabilidad intra e interespecífica. La comprobación se hizo con muestras del banco de ADN del Laboratorio, en el que existen perdices de distintos géneros y partes del mundo,

fruto de décadas de investigación en el campo de las aves. Se analizaron individuos de *Alectoris rufa* (19), *chukar* (6), *graeca* (6) y *barbara* (3), con un total de 34 animales estudiados, de 12 poblaciones diferentes (tabla XVI).

Nº individuos + especie	Procedencia	Hábitat	Alelos GTTTT	Alelos AG
3 <i>Alectoris rufa</i>	Granja Cataluña	Cautividad	(GTTTT)4x	(AG)8x
3 <i>Alectoris rufa</i>	Castilla la Mancha	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)8x
3 <i>Alectoris rufa</i>	Burgos	Cautividad	(GTTTT)4x	(AG)8x
1 <i>Alectoris rufa</i>	Jaén	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)8x
2 <i>Alectoris rufa</i>	Mallorca	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)8x
3 <i>Alectoris rufa</i>	Cerdeña	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)8x
3 <i>Alectoris chukar</i>	Chipre	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)7x
4 <i>Alectoris rufa</i>	Zaragoza	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)8x
3 <i>Alectoris graeca</i>	Grecia	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)8x
3 <i>Alectoris barbara</i>	Cerdeña	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)7x
3 <i>Alectoris chukar</i>	Grecia	Cautividad	(GTTTT)4x	(AG)6x, 7x, 8x.
3 <i>Alectoris graeca</i>	Grecia (kavala)	Silvestre	(GTTTT)4x	(AG)7x, 8x.

Tabla XVI: Se muestran las distintas especies y orígenes de las perdices utilizadas para comprobar la validez de los microsatélites obtenidos en el análisis de colonias al azar.

Tras el estudio en distintos animales se comprobó que el posible microsatélite (GTTTT)_n no presentaba variabilidad en ninguno de los casos. Comparando la secuencia encontrada con el genoma de pollo en BLAST, se obtiene una similitud de 91% con el gen de la prolactina, situándose en una zona exónica codificante. Por tanto, es de suponer que no existan variantes alélicas para esta repetición, al estar sometida a una presión evolutiva.

En el caso de (AG)_n se observaron repeticiones x6, x7 y x8 veces, por lo que se constata la existencia de diferentes alelos, como se indica en la tabla XVI. La particularidad de este microsatélite reside en que todas las poblaciones de *Alectoris rufa* poseen (AG) repetido 8 veces, por lo que sería una característica que serviría para excluir posibles híbridos con un número de repeticiones distinta. Al comparar esta secuencia en BLAST respecto al genoma de *Gallus gallus*, se obtiene que a partir de la base nº69 (resaltado en negrita en la tabla XV) justo al acabarse el microsatélite, se produce un 92% de identidad de la secuencia respecto a una proteína similar a la fosfatasa 2C epsilon. Esto nos indica que el microsatélite estaría situado en un intrón y, por lo tanto, no tendría efectos en la función de la proteína.

Tal y como indica la bibliografía (Primmer *et al.* 1997), el microsatélite (AG)_n corresponde a uno de los mayoritarios en aves. Si tenemos en cuenta que el número de repeticiones está directamente relacionado con las posibles variantes

alélicas que existan (Brandström and Ellegren, 2008), el microsatélite encontrado tendrá aproximadamente un 40% de posibilidades de ser polimórfico.

Búsqueda de microsatélites mediante metodología PCR.

Se analizaron un total de 20 colonias. Aquellas para las que se obtuvieron amplificaciones acordes con lo que debería obtenerse en el caso de contener un posible microsatélite (fig.30), se secuenciaron.

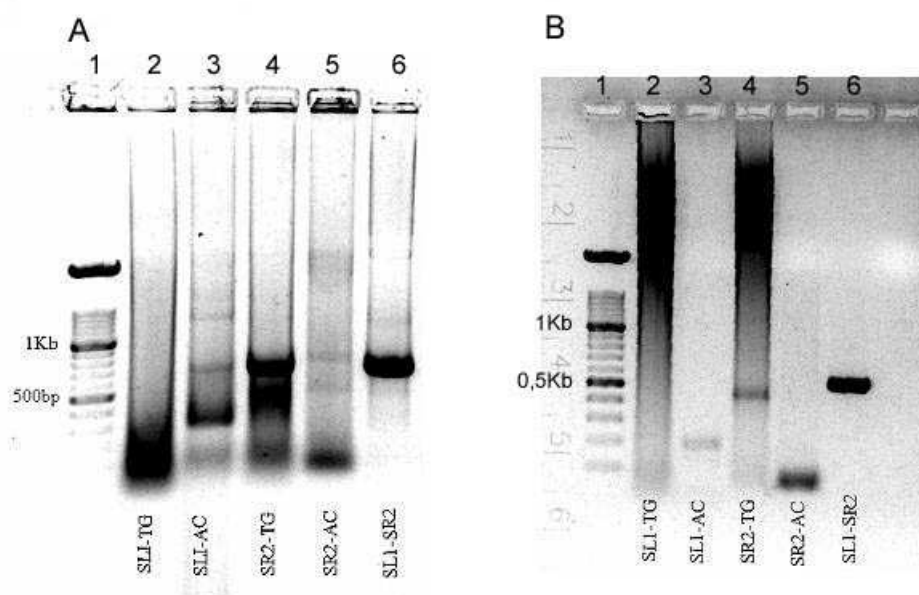


Figura 30: Se muestran dos geles (A y B) para dos colonias positivas diferentes. Calles 1: marcador XIV Roche® Calles 2-6: combinaciones de cebadores.

Puede observarse cómo las bandas complementarias $SL1/(AC)_{12}$ y $SR2/(TG)_{12}$, al ser sumadas, dan el mismo tamaño que el inserto del plásmido para esa colonia ($SL1-SL2$) usado como control (+). Con un resultado así, nos encontraríamos ante un posible microsatélite. Se obtuvieron 6 colonias que por su migración podrían contener microsatélites. Se secuenció su inserto y todas ellas dieron como resultado falsos positivos. Esto se debió a que la secuencia donde se hibrida el plásmido $(AC)_{12}$ o $(TG)_{12}$ posee una alta concentración de bases similares, tal y como se puede ver en la figura 31.

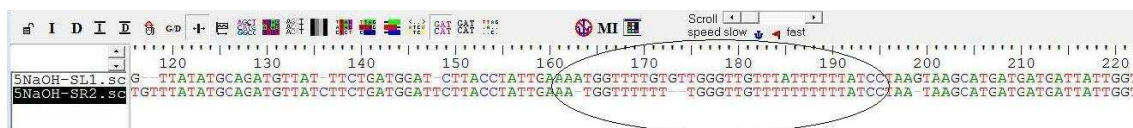


Figura 31: Secuencia de una de las colonias analizadas.

Estos falsos positivos se compararon en la bases de datos con especies emparentadas a *Alectoris rufa*, resultando ubicarse en secuencias codificantes (fig.32).

```
>ref|NW_001471435.1|Ggall WGA183 2 ■ Gallus gallus chromosome 11 genomic contig, ref
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=9575615

Features in this part of subject sequence:
  WW domain-containing oxidoreductase

Score = 817 bits (442), Expect = 0.0
Identities = 468/481 (98%), Gaps = 0/481 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1          CTCATCCTGTGTTTAAATGAAACAGAAATGAACATCATATTGCCCTTGTTTTCTGTCAGAT 60
                |||
Sbjct 6620604    CTCATCCTGTGTTTAAATGAAACAGAAATGAACATCATATTGCCCTTGTTTTCTGTCAGAT 6620663

Query 61         TTTCCAGGTCTCCATGAGGCTTATTAATCTTTGGGTGTAATGGAATGTGTTGCTACGT 120
                |||
Sbjct 6620664    TTTCCAGGTCTCCATGAGGCTTATTAATCTTTGGGTGTAATGGAATGTGTTGCTATGT 6620723

Query 121        TACAAACTACAGCAGCCTTTGCGCTCAAAAGATTGAAGGCATTATTAGTCTTTGTCTTAT 180
                |||
Sbjct 6620724    TACAAACTACAGCAGCCTTTGCGCTCAAAAGATTGAAGGCATTATTAGTCTTTGTCTTAT 6620783

Query 181        TTACATACTGTGTTTGGGTGCGTGCTACCAGAGCTGCACCTAGAGCACAGTGGAGAGTGC 240
                |||
Sbjct 6620784    TTACATACTGTGTTTGGGTGCGTGCTACCAGAGCTGCACCTAGAGCACAGTGGAGAGTGC 6620843

Query 241        ACCTAGAAAATGTTTGTGGATTCTGAAGTGAGTTCTAATGCGTGGGACCAGATGGCTGC 300
                |||
Sbjct 6620844    AGCTAGAAAAGTGTGTTGTGGATTCTGAAGTGAGTTCTAATGCGTGGGACCAGATGGCTGC 6620903

Query 301        ATGGTAGGTCACTGCAGCCTGCAGTAACCATCAGAGATTGGAGAACTGACGGCACACGG 360
                |||
Sbjct 6620904    ATGGTAGGTCACTGCAGCCTGCAGTAACCATCAGAGATTGGAGAACTGACGGCACACGG 6620963

Query 361        TCCAGGCTTTGGAAATTTTCTGTTGGGAAAAATGCTAAATAGGAGGAGTTGCTTGATGAC 420
                |||
Sbjct 6620964    TCCAGGCTTTGGAAATTTTCTGTTGGGAAAAATGCTAAATAGGAGGAGTTGCTTGATGAC 6621023

Query 421        CTTATTTTAGTGCACCCCAAAATGTGTGATTCTGCATTTCTTAACTCTTGAAATTAGCT 480
                |||
Sbjct 6621024    CTTATTTTAAATGCACCCCAAAATGTGTGATTCTGCATTTCTTAACTCTTGAAATTAGCT 6621083

Query 481        C 481
                |
Sbjct 6621084    C 6621084
```

Figura 32: Comparativa de las secuencias obtenidas con el genoma de pollo. Se obtiene una similitud del 98% con una proteína oxidoreductasa. La zona señalada puede ser una región en la que el cebador haya hibridado incorrectamente.

Algunos de los posibles fallos para la aplicación de este método son (fig.33):

- 1) Que el cebador se una a lo largo de la secuencia en diferentes posiciones, cuando se trate de un microsatélite largo. Esto se visualizará como un

- gradiente difuminado, en el que las bandas se diferencian de dos en dos pares de bases (por ser el microsatélite la repetición de un dímero).
- 2) También en el caso de haber un microsatélite largo; si el cebador se une dejando su extremo 3' libre se dará la amplificación del fragmento, pero, en cambio, si el extremo 3' se queda suelto sin hibridar con su complementario, la amplificación no tendrá lugar. De esta manera se produce un falso negativo, existiendo microsatélite, pero no visualizándose.
 - 3) Si el microsatélite está muy pegado a uno de los extremos del inserto, el fragmento amplificado será de muy pocas pares de bases y no se apreciará en un gel de agarosa. Se obtendrá otro falso negativo.

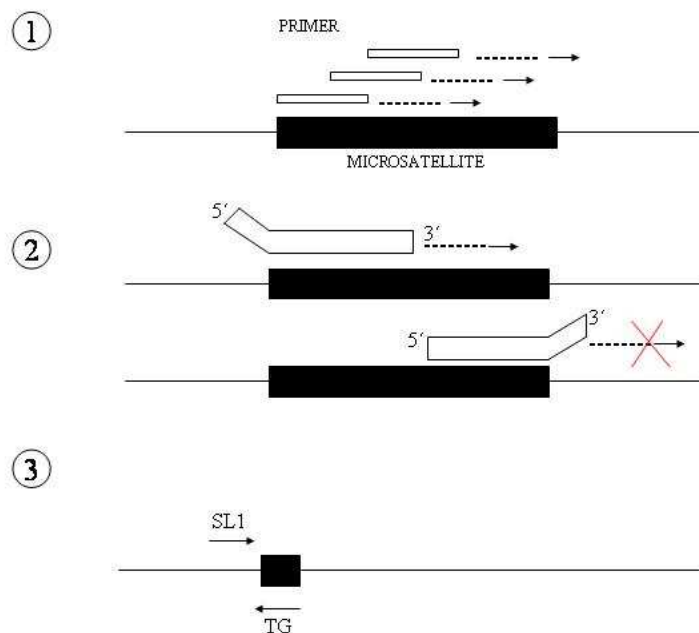


Figura 33: Esquema de los posibles errores que se dan al usar cebadores con motivos repetidos.

Otro problema detectado al emplear esta metodología es que, al emplear como fuente de ADN tanto stocks preparados con NaOH como preparados a partir de una reacción PCR (ver apartado “preparación de un stock de ADN” de *Material y Métodos*), la cantidad de ADN puede ser tal que se visualice siempre la banda del inserto en todas las combinaciones de cebadores (fig.34). Se ha llegado a detectar señal en el gel a partir de ADN procedente de una PCR anterior, aún habiendo sido diluido 1:1000. Esto se soluciona añadiendo el ADN a los mix de PCR lo suficientemente disuelto para que no emita señal por sí. Hay que tener en cuenta

que la cantidad mínima de ADN que puede detectarse mediante fotografía de los geles teñidos con bromuro de etidio es de aproximadamente 2ng con una banda de 0,5cm de ancho (Sambrook *et al.* 1989).

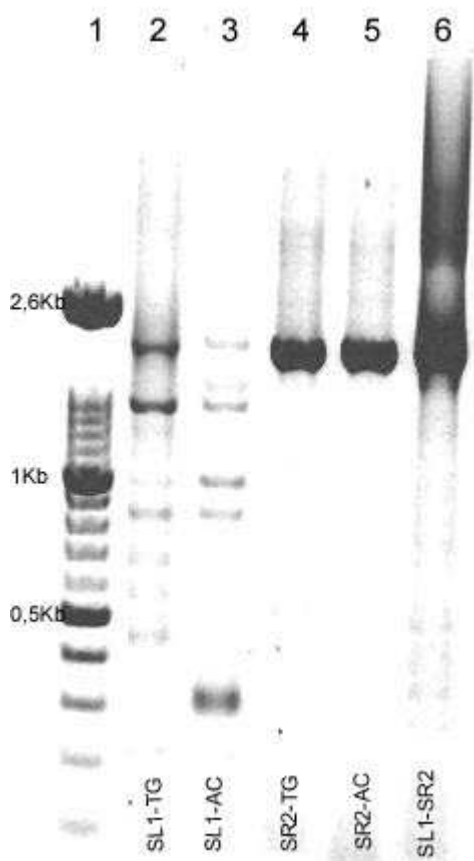


Figura 34: imagen en la que se muestra se muestra cómo en todas las calles aparece la banda de 2kb del inserto. Esta procede del ADN empleado en el mix de reacción, que no es necesario que amplifique para que se visualice por su concentración.

Aunque teóricamente el diseño parece idóneo para la búsqueda de un tipo de microsatélite, en la práctica ha resultado no ser el más adecuado. Primero, porque va demasiado dirigida hacia un tipo de microsatélite marcado por la elección de los cebadores. Segundo, porque resulta muy laborioso, pues se trata de 5 reacciones independientes y, a veces, puede resultar difícil encontrar unas condiciones genéricas para todas ellas. Y tercero, se ha comprobado que es relativamente fácil obtener falsos positivos si la optimización no es buena. Como aspecto positivo, se trata de una técnica que, aplicando bien el método de la PCR, puede ser recomendable para laboratorios que no posean grandes recursos materiales y económicos.

Hibridación.

Al comprobar si existía hibridación entre los cebadores diseñados y el genoma de *E.Coli*, aparecieron repeticiones en tandem (AC)₅ y (AG)₅. Como las sondas que hemos preparado son 13 repeticiones en tandem (26bp), aunque la temperatura de anillamiento no sea muy restrictiva (45°C), en principio no tienen por qué producir falsos positivos. El que pudieran ocurrir estas hibridaciones, se comprobó con la observación del *control C*. De esta manera, de visualizarse fluorescencia, indicaría que se ha producido hibridación con el genoma bacteriano y, por lo tanto, no sería válido el experimento. Como no se observó fluorescencia, se pudo dar validez al experimento.

La aparición de artefactos en la membrana no fue muy numerosa. Algunos puntos aislados emitían una especial intensidad lumínica, muy significativa para considerarlos como artefactos (fig.35).

Se encontraron 7 posibles colonias portadoras de microsatélites (como se comprobará posteriormente no todas ellas son microsatélites verdaderos) de tipo (AC)_n caracterizadas por su emisión de luz roja (fig.35), en un total de 654 colonias analizadas. Esto haría un porcentaje de 1,07% de colonias en la genoteca con repeticiones AC.

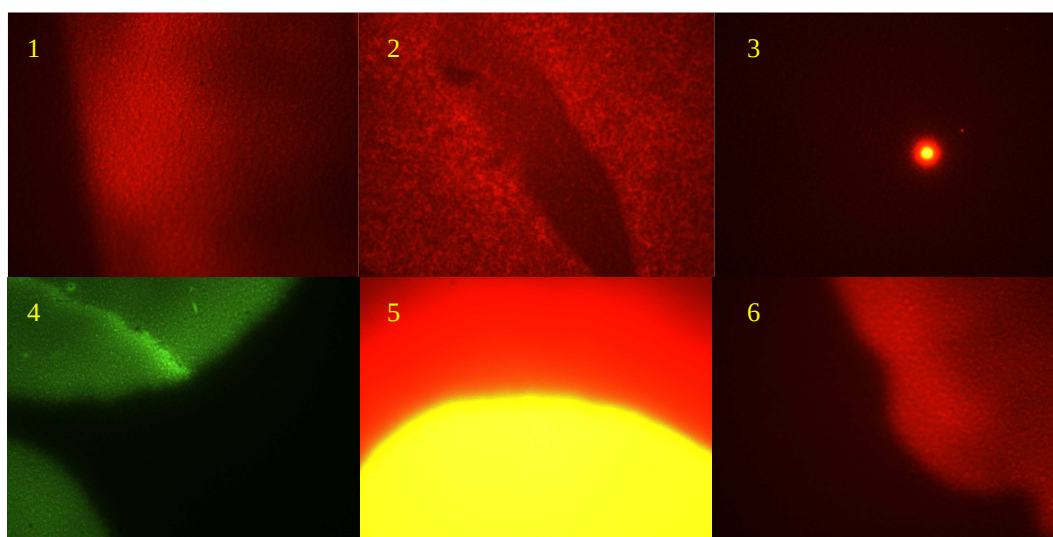


Figura 35: Fotografías 1 y 2) Imágenes tomadas desde el microscopio de fluorescencia para dos colonias positivas (AC)_n con filtro específico para emisión en rojo. 3) Artefacto tipo producido para sonda Texas Red. 4) Control sonda Fluoresceína. 5) Control sonda TexasRed. 6) Control (+). Las imágenes se tomaron haciendo uso de los filtros adecuados para resaltar cada color en particular.

Al no encontrar hibridaciones con (AG)₁₃, podría deberse a la no existencia de repeticiones de este tipo, o que su longitud es demasiado pequeña para hibridar con la sonda para las colonias estudiadas. Se repitieron todos los pasos de hibridación partiendo de las mismas membranas, aprovechando así que ya se tenían las colonias fijadas. La única variación fue que se utilizó una T^a distinta en los pasos de prehibridación y de hibridación propiamente dicha (33°C en lugar de 45°C). Se usó como control positivo una nueva membrana con material de PCR de *A.rufa* que contenía el microsatélite (AG)_{8x} obtenido en el punto “Secuenciación al azar”. No se consiguió hibridación con este control, ni tampoco se obtuvieron colonias marcadas de verde en membrana alguna. Las posibles explicaciones a que no haya funcionado la hibridación con esta sonda son:

1.- Que 33°C siga siendo una temperatura restrictiva para la hibridación. La sonda (AG)₁₃ tiene una T_m=60,4°C estimada por la casa comercial. Si a esto le aplicamos que en este tipo de experimentos suele usarse 10-15°C por debajo de T_m, siendo máxima la hibridación a 25°C menor a la T_m (Mülhardt and Beese, 2007), la temperatura óptima sería de 35°C. Como nosotros la hemos puesto a 33°C, esta variable no debería plantear problemas.

2.- El detalle que sí podría ser relevante es el haber utilizado unas membranas que ya habían sido expuestas a los procesos de hibridación. El ADN de las colonias fijado en la membrana podría estar degradado. No obstante, el control empleado de material PCR con la secuencia (AG)_{8x} tampoco ha dado señal verde alguna, y la membrana en la que trabajó era nueva.

3.- Que la repetición (AG)_{8x} es corta para hibridar con la sonda (Kricka, 1992). Esta idea es muy remota, ya que estamos hablando de hibridar una sonda de 26 bases con un ADN de 16 bases fijo en la membrana, y se considera suficiente la longitud para que se produzca señal.

4.- Que el flourocromo sea muy grande e interfiera en la unión (Kricka, 1992).

Para obtener microsatélites del tipo (AG) la solución que se plantea sería la repetición de todo el proceso desde el principio, usando membranas nuevas y colonias distintas a las anteriores (es posible que no se haya obtenido ninguna colonia verde porque efectivamente no exista ninguna entre las colonias

exploradas). La temperatura de hibridación habría que reducirla hasta 25°C, y para conservar la especificidad se usaría 50% v/v de formamida en la solución de hibridación. Empleando aún más cebadores que la cantidad usada, ya en exceso, también podría ayudar a que se produjera la hibridación.

Se secuenciaron las 7 colonias obtenidas con fluorescencia roja, obteniéndose:

- 2 portadoras de microsatélite (AC)n.
- Una resultó ser la misma que una de las que contenían microsatélite, lo que significa que estaba duplicada.
- Una no se pudo secuenciar tras diversos intentos.
- 3 falsos positivos, con secuencias ricas en A y C.

De esta manera, si reconsideramos los resultados al haber obtenido falsos positivos (y sin tener en cuenta posibles falsos negativos), el porcentaje de microsatélites de tipo (AC)n fue del 0,3%, y no del 1,07%.

La secuencia de las colonias portadoras de los insertos con microsatélite fueron las siguientes (tabla XVII):

Microsatélite de la colonia nº14.
TTATTATTCCATTCTGTTTCTGCCATTTACCTCCTCAACTGTAATACGTCCATGCAAACAGC ATGGTGTGCCTGAAATATCAAGGAGAAACCAAACCTGCTTTCTCTCTTGGAAAGACGGGTGGG ATTCTTAATGAGCCAACACACACACACACACACACACACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAACTA ACCAGATAAAATTACACAAGATAANCACTAGAGACTATTTTATCCTCTTTCTTTTCCCAAAC GCTTTGCCTGGCTCTCCAGCCCCATCACTGCCACTAACTGAAGTAGAAAGGTATTTAGAG AAAAAGTTGCCAGATCATTGGCCAACATCCCCTTACACTAATGCAAATTTAACGCTTCTTCC ACA
Microsatélite de la colonia nº15
ATTCGTCTCTAGTTGGCTTCTTTATAATTTTCACTAAGACTTAGGAATCTGATCTCATTAGAA GCCACAATAATTTAATGTTTCTCAATTATTTTTTCATTAAATTATATGTATGTGTATATATGTG CATATATATATATACACACATACACACACACACACACACATATATATATATATATATATA TAAAAATACATGTATAATATATATGGAATGGTTACCTGGAGGGAGAGCAGGTCTGTGAGGTG GGAGTCCTCCAAGCACTCACTAGTTTCACTAACAGATGGTAAAGGACGAATTCTCTAGTAT ATCGCTCAATACTGACCATTAAATCATACCT

Tabla XVII: Secuencias de los microsatélites encontrados en la secuenciación al azar de los insertos de las colonias. Resaltados en gris los cebadores usados, subrayado el motivo repetido, y en negrita la parte con homología a una secuencia proteica de *Gallus gallus* publicada en BLAST.

Para comprobar que realmente se trata de microsatélites, el siguiente paso que se siguió fue la obtención de los cebadores correspondientes para amplificar por PCR la zona de las repeticiones en otros individuos de la especie *A. rufa*. Su secuencia se encuentra subrayada de azul en la tabla XVII. Se obtuvieron bandas

con un tamaño de producto de aproximadamente 250pb para el ms. col.14 y de aproximadamente 216pb para el ms. col.15.

Tras comprobarlo en 22 individuos procedentes de distintos lugares de España y de Europa, los resultados a nivel de polimorfismo que se obtuvieron fueron los siguientes:

A) Para el microsatélite col.14, no se han obtenido buenos resultados en la secuenciación, por lo que todavía no está comprobado su polimorfismo. Esto puede ser debido a la temperaturas de fusión (melting) de cada cebador (resaltados en gris en la tabla XVII), pues según la casa comercial *Sigma* indica 64,1°C para TACGT... y 63,9°C para el reverso TTCAG...(AAGTC... en misma tabla), mientras que calculándolo mediante la fórmula de Wallace, 1979: $T_m = 2^{\circ}\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C}(\text{G}+\text{C})$ da lugar a unas T_m de 58° C en el primer caso y de 64°C en el segundo. Por lo tanto, existe una diferencia de 6°C entre lo calculado por la casa comercial y lo obtenido según la fórmula de Wallace.

Según la bibliografía consultada, al tratarse de una repetición tandem de (AC)₁₃, tiene según Brandström y Ellegren 2008, una posibilidad de más del 50% de ser polimórfico. Habría que optimizar la PCR para conseguir secuencias de calidad que pudieran ser secuenciadas correctamente.

Comparando la secuencia en BLAST con el genoma de pollo (fig. 36), se obtiene semejanza con la *protenina eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6*, situada en el cromosoma 2.

```
>ref|NW_001471654.1|Gga2 WGA81 2  Gallus gallus chromosome 2 genomic contig, reference assembly
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=14158016

Features flanking this part of subject sequence:
68564 bp at 5' side: hypothetical protein
9408 bp at 3' side: eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa

Score = 211 bits (114), Expect = 7e-53
Identities = 135/144 (94%), Gaps = 5/144 (3%)
Strand=Plus/Plus

Query 1          TTATTATTCATTCTGTTTCTGCCATTACCTCCTCAACTGTAATACGTCATGCAAAC 60
Sbjct 3170957    TTATTATTCATTCTGTTTCTGCCATTAACTCCTCAACTGTAATATTTCCATGCAAAC 3171016

Query 61         AGCATGGTGTGCCTG-AA-A---TATCAAGGAGAAACCAAAGTCTTTCTCTCTTGAAG 115
Sbjct 3171017    AGCATGGTGTGCCTGAAATATCTTATCAAGGAGAAACCAAAGTCTTTCTCTCTTGAAG 3171076

Query 116        ACGGGTGGGATTCTTAATGAGCCA 139
Sbjct 3171077    ACGGGAGGGATTCTTAATGAGCCA 3171100
```

Figura 36: Comparación en BLAST de la secuencia del inserto col.14 con *Gallus gallus*.

Tan solo la primera parte de la secuencia (remarcada en negrita en la tabla XVII) coincide con la secuencia protéica (con una porcentaje de identidad del 94%), terminando justo cuando empieza la zona del microsatélite. El resto de la secuencia sería propia de la perdiz y, posiblemente, pertenezca a una secuencia intrónica, y por lo tanto no conservada. Como ya se ha comentado en la introducción, estas zonas son óptimas para la aparición de ADN repetido, como el caso de los microsatélites.

B) Para el microsatélite col.15 sí se obtuvo amplificación y secuencias para la totalidad de los 22 individuos estudiados. Se obtuvo un microsatélite compuesto interrumpido con la forma:

MICROSATÉLITE:	(AT) _n (AC) ₃ T(AC) _n (AT) _n			
MOTIVOS:	1		2	3

- Alelos para el motivo 1 (AT)_n. n = 4,5,6 y 7. (4 alelos).
- Alelos para el motivo 2 (AC)_n. n = 4,5,8,9,10,11 y 15. (7 alelos).
- Alelos para el motivo 3 (AT)_n. n = 5,6,10,12,13,14,17,18 y 20. (9 alelos)

Las secuencias flanqueantes están altamente conservadas, obteniéndose siempre la amplificación de una banda. Por ello, los cebadores utilizados serían candidatos a utilizarse con el marcaje adecuado para estudios de genotipado.

Si se introduce toda la secuencia y se compara en BLAST con el genoma de pollo, se obtiene una semejanza al gen *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1*, situada en el cromosoma 14 (fig.37). La semejanza es del 96% para el 23% de la secuencia introducida, y comienza justo después de la zona que contiene el microsatélite (subrayada en la tabla XVII). La explicación es la misma que para el caso del microsatélite col.14. Por tanto, puede considerarse que el microsatélite se encuentra en una zona intrónica, óptima para contener este tipo de secuencias.

Una vez comprobada su validez como microsatélite el siguiente paso sería marcar los cebadores para hacer estudios de genotipado en distintas poblaciones, y así comprobar su verdadero poder como microsatélite.

```
>ref|NW_001471454.1|Ggal14_WGA202_2 D Gallus gallus chromosome 14 genomic contig, reference assembly
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=11975588

Features in this part of subject sequence:
  eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1

Score = 130 bits (70), Expect = 2e-28
Identities = 79/83 (96%), Gaps = 1/83 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 217      GGAATGGTTACCTGGAGGGAGAGCAGGTCTGTGAGGTGGGAGTCTCCCAAGCACTCACT 276
                |||||
Sbjct 970552    GGAATGGTTACCTGGAGGGAGAGCAGGTCTGTGAGGTGGGAGCCCTTCCAAACACTCACT 970611

Query 277      AGTTTCACTAACAGATGGTAAAG 299
                |||||
Sbjct 970612    A-TTTCATAACAGATGGTAAAG 970633
```

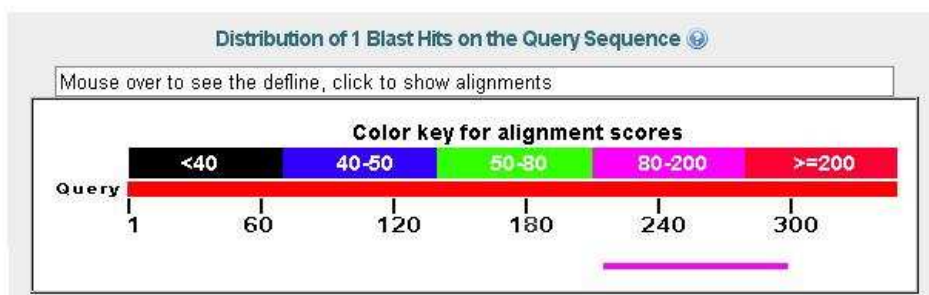


Figura 37: Comparación en BLAST de la secuencia del inserto col.15 con *Gallus gallus*.

Estudios posteriores siguiendo la misma línea, darán lugar a la obtención de nuevos microsatélites marcadores. Es por ello tan interesante la realización previa de la genoteca, ya que una vez preparada, se convierte en punto de partida para la búsqueda de cualquier región de ADN o de genes y su estudio. En el caso de la búsqueda de microsatélites, es fundamental que se trate de una genoteca genómica, ya que es en las secuencias no codificantes, donde normalmente se sitúan este tipo de marcadores. El trabajo podrá ser usado por la comunidad científica interesada en la estructura génica de la perdiz, genómica comparativa y estudios funcionales de genes.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

VII. CONCLUSIONES.

1. En la comparación de los 3 kits empleados para la extracción de ADN, se concluye que el kit DNeasy blood and tissue de Qiagen, permite una extracción óptima de ADN para nuestros intereses (sin degradar y con alta concentración).
2. Para la identificación del sexo en perdiz mediante el análisis de ADN, se hace necesario el uso de una enzima de restricción (*HaeIII*), a diferencia de lo sugerido por Griffiths *et al.* en 1998.
3. Cuando se analizan dos poblaciones de perdiz (una silvestre y otra en cautividad) mediante 2 marcadores microsatélites (p58 y m27), se obtienen valores de heterocigosidad, PIC y consanguinidad. Para la población silvestre la heterocigosidad observada es siempre mayor que la esperada, un PIC para los 2 marcadores de 0.744 y 0.683, y no existe consanguinidad. En la población en cautividad la heterocigosidad observada es menor que la esperada, el valor de PIC es de 0.608 y 0.682, y la consanguinidad, aunque baja, se estima en un valor de 0.210.

Con respecto a la obtención de la genoteca se han obtenido las siguientes conclusiones:

4. A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que el mejor método de ruptura del ADN genómico es el enzimático (*AluI*), frente a los métodos de degradación por pipeteo o el de congelación-descongelación.
5. La eficiencia de transformación obtenida ha sido más baja de lo teóricamente esperado, 106.600 colonias, frente a las casi 2.400.000 colonias. Es por ello, que la probabilidad de tener representado el genoma completo de perdiz, con el 95% de probabilidades, es del 12%.

6. El método de amplificación del inserto mediante la técnica de recogida directa de la colonia con punta, es tan válido a la hora de secuenciar y de obtener el inserto amplificado aislado, como realizándolo tras una miniprep.
7. A pesar de que la bibliografía advierte de la baja frecuencia de microsatélites en aves, mediante el método de secuenciación al azar, se han analizado 20 colonias con tamaños de inserto adecuados, encontrándose una repetición (AG)_n con tres variantes alélicas. Esto hace, que por colonia, haya un 5% de posibilidades que contengan secuencias microsatélite.
8. Cuando la búsqueda de microsatélites se realiza por PCR y utilizando cebadores con secuencias repetidas en tandem, se obtienen numerosos falsos positivos, de lo que se concluye que no es un método adecuado para ello.
9. Con el método de hibridación por sondas marcadas se han identificado dos colonias portadoras de microsatélites (AC)_n, uno de ellos perfecto, y el otro, compuesto interrumpido. Los dos estarían localizados en una secuencia intrónica; el primero en el locus correspondiente a la *protenina eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6*, situada en el cromosoma 2, y el segundo, en el locus del gen *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1*, situado en el cromosoma 14.

VIII. CONCLUSIONS.

1. In the comparison of the 3 kits used for DNA extraction, we conclude that the DNeasy blood and tissue kit from Qiagen, allows optimal extraction of DNA for our interests (without degrading and high concentration).
2. For the identification of sex in partridge by DNA analysis, it is necessary to use a restriction enzyme (HaeIII) unlike suggested by Griffiths et al. in 1998.

3. When testing two populations of partridge (a wild and other captive) with 2 microsatellite markers (p58 and m27), we obtained values of heterozygosity, PIC and inbreeding. For the wild population the observed heterozygosity is always greater than expected, a PIC for the 2 markers 0.744 and 0.683, and there is no inbreeding. In the captive population the observed heterozygosity is lower than expected, the PIC value is 0.608 and 0.682, and inbreeding, while low, is estimated at a value of 0,210.

With regard to the library, we have obtained the following conclusions:

4. In view of the results obtained in this study, we conclude that the best method of breaking the genomic DNA is the enzyme (AluI), compared to the methods of degradation by pipetting or freezing and thawing.

5. The transformation efficiency obtained was lower than expected theoretically, 106,600 colonies, compared to the nearly 2,400,000 colonies. That is why the probability of having represented the entire genome of partridge is 12%.

6. The method of amplification of the insert using the technique of direct collection of the art colony, is equally valid at the time of sequencing and the insert amplified get isolated, made with a miniprep.

7. Although the literature warns of the low frequency of microsatellites in birds, one was obtained by sequencing 20 random colonies with appropriate insert sizes. It is a repeat (AG) n with three allelic variants. Makes a 5% chance per colony having 1-1,5Kb size of insert to contain a microsatellite.

8. When the search is performed by microsatellite PCR using primers with sequences repeated in tandem, you get many false positives, and found that there is an adequate method for this.

9. By the method of hybridization probes labeled, two colonies where identified to carry of microsatellite (AC) n , one perfect and another compound interrupted. The

two will be located in intron sequence, the first in the eukaryotic translation initiation factor protein 3, subunit 6, located in the chromosome 2, and the second in the gene eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1, located on chromosome.

BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adhya S, Gottesman M. Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* 29: 939-944. (1982).
- Allendorf FW, Luikart G. Conservation and the genetic of populations. Blackwell Publishing, Malden. (2007).
- Ansón JA, Savva D, García CB, Arruga MV. Estudios genéticos en el género *Alectoris*, que posibilitan la identificación del grado de introgresión de especies invasivas. Congreso Nacional de Especies Invasivas. Zaragoza. Noviembre 2009. (2009).
- Ansón JA, Savva D, García CB, Arruga MV. Estudios genéticos en la perdiz roja (*Alectoris rufa*, L.) a partir de una genoteca de ADN. XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Genética (SEG). Málaga (España) 29 Sep-2 Octubre de 2009. (2009b).
- Arruga MV, Tejedor T, Villarroel MR, Hériz A, Ferreira E, Abenia FJ. Genetic studies in *Alectoris rufa* and *A. graeca* in Spain. *Archivos de Zootecnia* 45: 339–344. (1996).
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons. 4th Edition (1999).
- Bahassi EM, Salmon MA, Van Melderén L, Bernard P, Couturier MF. Plasmid CcdB killer protein: ccdB gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. *Mol. Microbiol.* 15(6):1031-7. (1995).
- Baratti M, Ammannati M, Magnelli C, Dessi-Fulgheri F. Introgression of chukar genes into a reintroduced red-legged partridge (*Alectoris rufa*) population in central Italy. *Anim. Genet.* 36: 29–35. (2005).
- Barbanera F, Guerrini M, Khan A, Panayides P, Hadjigerou P, Sokos C, Gombobaatar S, Samadi S, Khan B, Tofanelli S, Paoli G, Dini F. Human-mediated introgression of exotic chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) genes from East Asia into native Mediterranean partridges. *Biological Invasions*, 11 (2): 333-348. (2009).
- Barbanera F, Negro JJ, Di Giuseppe G, Bertoncini F, Cappelli F, Dini F. Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes)

- populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: a study from central Italy. *Biol. Conserv.* 122: 275–287. (2005).
- Barilani M, Bernard-Laurent A, Mucci N, Tabarroni C, Kark S, Perez Garrido JA, Randi E. Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biol. Conserv.* 137: 57. (2007).
- Barilani M, Deregnaucourt S, Gallego S, Galli L, Mucci N, Piombo R, Puigcerver M, Rimondi S, Rodríguez-Teijeiro JD, Spanò S, Randi E. Detecting hybridization in wild (*Coturnix c. coturnix*) and domesticated (*Coturnix c. japonica*) quail populations. *Biol. Conserv.* 126 : 445–455. (2005).
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 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). (1996-2004)
- Bermúdez-Humaran L, Chavez P, Guzman A, Leal C, Montes R. Loss of Restriction Site Ddel, used for Avian Molecular Sexing, in *Oreophasis derbianus*. *Reprod. Dom. Anim.* 37:321-323. (2002).
- Bichara M, Pimet I, Schumacher S, Fuchs RP. Mechanisms of dinucleotide repeat instability in *Escherichia coli*. *Genetics* 154:533-542. (2000).
- Birdlife International Birds in the Europe Union: a status assessment. Wageningen, the Netherlands: *Birdlife International*. (2004).
- Birnboim HC, Doly J. *Nucleic. Acids. Res.* 24; 7(6):1513-23. (1979).
- Blanco Aguiar JA, Virgós E, Villafuerte R. Perdiz Roja (*Alectoris rufa*). Atlas de las aves reproductoras de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza y Sociedad Española de Ornitología, Madrid, España. (2003).
- Blanco JA, González P, Ferrero ME, Sánchez I, Virgós E, Villafuerte R, Dávila JA. Assessment of game restocking contributions to anthropogenic hybridization: the case of the Iberian red-legged partridge. *Animal Conservation* 11 (6): 535-545. (2008).
- Blasco Zumeta J. Atlas de Identificación de las Aves de Aragón. Laboratorio Virtual Ibercaja. <http://www.ibercajalav.net>. (2011).
- Bloom SE, Delany ME, Muscarella DE. Constant and variable features of avian chromosomes. *Manip. Av. Gen.* 39–60. CRC Press, Florida. (1993).

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331. (1980).
- Bourque G, Pevzner PA, Tesler G. Reconstructing the genomic architecture of ancestral mammals: lessons from human, mouse, and rat genomes, *Genome Res.* 14: 507–516. (2004).
- Bowater RP, Jaworski A, Larson JE, Parniewski P, Wells RD. Transcription increases the deletion frequency of long CTG·CAG triplets repeats from plasmids in *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.* 25: 2861-2868. (1997).
- Brandström M, Ellegren H. Genome-wide analysis of microsatellite polymorphism in chicken circumventing the ascertainment bias. *Genome Res.* 18(6): 881–887. (2008).
- Brown WR, Hubbard SJ, Tickle C, Wilson SA. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function, *Nat. Rev. Genet.* 4: 87–98. (2003).
- Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236:806-812. (1987).
- Burt DW, Bruley C, Dunn IC, Jones CT, Ramage A, Law AS, Morrice DR, Paton IR, Smith J, Windsor D, Sazanov A, Fries R, Waddington D. The dynamics of chromosome evolution in birds and mammals, *Nature* 402: 411–413. (1999).
- Carranza J, Martínez JG, Sánchez CB, Fernández JL, Sánchez B, Álvarez R, Valencia J, Alarcos S. Game species: extinction hidden by census numbers. *Anim. Biodivers. Conserv.* 26: 81–84. (2003).
- Ceplitis H, Ellegren H. Adaptive Molecular Evolution of HINTW, a Female-Specific Gene in Birds. *Mol Biol Evol* 21 (2): 249-254. (2004).
- Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E.coli* genome. *Cell* 9: 91-99. (1976).
- Darling JA, Blum MJ. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol. Invasions* 9: 751–765. (2007).
- Delibes-Mateos M, Ramírez E, Ferreras P, Villafuerte R. Translocations as a risk for the conservation of European wild rabbit lineages. *Oryx* 42: 259–264. (2008).
- Dieringer D, Schlötterer C, Schlötterer C. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: Evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Res.* 13: 2242–2251. (2003).

- DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7:1071-1075. (1998).
- Dragoev P. On the population of the rock partridge (*Alectoris graeca Meisner*) in Bulgaria and methods of census. *Acta Ornithologica* 30: 251-255. (1974).
- Edmands S. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol. Ecol.* 16: 463. (2007).
- Ellegren H. The avian genome uncovered. *Trends in Ecol. Evol.* 20 (4): 180-186. (2005).
- Feng T, Li Z, Jiang W, Breyer B, Zhou L, Cheng H, Haydon RC, Ishikawa A, Joudeh MA, He TC. Increased efficiency of cloning large DNA fragments using a lower copy number plasmid. *Biotechniques* 32(5): 992-996. (2002).
- Frayer D, Wolpoff M. Sexual Dimorphism. *Annu. Rev. Anthropol.* 14: 429-473. (1985).
- Fridolfsson A, Cheng H, Copeland N, Jenkins N, Raudsepp H, Woodage T, et Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H. Evolution of the Avian Sex Chromosomes from an Ancestral Pair of Autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8147-8152. (1998).
- García CB y Arruga MV. Análisis comparativo de genes de perdiz rojay chuckar mediante caracterización por SNPS. ITEA. 26: 69-71. (2005).
- García CB, Bonafonte JI, Gálvez A, Martínez-Sañudo MJ, Graus J, Arruga MV. Detección de introgresión de genes de perdiz Chukar (*Alectoris chukar*) en poblaciones silvestres de perdiz roja (*A. rufa*) de la provincia de Alava. XIII Jornadas sobre producción animal, Zaragoza (2009)
- García CB, Monteagudo LV, Tejedor MT, Angulo B, Gruas C, Gómez MJ, Marín F, Arruga MV. Evaluación de la hibridación y características genéticas en perdices de la Comunidad Autónoma de Aragón. ITEA 28: 429-431. (2007).
- García CB. Determinación de la pureza genética en poblaciones de perdiz roja (*Alectoris rufa*, L.) mediante estudios moleculares y análisis citogenético comparativo. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza. (2005)
- Glöckner G, Szafranski K, Winckler T, Dinger mann T, Quail M, Cox E, Eichinger L, Noegel AA, Rosenthal A. The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res* 11: 585-594. (2001).

- Godiska R, Patterson M, Schoenfeld T, Mead DA. Beyond pUC: Vectors for cloning Unstable DNA. DNA Sequencing: Optimicing the process and Analysis. Jones and Bartlett Publishers. (2005).
- Gonzalez EG, Castilla AM, Zardoya R. Novel polymorphic microsatellites for the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) and cross-species amplification in *Alectoris graeca*. *Mol. Ecol. Notes*. 5(2): 449 – 451. (2005).
- Gonzalez-Redondo P. Mejora de la calidad de la perdiz roja de granja. *Mundo ganadero*. 94: 56-59. (1997).
- González-Redondo P, Delgado-Pertíñez M, Toribio S, Ruiz FA, Mena Y, Caravaca FP, Castel JM. Caracterización y tipificación de las granjas cinegéticas de perdiz roja (*Alectoris rufa*) en España. *Sp. J. Agric.Res.* 8 (3): 624-633. (2010).
- Goodman SJ, Barton NH, Swanson G, Abernethy K, Pemberton JM. Introgression through rare hybridization: a genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics* 152: 355–371. (1999).
- Goodwin D. Further notes on chukar and hybrid partridges in Britain and Europe. *Avicultural Magazines*. 92 : 157-160. (1986).
- Greger IH, Demarchi F, Giacca M, Proudfoot NJ. Transcriptional interference perturbs the binding of Sp1 to the HIV-1 promoter. *Nucleic Acid. Res.* 26: 1294-1301. (1998).
- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. Genética. McGraw-Hill. Novena edición. (2008)
- Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Biol Sci.* 263:1251-1255. (1996)
- Griffiths R, Double M, Orr K, Dawson R. Short communication: A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7:1071-1075. (1998).
- Griffiths R, Tiwari B. Sex of the last wild Spix.s macaw. *Nature*. 375: 454. (1995).
- Gutiérrez-Corcheró F, Arruga MV, Sanz L, García CB, Hernández MA, Campos F. Usinnng FTA® cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. *Mol Ecol.* 2: 75-77 (2002).
- Hall TA. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis pregram for Windows TM. Bioedit Versión 7.0 (1999).

- Harrington JJ, Van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K, Willard HF. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nature Genetics*. 15: 345-355 (1997).
- Hernandez-Briz Vilanova F. La perdiz roja. Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid. (1991).
- Hughes AL, Piontkivska H. DNA repeat arrays in chicken and human genomes and the adaptive evolution of avian genome size. *BMC Evol. Biol.* 5:12 (2005).
- Hutchings JA, Fraser DJ. The nature of fisheries and farming-induced evolution. *Mol. Ecol.* 17: 294. (2008).
- International Chicken Genome Sequencing Consortium (I.C.G.S.C.). Sequencing and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution, *Nature* 432: 695–716. (2004).
- International Chicken Polymorphism Map Consortium (I.C.G.S.C.). A genetic variation map for chicken with 2.8 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 432: 717–722. (2004b).
- Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T, Tsubota T. Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoologl Sci.* 20:339-344. (2003).
- Iyer RR, Wells RD. Expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli* occur on the leading strand of DNA replication. *J Biol. Chem.* 274: 3865-3877. (1999).
- Joneja A, Huang X. A device for automated hydrodynamic shearing of genomic DNA. *BioTechniques*. 46(7): 553–556. (2009).
- Joyce P, Tavaré S. The distribution of rare alleles. *J. Math. Biol.* 33: 602-618 (1995).
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Eco.* 16: 1099-1006. (2007).
- Kasai F, Garcia C, Arruga MV, Ferguson-Smith MA. Chromosome homology between chicken (*Gallus gallus domesticus*) and the red-legged partridge (*Alectoris rufa*); evidence of the occurrence of a neocentromere during evolution. *Cytogenet Genome Res.* 102: 326-330. (2003).

- Kayang BB, Vignal A, Inoue-Murayama M, Miwa M, Monvoisin JL, Ito S, Minvielle F. A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail, *Anim. Genet.* 35: 195–200. (2004).
- Kricka LJ. Nonisotopic DNA Probe Techniques. Academic press. (1992).
- Kwon YS, Kim J, Kang C. Viability of *E.coli* cells containing phage RNA polymerase and promoter: interference of plasmid replication by transcription. *Genet. Anal.* 14: 133-139. (1998).
- Lessells CM, Mateman AC. Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.* 7: 187–195. (1998).
- Lin Y, Dent SYR, Wilson JH, Wells RD, Napierala M. R loops stimulate genetic instability of CTG-CAG repeats. *PNAS*, 107(2): 692 - 697. (2010)
- Liza J, Maturrano L, Rosadio R. Determinación del sexo por ADN en cinco especies de guacamayos. *Rev. investig. vet. Perú.* 19: 31-36. (2008).
- Madge S, McGowan PJK, Kirwan GM. Pheasants, partridges and grouse: A guide to the pheasants, partridges, quails, grouse, guineafowl, buttonquails and sandgrouse of the world. Christopher Helm, London. (2002).
- Marshall JA. Sex determination: Birds do it with a Z gene. *Nature* 461: 177-178. (2009).
- Matta C, Nubia E, Ramirez M, Nataly, Zuniga D, Betty C. Sex Determination In Birds By Molecular Tools. *Acta Biol.Colomb.* 14: 27-40. (2009).
- McElhen VK. Drawing the Map of Life: Inside the Human Genome Project . Basic Books. (2010).
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, and the SNP workshop group. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 208–216. (2004)
- Mülhardt C, Beese EW, Molecular Biology and Genomics. The Experimenter Series. Elsevier Inc. (2007).
- Murray AW, Szostak JW. Construction of artificial chromosomes in Yeast. *Nature* 305: 189-193. (1983).
- Nadal J. Problemática de las poblaciones de perdiz roja, bases ecoetológicas para tener éxito en las repoblaciones. Gestión del hábitat. Fundación la Caixa, ed. Aedos, Barcelona, 87-100. (1992).

- Negro JJ, Torres MJ, Godoy JA. RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* x *A. graeca*) in Spain. *Biol. Conserv* 8: 9-24. (2001).
- Nei, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(12): 3321-3323. (1973).
- Norman Barea C. Fauna Ibérica. (2008).
<http://www.faunaiberica.org/?page=perdiz-roja>
- Palmer BR, Marinus MG. The dam and dcm strains of *Escherichia coli*, a review. *Gene*. 143(1):1-12. (1994).
- Parniewski P, Bacolla A, Jaworski A, Wells RD. Nucleotide excision repair affects the stability of long transcribed (CTG-CAG) tracts in an orientation-dependent manner in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids. Res.* 27: 616-623. (1999).
- Potts GR. The impact of releasing hybrid partridge on wild red-legged populations. *Game Conserv. Rev.* 20, 81–85. (1989).
- Primmer CR, Møller AP, Ellegren H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.* 5: 365–378. (1996).
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Møller AP, Ellegren H. Low frequency of microsatellites in the avian genome, *Genome Res.* 7: 471–482. (1997).
- Primmer CR, Raudsepp T, Chowdhary BP, Møller AP, Ellegren H. Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Res.* 7: 471-482. (1997).
- Priolo A. Affinità della Coturnice, *Alectoris graeca*, e conseguenze dei ripopolamenti effettuati nei distretti da essa abitati ricorrendo alla Coturnice orientale, *Alectoris chukar*. *Rivista Italiana di Ornitologia*, anno XL, serie II: 441–445. (1970).
- Quaas R, McKeown Y, Stanssens P, Frank R, Blocker H, Hahn U. Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur. J. Biochem.* 173: 617-622. (1988).
- Randi E, Alkon PU, Meriggi A. A new model of *Alectoris* evolution based on biochemical analysis. *Gibier Faune Sauvage* 9: 661-666. (1992).
- Randi E, Bernard-Laurent A. Population genetics of a hybrid zone between the red-legged partridge and rock partridge. *The Auk* 116, 324-337. (1999).
- Rands MRW. Effects of hedgerow characteristics on partridge breeding densities. *J. App. Ecol.* 23: 479-487. (1986).

- Reddy A, Prakash V, Shivaji S. A rapid, non-invasive, PCR-based method for identification of sex of the endangered Old World vultures (white-backed and long-billed vultures) - Implications for captive breeding programmes. *Curr. Sci.* 92: 659-662. (2007).
- Roussot O, Feve K, Plisson-Petit F, Pitel F, Faure JM, Beaumont C, Vignal A. AFLP linkage map of the Japanese quail *Coturnix japonica*. *Genet. Selec. Evol.* 35: 559–572. (2003).
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press: 365-386 (2000).
- Sáenz de Buruaga M, Lucio AJ, Purroy FJ. Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas. Vitoria-Gasteiz: Gobierno Vasco y Diputaciones Provinciales. (1991).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6. (1989).
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3^o Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 10:8. (2001).
- Sambrook J, Russell DW. Fragmentation of DNA by Nebulization. *Cold Spring Harb. Protoc.* (2006)
- Sambrook J, Russell DW. Fragmentation of DNA by Sonication. *Cold Spring Harb. Protoc.* (2006b).
- Shen Y, Liang L, Su Y, Yue B, Yang X, Murphy RW, Zhang YP. A mitogenomic perspective on the ancient, rapid radiation in the Galliformes with an emphasis on the Phasianidae. *BMC Evolutionary Biology*, 10:132. (2010).
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG, Doran TJ, Sinclair AH. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461: 267-271. (2009).
- Stiglec R, Ezaz T, Graves JAM. Reassignment of chicken W chromosome sequences to the Z chromosome by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet. Genome Res.* 116: 132-134. (2007).

- Tejedor MT, Monteagudo LV, Mautner S, Hadjisterkotis E, Arruga MV. Introgression of *Alectoris chukar* genes into a Spanish wild *Alectoris rufa* population. *J. Hered* 98:179–182. (2007).
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-80. (1994).
- Tierny Y, Hounsa CG, Hornez JP. Effects of a recombinant gene product and growth conditions on plasmid stability in pectinolytic *Escherichia coli* cells. *Microbios.* 386: 39-53. (1999).
- Tucker GM, Heath MF. Birds in Europe: Their Conservation Status. Bird Life Conservation Series, 3. Bird Life International, Cambridge, UK. (1994).
- Velez Tébar MA. Estudio de un sistema de marcadores microsatélites para la protección y defensa legal de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) Tesis Doctoral Universidad de Alcalá. (2007).
- Venter JC, et al. The human genome. Science genome map. *Science.* Science 291, 1304. (2001).
- Vernesi C, Crestanello B, Pecchioli E, Tartari D, Caramelli D, Hauffe H, Bertorelle G. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 12: 585. (2003).
- Vieira J, Messing J. New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene.* 100: 189-194. (1991).
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6, 3543 (1979).
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. “Ch9-10”, Molecular Biology of the Gene, 5th ed., Peason Benjamin Cummings; CSHL Press. (2004).
- Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution.* Vol. 38(6): 1358-1370. (1984).
- Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M, Son LS. Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Res.* 33(12): 3785-3798. (2005).

- Wicker T, Robertson JS, Schulze SR, Feltus FA, Magrini V, Morrison JA, Mardis ER, Wilson RK, Peterson DG, Paterson AH, Ivarie R. The repetitive landscape of the chicken genome, *Genome Res.* 15: 126–136. (2004).
- Woodage T, Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H. Evolution of the Avian Sex Chromosomes from an Ancestral Pair of Autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 8147-8152. (1998).
- Wurtzel ET, Movva NR, Ross FL, Inouye M. Two-steps cloning of the *Escherichia coli* regulatory gene ompB, employing phage Mu. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 61-69. (1981).