Comunidad de Madrid

Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación Sierra de Guadarrama

GENOMA COMPLETO DE LA PERDIZ ROJA PURA DE LAS CUMBRES DEL PARQUE NACIONAL

AÑO 2024

SIERRA DE GUADARRAMA PARQUE NACIONAL

Centro de Investigación Seguimiento y Evaluación Sierra de Guadarrama

irec UCLM

Unión Europea
Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural
Europa invierte en las zonas rurales

CONSEJERIA DE MEDIO AMBIENTE, AGRICULTURA E INTERIOR

DIRECCION GENERAL DE BIODIVERSIDAD Y GESTION FORESTAL

PARQUE NACIONAL DE LA SIERRA DE GUADARRAMA

CENTRO DE INVESTIGACION, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN

GENOMA COMPLETO DE LA PERDIZ ROJA PURA DE LAS CUMBRES DEL PARQUE NACIONAL

AÑO 2024

Dirección científica

José Antonio Dávila. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Universidad de Castilla la Mancha (UCLM).

Equipo de trabajo

Fernando Horcajada. Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Santiago Martín. Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Sergio Rubio. Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Coordinación

Juan A. Vielva. Responsable del Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE)

Imagen portada: CISE 2024

ÍNDICE

ÍNDICE **3**

PREFACIO **4**

1. ANTECEDENTES **5**

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **10**

3. ÁREA DE ESTUDIO **12**

3.1. Hábitats asociados a la distribución de la perdiz roja 13

4. MATERIAL Y MÉTODOS **16**

4.1. Recolección de muestras 16

4.2. Extracción del ADN 17

4.3. Secuenciación del genoma completo 18

4.4. Marcadores moleculares y análisis filogenético para detectar introgresión 18

4.5. Mapa de densidades Kernel 19

5. RESULTADOS **20**

5.1. Secuenciación del genoma completo 20

5.2. Evaluación de la introgresión genética con *Alectoris chukar* 21

6. DISCUSIÓN **22**

6.1. Recomendaciones para futuros estudios 28

7. REFERENCIAS **29**

PREFACIO

Tal y como se ha comentado en anteriores informes, todo se inicia en el anterior siglo, con la observación de unos bandos de perdices rojas, en las zonas altas del Parque Natural de Peñalara. Su apariencia y rasgos diferentes a otras perdices observadas en las zonas más bajas del Parque Natural llamó nuestra atención y nos hizo presumir que estábamos ante unas poblaciones con un valor excepcional, a la que debíamos dedicar tiempo en seguimiento y observación hasta tener la posibilidad de llevar a cabo una caracterización genética que nos diera datos de su pureza.

La declaración del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama propició, en el año 2.017, el inicio de un esfuerzo investigadora lo largo del tiempo. Como desarrollo del mismo se llevó a cabo una caracterización genética de las poblaciones de perdiz roja observadas, no solo en las cumbres del parque nacional, sino también en su Zona Periférica de Protección. El resultado de esta caracterización ya avanzó al presumido valor excepcional de estas poblaciones a la que atribuía una pureza genética no observado en la mayor parte de las poblaciones ibéricas.

Con estos datos y preocupados por las numerosas repoblaciones con perdices de granja que amenazan seriamente la pureza genética de esta especie, estimamos la necesidad de abordar el estudio del genoma completo de la perdiz roja pura de las cumbres del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama.

En la memoria del año 2.024 que ahora se presenta destaca la importancia de esta secuenciación del genoma de una perdiz roja pura de las cumbres del parque nacional, que es la primera vez que se lleva a cabo sobre una perdiz pura.

De todo ello da cuenta este informe elaborado por el equipo de trabajo de fauna de este Centro, que cuenta además con la dirección científica del investigador del IREC Jose Antonio Dávila, de quien copamos literalmente el comentario referido a estos trabajos en zonas de montaña: *Estos trabajos genómicos transforman nuestra comprensión del valor conservacionista de estas poblaciones , ya no se trata de ejemplares libres de hibridación, sino de linajes con adaptaciones potencialmente únicas desarrolladas durante milenios de aislamiento en ambientes montanos*.

JUAN VIELVA JUEZ
RESPONSABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN

INFORME

1. ANTECEDENTES

La conservación de la biodiversidad en un espacio protegido como el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, se enfrenta a desafíos complejos, donde los aspectos genéticos adquieren cada vez más relevancia. El parque nacional ha recurrido a menudo a este tipo de metodologías, en aspectos tan variopintos como las labores de restauración de la vegetación en el monte público Los Cotos, la epidemia de quitridiomicosis en las poblaciones de anfibios del parque, la caracterización de las poblaciones de corzo o la historia evolutiva de las poblaciones de liebre de montaña.

En este contexto, el estudio de la perdiz roja (*Alectoris rufa*) en la Sierra de Guadarrama representa un caso paradigmático que combina dos líneas de investigación críticas para su preservación: por un lado, el análisis del riesgo de introgresión genética derivado de repoblaciones en los cotos de caza con ejemplares híbridos, y por otro, la caracterización genómica de las poblaciones puras de alta montaña. Este enfoque dual permite, no solo evaluar las amenazas actuales, sino también establecer bases científicas sólidas para la conservación de la perdiz roja a largo plazo.

Se puede afirmar que la hibridación genética es un fenómeno habitual bastante generalizado, que en condiciones naturales juega un papel crucial en fenómenos de especiación y evolución de las especies animales (Grant et al., 2004), que puede tener efectos positivos y negativos, según el estado y las diferentes circunstancias de las poblaciones. El efecto negativo normalmente se debe a la alteración del acervo genético adquirido por la evolución a un ambiente determinado (Allendorf et al., 2001). La hibridación interespecífica, cuando es mediada por actividades humanas como es el caso, constituye uno de los factores más insidiosos de erosión genética en

especies silvestres. En el caso de la perdiz roja, endémica del Mediterráneo occidental, este fenómeno ha alcanzado proporciones alarmantes debido a las prácticas cinegéticas extendidas en la Península Ibérica (Blanco-Aguiar et al., 2008). Durante décadas, la demanda creciente de ejemplares para repoblación ha llevado a la cría masiva en granjas, donde por motivos económicos y logísticos se han producido hibridaciones con la perdiz turca (*Alectoris chukar*), especie asiática filogenéticamente próxima (del Hoyo et al., 1994) pero ecológicamente muy distante (McCarthy, 2006) (Fig. 1). Las consecuencias de esta introgresión artificial son múltiples y profundas: desde la dilución de adaptaciones locales desarrolladas a lo largo de milenios, hasta la introducción de patógenos contra los que las poblaciones autóctonas carecen de defensas.

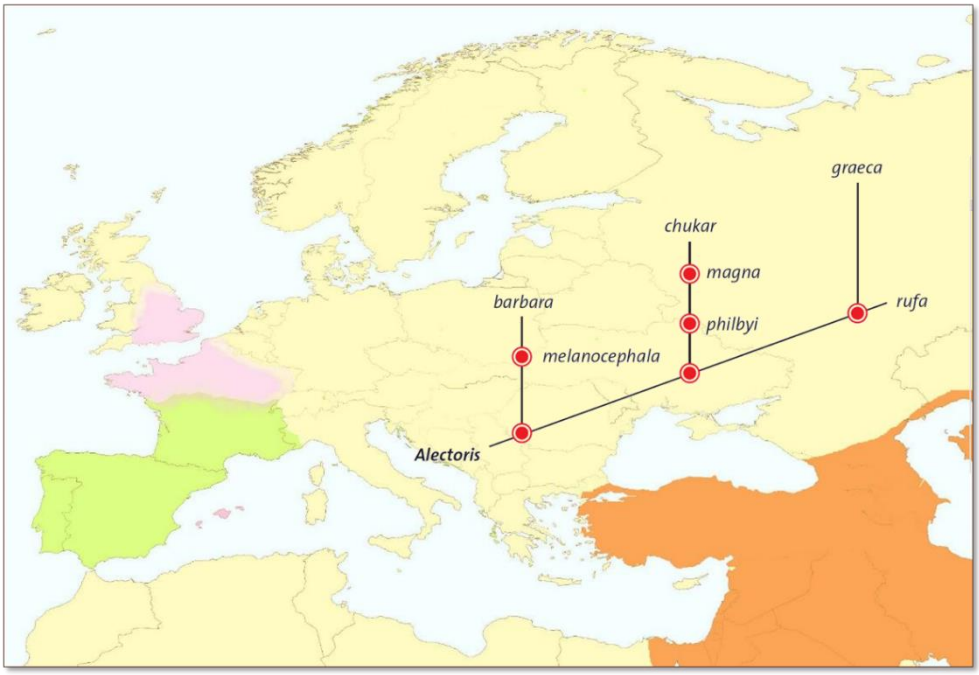

Figura 1. Distribución natural de la perdiz roja (sombreado en verde) y de la perdiz turca (sombreado en marrón, y zonas donde la perdiz roja se ha introducido artificialmente (sombreado en rosa) (del Hoyo et al., 1994). También podemos apreciar un gráfico con la distancia genética entre la perdiz roja (*A. rufa*) y la perdiz turca (*A. Chukar*) (Duarte, 1998).

La gravedad de esta situación se hace evidente al considerar que prácticamente la totalidad de las perdices criadas en cautividad y liberadas al medio natural (se estima

que entre 6 y 8 millones anuales) presentan algún grado de hibridación (Birdlife International, 2004). Este flujo genético artificial, amenaza con homogenizar el acervo génico de las poblaciones silvestres, poniendo en peligro la identidad biológica de la especie en todo su ámbito de distribución (Blanco-Aguiar et al., 2008; Barbanera et al., 2009).

Figura 2. Toma de muestras en un ejemplar de perdiz turca para su análisis genético y sanitario. Fuente: IREC.

Además, las consecuencias ecológicas se extienden más allá del ámbito genético, ya que estas sueltas masivas alteran la estructura poblacional natural y pueden introducir enfermedades para las que las perdices autóctonas no han desarrollado resistencia. Los tratamientos sanitarios utilizados en granja para disminuir la carga parasitaria de las aves antes de su liberación, se muestran ineficaces (Villanúa et al., 2008), lo que agrava el problema potencial de transmisión de parásitos entre aves de granja y aves silvestres (Fig. 2).

Frente a este panorama, las poblaciones de perdiz roja que habitan las zonas altas de la Sierra de Guadarrama, representan un caso excepcional y de extraordinario

valor conservacionista. Su relativo aislamiento geográfico, unido a la protección legal tanto desde el Parque Natural de la Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara, desde el año 1990, como con el parque nacional desde el 2013, unido a la prohibición de repoblaciones en su ámbito, las convierte en uno de los últimos reservorios genéticos de la especie en estado puro. Estas condiciones particulares ofrecen una oportunidad única para estudiar la genética de la perdiz roja sin la interferencia de introgresión reciente, proporcionando una línea base fundamental para evaluar el impacto de la hibridación en otras poblaciones.

Es en este contexto donde adquiere especial relevancia la secuenciación del genoma completo de un ejemplar de estas poblaciones de alta montaña. Este avance tecnológico representa un salto cualitativo en la investigación de la especie, ya que proporciona una herramienta de referencia sin precedentes para estudios de genética de la conservación. El genoma de referencia no solo permite caracterizar con precisión el perfil genético de las poblaciones puras, sino que también establece un patrón objetivo contra el que medir el grado de introgresión en otras poblaciones (Chattopadhyay et al 2021, González-Prendes et al 2024). Además, ofrece la posibilidad de identificar regiones genómicas potencialmente asociadas a adaptaciones locales, lo que podría explicar la especialización ecológica de estas poblaciones a los ambientes de montaña.

La combinación de estos dos enfoques, evaluación del riesgo de hibridación y caracterización genómica de poblaciones puras, constituye una estrategia integral para abordar el problema conservacionista de la perdiz roja. Por un lado, el monitoreo de la introgresión genética (Fig. 3) permite cuantificar la magnitud real de la amenaza y su distribución espacial, información esencial para diseñar medidas de gestión efectivas. Por otro, el genoma de referencia proporciona las herramientas analíticas necesarias para este monitoreo, además de abrir nuevas líneas de investigación sobre la biología evolutiva de la especie.

Este estudio se enmarca en un esfuerzo investigador continuado que comenzó en 2017 con la caracterización genética de las poblaciones de cumbre del Parque Nacional y su zona periférica de protección (Fig. 4). Los resultados preliminares ya habían señalado el valor excepcional de estas poblaciones, mostrando niveles de pureza genética inusuales en el contexto ibérico. Sin embargo, era necesaria una aproximación genómica más completa para comprender en profundidad sus características genéticas y su relación con las poblaciones afectadas por hibridación.

Figura 3. Los ejemplares capturados vivos y las plumas en dormideros han sido el origen fundamental de las muestras para análisis genético en zonas de cumbre.

La importancia de esta investigación trasciende el ámbito académico, ya que sus resultados tienen implicaciones directas para la gestión y conservación de la especie. En un escenario donde la presión cinegética sigue siendo intensa y donde los intereses económicos asociados a las repoblaciones con perdices de granja son considerables, contar con datos científicos sólidos es fundamental para sostener políticas conservacionistas efectivas. La identificación de poblaciones genéticamente puras y la

cuantificación precisa del riesgo de hibridación son pasos necesarios para establecer prioridades de conservación y regular las actividades que amenazan la integridad genética de la especie.

Además, este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones que exploren aspectos como la posible especialización adaptativa de las poblaciones de alta montaña o los mecanismos genéticos que podrían estar detrás de su resistencia a la hibridación. Estas líneas de investigación no solo enriquecerían nuestro conocimiento sobre la biología de la perdiz roja, sino que también podrían proporcionar herramientas innovadoras para su conservación.

El presente estudio representa por tanto un esfuerzo integral que combina aproximaciones genómicas modernas con estudios ecológicos tradicionales, todo ello aplicado a resolver un problema de gestión de una especie cinegética. Los resultados obtenidos tienen valor tanto para la comunidad científica como para los gestores del medio natural, proporcionando información esencial para preservar uno de los últimos bastiones de perdiz roja genéticamente pura en la Península Ibérica. En última instancia, este trabajo contribuye a demostrar que la conservación genética no es un lujo académico, sino una necesidad práctica para mantener la viabilidad a largo plazo de nuestras especies más emblemáticas.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde su fundación en 1999, el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) ha dedicado sus investigaciones a especies de caza, con un interés destacado en la perdiz roja. Una de las líneas de investigación se centra en aspectos genéticos de esta especie, sobre todo aquellos de aplicación en gestión cinegética. Las investigaciones sobre genética de la perdiz roja han sido prolíficas y se han plasmado en patentes y publicaciones científicas que suman conocimientos a otras publicaciones que han aparecido desde otros Centros de Investigación, tanto nacionales como

extranjeros. Sin embargo, este conocimiento adquirido no se ha podido traducir en buenas prácticas de gestión genética de la perdiz roja, debido a la gran brecha que actualmente separa a la investigación aplicada y la gestión cinegética en España.

Con diferencia, el principal problema genético de la perdiz roja es el proceso que sufre de extinción por hibridación antropogénica con líneas domésticas de perdiz turca. Tras estudiar genéticamente poblaciones silvestres y granjas cinegéticas en toda el área de distribución de la especie, desde el IREC podemos justificar este estudio con las siguientes afirmaciones:

- Todas las perdices de todas las granjas cinegéticas son híbridos.
- Algunas perdices soltadas llegan a sobrevivir y reproducirse en libertad entre ellas y con las de las poblaciones silvestres.
- La extensión geográfica de la hibridación aumenta progresivamente debido a que, por un lado, las perdices se desplazan y se reproducen, y por otro, a que cada vez se realizan sueltas cinegéticas en más lugares.
- En la actualidad, son muy pocas las poblaciones conocidas de perdices rojas libres de hibridación. El IREC está estudiando poblaciones en algunas zonas de Navarra, en el propio Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama y otras zonas de montaña que podrían ser reservorios de perdiz pura.

Este año, la secuenciación del primer genoma completo de una perdiz roja pura de las cumbres de Guadarrama ha proporcionado una herramienta revolucionaria para la conservación de la especie. Este recurso genómico, estableciendo un patrón de referencia indiscutible para identificar introgresión con una sensibilidad muy superior a los marcadores moleculares tradicionales. Además, este tipo de análisis innovadores permite detectar regiones genómicas críticas que podrían estar asociadas a adaptaciones locales a ambientes de alta montaña, con consecuencias de vital importancia en la gestión de la perdiz roja, proporcionando la base científica para

declarar estas poblaciones como reservorio genético de la especie, al confirmar la integridad de su acervo génico.

La situación de la perdiz roja es desesperada y de continuar la suelta de híbridos, el futuro a medio plazo de la especie es su extinción por hibridación, siendo sustituidas por poblaciones en las que todos los individuos son híbridos en mayor o menor grado. La única esperanza para la perdiz roja a corto plazo es la de crear reservas protegidas de las repoblaciones en zonas de montaña, donde poder preservar poblaciones que puedan mantener íntegro su genoma hasta que se eliminen a nivel nacional las repoblaciones.

Desde 2017 se ha establecido una colaboración entre el Centro de Investigación del Parque Nacional (CISE) y el IREC para caracterizar el riesgo de introgresión genética de las poblaciones de perdiz roja del parque nacional. El proyecto propuesto intenta obtener información genética de las poblaciones de perdiz roja de este espacio protegido evaluando el riesgo de hibridación a través de la información de muestras, tanto de la sierra como de las zonas de piedemonte, con especial atención a las de la zona periférica de protección (ZPP), con el objetivo de crear una reserva de perdiz roja pura en el parque nacional y una zona de amortiguación de hibridación en la ZPP. El genoma de referencia generado en 2024 eleva este objetivo a un nuevo nivel, permitiendo no solo proteger sino también comprender las bases genéticas de estas poblaciones únicas en el ámbito de distribución de la especie.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio sobre el riesgo de hibridación de la perdiz roja fue desarrollado en el ámbito del parque nacional y su ZPP en la Comunidad de Madrid, unas 51.668 ha (Fig. 3). La altitud media del territorio que compone el ámbito de estudio es elevada, como corresponde a su situación en pleno Sistema Central. La diferencia de relieve entre las cumbres y el piedemonte también es muy grande, lo que condiciona diferencias en la

distribución y densidad de muchas especies. Esta diferencia de relieve es el principal factor de control de la distribución de precipitaciones y temperatura y, en definitiva, es la causa principal de la diversidad de vegetación. La mayoría de la superficie de estudio estaba representada por zonas forestales, concretamente por piornales, bosques de pinos silvestres, bosques de robledales y prados de fondo de valle, como principal vegetación del piso oro y supramediterráneo Guadarrámico.

3.1. Hábitats asociados a la distribución de la perdiz roja

La sierra de Guadarrama pertenece al Sistema Central y biogeográficamente se enmarca en el Sector Guadarrámico de la subprovincia Carpetana. El paisaje vegetal presente actualmente es fruto de una serie de acontecimientos que han sucedido a lo largo del tiempo y que han originado importantes cambios en la estructura y composición de los bosques, con manifestaciones de carácter geológico, climático y de origen humano que han conformado las principales unidades de vegetación en las que se ha desarrollado el estudio (Fig. 5).

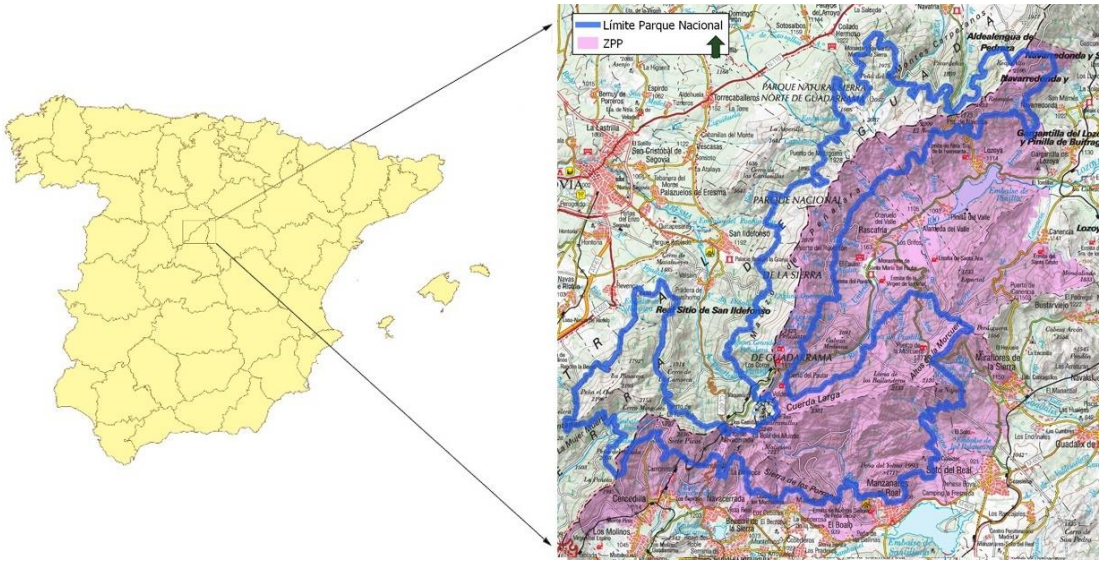

Figura 4. Localización del área de estudio en España y detalle de los límites del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama en azul y del área de estudio en rosa, coincidente con el ámbito del parque nacional y la ZPP en la Comunidad de Madrid.

Los pinares de montaña son bosques compuestos mayoritariamente, en su estrato arbóreo, por el pino silvestre (*Pinus sylvestris*). Estos bosques constituyen la vegetación potencial del piso oromediterráneo guadarrámico. Se trata de formaciones naturales y repobladas, situadas entre los 1.200 y 1.900 m sobre el nivel del mar.

Los bosques de roble rebollo o melojo ocupa el piso montano entre 1.700 y 1.400 m, extendiéndose por toda la sierra de Guadarrama. En la mayor parte de todo ese territorio, al robledal le corresponde el papel de bosque dominante en función de las condiciones mesoclimáticas. En la actualidad, la mayor parte de las formaciones son de árboles jóvenes con gran cantidad de ejemplares procedentes de cepa. Fueron aprovechados antiguamente para leñas y carboneo mediante talas y entresacas, y con frecuencia aclaradas o adehesadas para pastos.

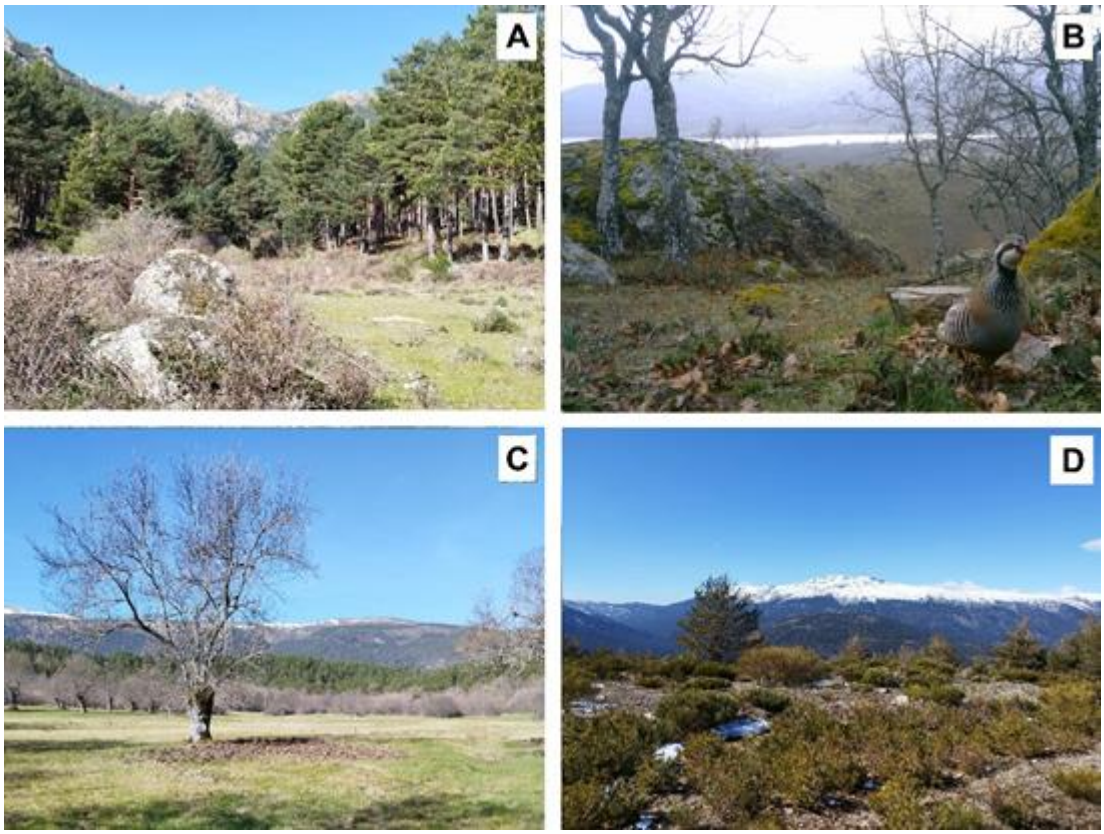

Figura 5. Principales unidades de vegetación sobre las que se ha desarrollado el estudio. (A) Pinares de montaña, (B) rebollares, (C) prados de fondo de valle y (D) matorrales y prados de altura.

Aun así, en muchos enclaves serranos se pueden encontrar individuos maduros que conservan en buenas condiciones la estructura de la comunidad, constituyendo ejemplos de los bosques originales.

Los matorrales y prados de altura son comunidades ampliamente extendidas por toda la sierra, en las zonas de cumbres y laderas altas, donde constituyen la vegetación principal entre los 1.800 y 2.200 m, inmediatamente por encima de los pinares. Constituye una formación muy densa y de gran cobertura, aunque el matorral no alcanza mucha altura, alrededor de un metro, debido al peso de la nieve y a la fuerza de los vientos, lo que le convierte en un hábitat idóneo para la perdiz roja (Fig. 5).

Las especies de matorral dominantes en esta comunidad son el piorno serrano y el enebro rastrero. En estas zonas de cumbre abundan también los pastizales psicroxerófilos, con comunidades dominadas por herbáceas perennes y de porte almohadillado, en la que domina la gramínea *Festuca curvifolia*.

Además de la variedad de condiciones originadas por el hombre, los robledales presentan distintas formas, desde las formaciones más puras hasta los bosques mixtos con otras frondosas y con el pinar, pasando por zonas adehesadas con fresno en los fondos del valle.

Figura. 6. Ejemplares de perdiz roja en zonas de cumbre del Parque Nacional y detalle de una captura en este hábitat con trampas de pisada.

Los prados de fondo de valle y dehesas de fresno (*Fraxinus augustifolia*), es un hábitat que se extiende por las rampas y grandes valles internos de la sierra, como la cabecera del Valle del Lozoya. Los prados están salpicados por otros árboles caducifolios como el olmo común (*Ulmus minor*), el álamo temblón (*Populus tremula*), el sauce negro y el roble melojo, con estratos arbustivo y herbáceo. En las zonas bajas se desarrollan prados de siega (*Arrhenatherion*), en algunas zonas adehesados con fresno (*Fraxinus angustifolia*) y con facies húmedas (*Calthion palustris*, *Juncion acutiflori*), y algunos prados de diente (*Cynosurion*). Estos prados presentan además orlas arbustivas con gran diversidad de especies (Fig. 5).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Recolección de muestras

Para la recolección de muestras en el campo se emplearon dos metodologías, capturas en vivo y recopilación de muestras no invasivas. Para las capturas en vivo, se aprovechó la época de celo a través de reclamos con trampas de pisada y redes (Fig. 6).

Figura. 7. Ejemplares de perdiz roja capturados vivos en el parque nacional de los que se obtuvieron muestras de plumas para su análisis genético.

Algunas de las muestras recopiladas fueron obtenidas de perdigones recién nacidos que fueron capturados a la carrera y liberados inmediatamente tras la recolección de una muestra de plumón (Fig. 7). Las muestras no invasivas consistieron en plumas encontrados principalmente en dormideros, para cuya localización fue necesario un trabajo previo de detección de ejemplares. La mayoría de las plumas fueron recogidas en otoño durante la época de muda. Algunas muestras de músculo proveniente de perdices cazadas fueron conseguidas gracias a la colaboración de las sociedades de cazadores.

Figura 8. Aplicación para el estudio de la perdiz roja diseñada sobre el software libre "Cybertracker" y detalle de algunos formularios específicos para el estudio.

Para la recopilación de los datos de campo se utilizaron dispositivos móviles con el software libre Cybertracker 3.4. (Fig. 8) en el que se instaló la aplicación de muestreo con todos los formularios necesarios para la recopilación de los datos antes descritos. Toda la información de las muestras recopiladas en campo era sincronizada en tiempo real con la base de datos del CISE.

4.2. Extracción del ADN

Las muestras de las que extraer ADN consistieron en plumas y músculo proveniente de plumas de dormideros, perdices cazadas y capturadas vivas. Las

plumas se conservaron sin más en sobres de papel a temperatura ambiente y las muestras de músculo fueron conservadas en etanol en el CISE hasta su envío al IREC. Tras la recepción de las muestras en el laboratorio, fueron congeladas a -82ºC hasta el momento de extraer el ADN. El ADN de las muestras se aisló utilizando el Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemania) conforme a las instrucciones del fabricante tras su llegada a las instalaciones del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Posteriormente, se procedió a la medición de la concentración y de la pureza de los ácidos nucleidos extraídos a través de un NanoDrop Microvolume Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA).

4.3. Secuenciación del genoma completo

Sobre la base de la lectura espectrofotométrica, se eligió una muestra para resecuenciar su genoma mapeándolo a la referencia GCA_947331505.1 (González-Prendes et al 2024) conjuntamente a una serie de otros genomas del género *Alectoris* en el marco de una colaboración con una serie de universidades extranjeras (que incluyen, entre otras, la Universidad Ashoka de Nueva Delhi, la Universidad Nacional de Singapur, la Universidad de Alcalá y la Universidad de Pisa) para reconstruir la filogenomica y la radiación adaptativa de este taxón. La preparación de la librería genómica de esta muestra se hizo (al igual que las otras) con el NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs) NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, USA) como en Gwee et al (2021). Una vez obtenido este primero genoma de perdiz roja de Guadarrama, se usó como referencia para las lecturas obtenidas mediante el protocolo rapture (Ali OA et al 2016). El procesado bioinformático utilizado fue lo indicado en Forcina et al (2021).

4.4. Marcadores moleculares y análisis filogenético para detectar introgresión

Para detectar hibridación se ha buscado introgresión de perdiz turca mediante el genotipado de 32 marcadores diagnósticos que presentan polimorfismos fijados de

forma diferente en ambas especies. 25 marcadores están publicados (Ferrero, 2016), aunque los cinco de tipo microsatélite no son usados por otros laboratorios (Fig. 9).

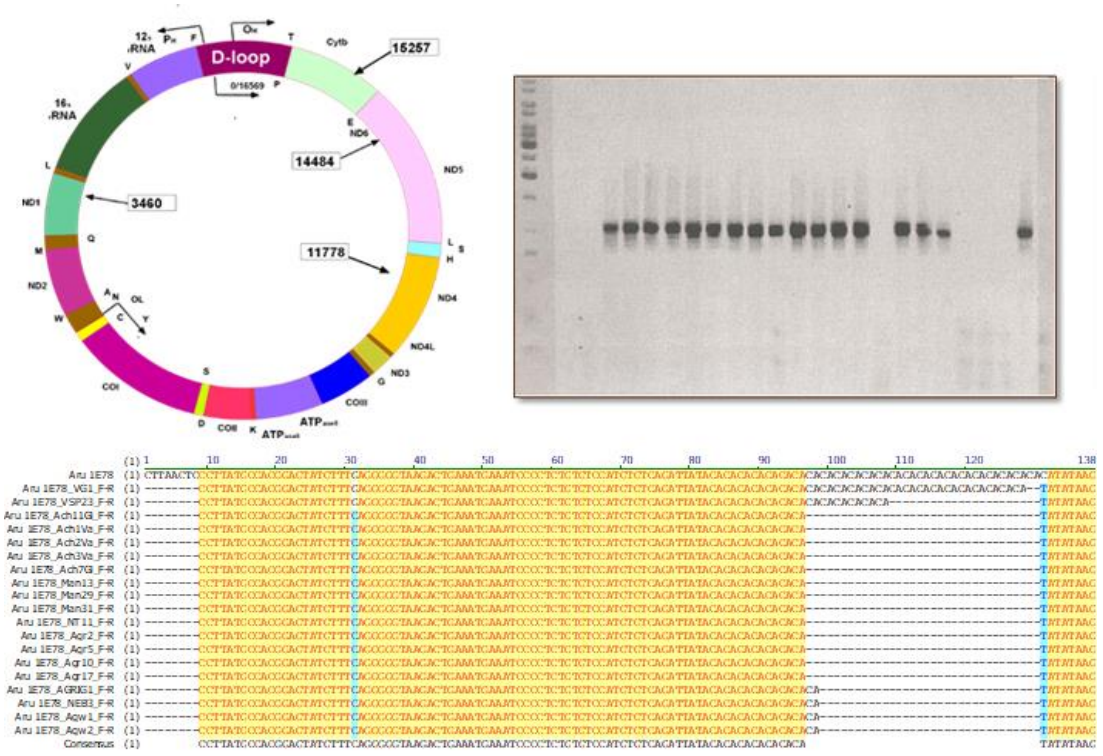

Figura 9. Detalle de la secuenciación de los marcadores diagnósticos de introgresión de *A. chukar* en *A. rufa* y gráfico de la estructura del ADN mitocondrial donde se observa la región citocromo b utilizada también como marcador de hibridación.

Siete marcadores no han sido publicados todavía. Adicionalmente, hemos resecuenciado el genoma completo de un individuo elegido al azar y lo hemos comparado con el genoma de las siete especies del género *Alectoris*. Los marcadores diagnósticos fueron polimorfismos de un solo nucleótido, revelados mediante SNaPshot, y microsatélites e inserciones con rangos de tamaños diferentes en ambas especies. Todos los polimorfismos se resolvieron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems-Hitachi).

4.5. Mapa de densidades Kernel

Se realizó un mapa de densidad Kernel para diferenciar las áreas con mayor concentración de muestras híbridas. La densidad del Kernel se calcula cuantificando

las relaciones de puntos dentro de un radio de influencia mediante el análisis de patrones de un conjunto de datos específico. El lugar de los sucesos se registra mediante un sistema de coordenadas que permite realizar un conteo de todos los puntos dentro de una región de influencia ponderados por la distancia de cada uno al lugar de interés.

La densidad del Kernel se basa en dos parámetros definitorios: el radio de influencia (R) y la función de estimación (k). El radio de influencia se define como el área centrada en el punto de estimación u que indica cuántos eventos contribuyen a la estimación de la función de intensidad λ. La función de estimación (k) se encarga de las propiedades para suavizar la densidad calculada por la técnica de Kernel y se calcula mediante la fórmula: $\lambda(P)\sum_{i=1}^{n}\frac{1}{R^2}k\frac{(P-Pi)}{R}$ donde k es una función Kernel bivariada y simétrica llamada función de estimación o suavizado y el parámetro R > 0 se conoce como ancho de la banda (o radio de influencia) y determina el grado de suavizado. Este es el radio de un disco centrado en P (P representa cualquier ubicación en R), donde Pi contribuirá significativamente (Câmara y Carvalho, 2004; Kawamoto 2012, Rizzati et al., 2020).

5. RESULTADOS

5.1. Secuenciación del genoma completo

El tamaño del genoma ensamblado es de 1,19 GB, es altamente contiguo y contiene el 97,06 % de los genes centrales aviares completos. En general, la calidad de este ensamblaje genómico es equivalente a la disponible para otros parientes cercanos, como la codorniz japonesa o la gallina.

La heterocigosidad genómica general de 0,0022 y no se observaron grandes islas de homocigosidad. En total, se identificaron 21.589 genes codificantes de proteínas que se asignaron a 16.772 ortólogos. De éstos, 201 resultaron ser exclusivos de *Alectoris*. Este genoma será útil para estudios filogenéticos, incluyendo la

determinación de posibles subespecies de *A. rufa* y la posible singularidad de las perdices de las zonas altas de Guadarrama o su adaptación a altura, así como implicaciones para la gestión y conservación de esta especie en general.

5.2. Evaluación de la introgresión genética con *Alectoris chukar*

Durante el desarrollo del estudio se analizaron 181 muestras de perdiz roja (tabla 1), 100 muestras del parque nacional y 81 de la ZPP (Fig. 10). Del total de las muestras analizadas se encontraron marcadores compatibles con hibridación con *A. chukar* en 8 ejemplares, por lo que el porcentaje de hibridación encontrado fue del 4,4%.

Tabla 1. Frecuencia de aparición de ejemplares con marcadores de hibridación en las muestras de perdiz roja del PN y ZPP analizadas durante el estudio.

Municipios	Híbridas PNG	Híbridas ZPP	Puras PNG	Puras ZPP	Nº de muestras/ municipio
Alameda del Valle		1	2		3
Becerril de la Sierra			23		23
Cercedilla		2	3	7	12
El Boalo			1	1	2
La Losa				6	6
Lozoya		2	1	25	28
Manzanares el Real	1		29	10	40
Miraflores de la Sierra				2	2
Navacerrada		2		16	18
Otero de Herreros				3	3
Palazuelos de Eresma			2		2
Pinilla del Valle			1		1
Rascafría			35	4	39
Sotosalbos			1		1
Torrecaballeros			1		1
Total general	**1**	**7**	**99**	**74**	**181**

En el Parque Nacional, tan solo 1 ejemplar mostró marcadores compatibles con perdiz chukar, por lo que el porcentaje de hibridación se situó en el 1%, con una única muestra híbrida recogida en la zona de El Jaralón, a escasos metros del límite de la ZPP. Por su parte, la ZPP mostró un 8,6% de frecuencia de hibridación, con 7 muestras en las que se detectaron marcadores compatibles con hibridación. Estas muestras pertenecían a los cotos privados de caza de Monte Pinar (M-10852) en el municipio de

Cercedilla, La Barranca (M-10885) en Navacerrada, Alameda II (M-10971) en Alameda del Valle y Lozoya del Valle (M-10816) en Lozoya.

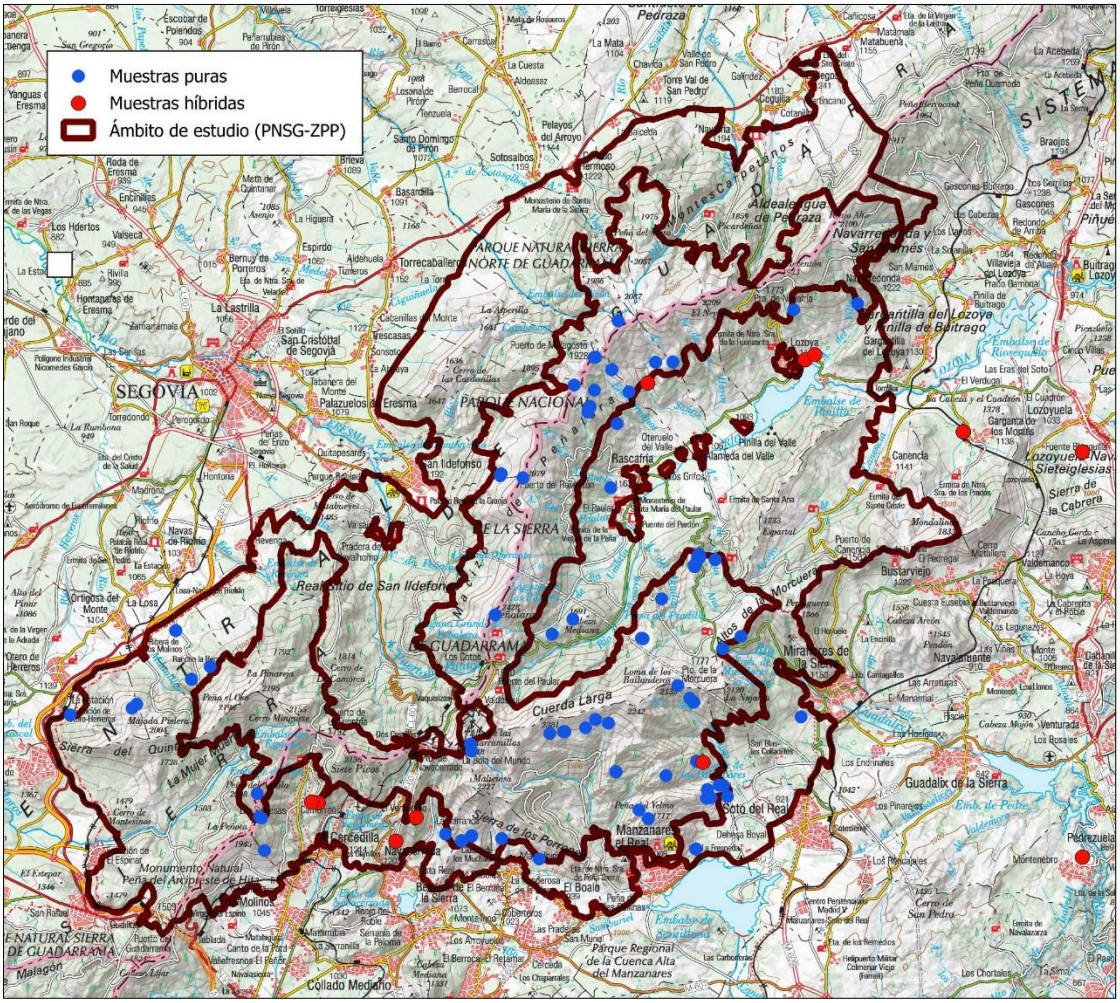

Figura 10. Ubicación de las 181 muestras recogidas en el ámbito de estudio. Los puntos azules señalan las muestras puras y los rojos las muestras con marcadores compatibles con hibridación con A. chukar.

6. DISCUSIÓN

Durante siglos, las montañas mediterráneas como la sierra de Guadarrama han servido de refugio a numerosas especies de vertebrados frente al acoso del hombre que las ha eliminado de enclaves más llanos y accesibles. Actualmente, las poblaciones de perdiz roja son un fiel reflejo de esta situación, manteniendo en Guadarrama poblaciones acantonadas en las zonas de cumbre, ajenas a las principales amenazas

que están poniendo en peligro a la especie en nuestro país. El parque nacional de momento se ha centrado en atajar el problema de la hibridación genética, ya que las otras amenazas derivadas principalmente de los usos agrícolas y cinegéticos, afortunadamente quedan lejos de los límites de este espacio protegido.

Las repoblaciones con perdiz de granja en toda España, han provocado una situación límite en las poblaciones salvajes de perdiz roja, víctimas de la introgresión genética con altos niveles de hibridación de perdiz turca, cuyas sueltas se producen a millones durante la temporada cinegética, con una evolución geográfica que aumenta progresivamente cada año y con unos intereses económicos enormes que hacen que las evidencias científicas se diluyan en el entramado burocrático de la gestión cinegética.

Los resultados mostrados en este estudio, en los que se ha combinado el análisis del peligro de hibridación a largo plazo con el reciente análisis genómico completo, dibujan un panorama complejo, aunque esperanzador, sobre la conservación de la perdiz roja en la Sierra de Guadarrama. La secuenciación del genoma completo de un ejemplar puro de las zonas altas del Parque Nacional ha revelado datos de extraordinario valor para comprender la singularidad genética de estas poblaciones, siendo la primera vez que se realiza sobre un ejemplar puro de perdiz roja. Con un tamaño ensamblado de 1.19 GB y la presencia del 97.06% de los genes aviares completos, este genoma de referencia no solo confirma la ausencia de introgresión con *A. chukar* en las cumbres del parque nacional, sino que proporciona por primera vez una herramienta objetiva para evaluar con precisión sin precedentes el grado de pureza genética en otras poblaciones. La heterocigosidad observada (0.0022) en el genoma es elevada comparada con la de otras especies de aves (Kolchanova et al., 2019). Este resultado, junto con la ausencia de regiones de homocigosidad continua, es sorprendente si tenemos en cuenta que se trata de una perdiz de una población aislada, pequeña y donde cabría esperar señales genómicas de cuellos de botella demográficos y endogamia.

El genoma de un ejemplar libre de introgresión es esencial para investigaciones futuras sobre la historia evolutiva de *A. rufa* y permitirá comprender sus adaptaciones ecológicas, incluyendo sus respuestas ante el cambio climático. Como genoma de referencia, aumentará el poder de los análisis de hibridación introgresiva, permitiendo su estudio en individuos y no sólo en poblaciones. Este genoma facilitará estudios sobre las respuestas adaptativas de poblaciones en entornos cambiantes y sobre las características genómicas en relación con presiones selectivas locales y tendencias demográficas.

Estos hallazgos genómicos transforman nuestra comprensión del valor conservacionista de estas poblaciones: ya no se trata simplemente de ejemplares libres de hibridación, sino de linajes con adaptaciones potencialmente únicas desarrolladas durante milenios de aislamiento en ambientes montanos. Este aspecto adquiere especial relevancia ante el panorama actual de la especie, ya que dichas adaptaciones podrían ser cruciales para la persistencia de la especie en escenarios de extinción en las zonas no montañosas.

Sin embargo, el genoma también proporciona una base científica inquietante para evaluar los riesgos de hibridación. La comparación con secuencias de *A. chukar* llevados a cabo en el IREC ha permitido identificar marcadores diagnósticos ultraespecíficos que, aplicados a nuestro trabajo de campo, han confirmado la presencia de introgresión en zonas de piedemonte de la ZPP en el 8,6% de las 81 muestras analizadas. Las distribuciones de *A. chukar* y *A. rufa* están muy distantes geográficamente (Fig. 1) y el contacto natural en el pasado parece improbable, por lo que la causa es exclusivamente de origen antrópico. Los datos de este tipo de introgresiones han ocurrido desde mediados de la década de 1980, cuando la suelta de ejemplares de granja en los cotos de caza aumentó exponencialmente (Blanco-Aguiar et al., 2008).

Estos híbridos, procedentes de las sueltas de granja de los cotos de caza, representan una amenaza latente para la integridad genética de las poblaciones del Parque Nacional. La paradoja es evidente: mientras las cumbres del parque nacional conservan un linaje genético único y valioso, las zonas bajas de la Zona Periférica de Protección (ZPP) muestran una creciente infiltración de genes alóctonos, con focos detectados en seis municipios diferentes desde 2017. Esta situación expone las limitaciones del actual marco de protección y la urgente necesidad de respetar la prohibición de las sueltas en los cotos de caza del ámbito de la ZPP.

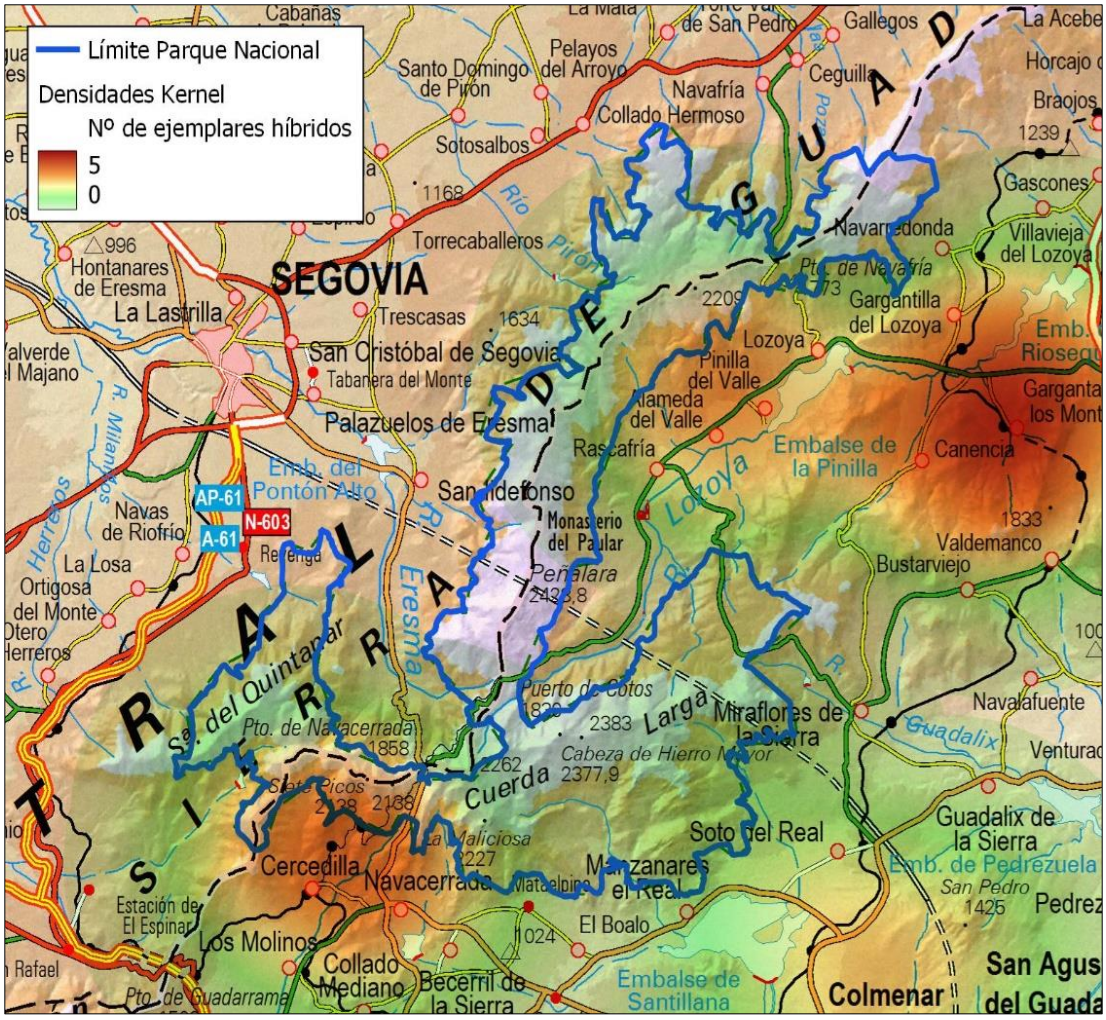

Figura 11. Mapa de densidades Kernel con las zonas con mayor y menor número de ejemplares híbridos detectados en el ámbito de estudio.

La resistencia mostrada por las poblaciones de las cumbres del parque nacional frente a la hibridación podría explicarse por múltiples factores. Por un lado, las condiciones ambientales extremas (mayor altitud, inviernos más rigurosos) podrían actuar como filtro ecológico contra los ejemplares híbridos criados en granjas, menos adaptados a estos entornos. Por otro, la hibridación con perdiz chukar podría estar influyendo en patrones de dispersión diferenciales con respecto a las poblaciones puras, que ya ha sido detectado por los propios cazadores, como por ejemplo, en el comportamiento durante la época de celo, donde las híbridas evitan entrar a los reclamos de machos perdiz roja.

No obstante, es necesario mantener de manera estricta las mencionadas prohibiciones, ya que estos mecanismos de aislamiento podrían debilitarse progresivamente debido al calentamiento global, como sugieren los datos de seguimiento a largo plazo que muestran un lento pero constante ascenso altitudinal de los híbridos, como los encontrados en El Jaralón o en Las Navazuelas en el límite del parque nacional (Fig. 10). Además, se han recopilado por parte del IREC, muestras con hibridación en municipios cercanos a la ZPP en Garganta de los Montes y Colmenar Viejo. En la figura 11 el mapa de densidad del Kernel, se muestra esta amenaza con la presencia de hibridación dentro de un radio de influencia mediante el análisis de patrones en la distribución de las muestras en el que se intuye la tendencia de la hibridación y las zonas cercanas al parque nacional con mayor riesgo. Hay que insistir por lo tanto desde una perspectiva de gestión, que los resultados genómicos refuerzan la necesidad de prohibir de manera inexcusable cualquier tipo de suelta en el ámbito de la ZPP. La designación de las cumbres del Parque Nacional como reservorio genético de perdiz pura, se justifica no solo por la pureza de sus poblaciones, sino por el valor adaptativo de su acervo genético único.

La disminución de las poblaciones ibéricas de *A. rufa* y el deseo de mantener poblaciones abundantes para su caza, han creado durante estas décadas una demanda de perdices en los cotos de caza que han generado el aumento de granjas cinegéticas.

Aunque el uso de perdices híbridas está prohibido por la legislación española desde 1975, la gran demanda desde la actividad cinegética puede haber potenciado el uso ilegal de híbridos como forma de reducir los costes de producción. Los intentos por criar *A. rufa* en cautividad no han sido rentables y la consecuencia ha sido la hibridación con *A. chukar*, ya que estas perdices híbridas tienen nidadas más grandes y el manejo y la cría es más fácil (Padrós, 1991). De hecho, *A. chukar* se ha utilizado durante mucho tiempo en la producción de carne, y es probable que esta especie haya sido seleccionada para la hibridación con *A. rufa* por los criadores de caza, porque su comportamiento y productividad en cautiverio es mejor que el de *A. graeca* (Blanco-Aguilar et al., 2008).

La función de la ZPP según la ley 5/2007 de Parques Nacionales, debe estar destinada a proyectar los valores del parque nacional en su entorno y a amortiguar los impactos ecológicos o paisajísticos procedentes del exterior sobre el interior del parque. El caso de la introgresión genética de la perdiz roja es un ejemplo claro de cómo debería funcionar esta zona con respecto a este tipo de riesgos. No se pueden consentir bajo ningún concepto, repoblaciones con perdiz de granja en los cotos privados de este ámbito, como han venido ocurriendo desde la década de los años 80.

Los resultados expresados en este informe caracterizan a las poblaciones del parque nacional como uno de los relictos tremendamente valiosos de perdiz roja pura en la Península Ibérica. No se han descrito poblaciones de perdices rojas libres de hibridación en toda su área de distribución, aunque en el IREC está estudiando algunas poblaciones en Navarra, sierra de Gredos, Sierra Nevada, montañas de la Comunidad Valenciana o en el Parque Nacional de Monfragüe que podrían mantener poblaciones puras. Las poblaciones de Guadarrama serían las únicas donde se ha secuenciado el genoma completo de una perdiz roja pura, por lo que aumentaría su valor también desde una perspectiva filogeográfica, conservando el clúster genético del ecotipo de perdiz roja de la zona centro oriental de la Península Ibérica (Ferrero et al., 2011).

Por lo tanto, como medida de gestión prioritaria, se deberían prohibir todas las sueltas y repoblaciones en todo el ámbito de la ZPP del parque nacional. En el resto de la Comunidad de Madrid sería aconsejable, ya que actualmente no existe ningún protocolo que garantice la pureza genética de las perdices utilizadas en las sueltas. Además, como se ha reflejado en este informe, con las repoblaciones se genera un enorme riesgo de transmisión de enfermedades y pérdida del acervo genético propio de las perdices de la zona centro oriental de la Península Ibérica.

6.1. Recomendaciones para futuros estudios

La ausencia de hibridación hace pensar que las perdices de las zonas altas del parque constituyen una población relicta que ha mantenido sus características genéticas inalteradas. Además, algunas de las perdices observadas en zonas de cumbre presentan manchas blancas poco habituales en otras poblaciones y que podrían constituir o bien un ecotipo de zonas altas o un indicio de deriva genética (Fig. 5). Sería adecuado continuar los estudios genéticos de la población de la Sierra de Guadarrama con la aplicación de las tecnologías RADseq en este estudio (Ali OA et al., 2016), profundizaría en la estructura genética y el flujo génico de las poblaciones de la Sierra de Guadarrama con tres objetivos principales: (1) evaluar con alta resolución el grado de introgresión de *A. chukar* en las poblaciones del piedemonte; (2) identificar posibles patrones de diferenciación genética entre las poblaciones puras de cumbre y aquellas de zonas bajas donde se han detectado híbridos, lo que permitirá delimitar áreas críticas para la conservación; y (3) detectar señales de selección natural en regiones genómicas asociadas a adaptaciones locales, como la altitud o el clima, utilizando el genoma de referencia como base para la anotación funcional. Este enfoque, al combinar miles de marcadores genómicos distribuidos uniformemente, proporcionará una visión sin precedentes de la diversidad, conectividad y resiliencia genética de estas poblaciones, esencial para diseñar estrategias de gestión que preserven su integridad frente a las presiones cinegéticas y el cambio climático.

7. REFERENCIAS

Ali OA, O'Rourke SM, Amish SJ, Meek MH, Luikart G, Jeffres C, Miller MR. RAD Capture (Rapture): Flexible and Efficient Sequence-Based Genotyping. Genetics. 2016 Feb;202(2):389-400. doi: 10.1534/genetics.115.183665. Epub 2015 Dec 29.

Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. Trends Ecol Evol 16:613–622.

Barbanera, F., Guerrini, M., Khan, A. A., Panayides, P., Hadjigerou, P., Sokos, C., Gombobaatar, S., Samadi, S., Khan, B. Y., Tofanelli, S., Paoli, G., Dini, F. (2009). Human-mediated introgression of exotic chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) genes from East Asia into native Mediterranean partridges. *Biological Invasions* 11: 333-348.

Birdlife International (2004). Birds in the European Union: a status assessment. Birdlife International, Wageningen.

Blanco-Aguiar, J. A., González-Jara, P., Ferrero, M. E., Sánchez-Barbudo, I., Virgós, E., Villafuerte, R., Dávila, J. A. (2008). Assessment of game restocking contributions to anthropogenic hybridization: the case of the Iberian red-legged partridge. *Animal Conservation,* 11: 631-633.

Câmara, G.; Carvalho, M. S. Análise de eventos pontuais. In: Druck, S.; Carvalho, M.S.; Câmara, G.; Monteiro, A.V.M. Análise Espacial de Dados Geográficos. Brasília, Embrapa, 2004.

Chattopadhyay B, Forcina G, Garg KM, Irestedt M, Guerrini M, Barbanera F, Rheindt FE. Novel genome reveals susceptibility of popular gamebird, the red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Phasianidae), to climate change. Genomics. 2021 Sep;113(5):3430-3438. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.08.010. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34400239.

Del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J. (1994). Handbook of the birds of the world, vol II. Lynx Ed, Barcelona.

Duarte, J. (1998). La perdiz roja (*Alectoris rufa*) en el olivar: métodos de estimación demográfica. Tesina. Universidad de Málaga.

Ferrero, M. E., Blanco-Aguiar, J. A., Lougheed, S. C., Sánchez-Barbudo, I., De Nova, P. J., Villafuerte, R., & Davila, J. A. (2011). Phylogeography and genetic structure of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*): more evidence for refugia within the Iberian glacial refugium. Molecular Ecology, 20(12), 2628-2642.

Ferrero, M.E. (2016). Desarrollo y aplicación de marcadores genéticos para el estudio y gestión de la perdiz roja (*Alectoris rufa*). Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha, España.

Forcina G, Tang Q, Cros E, Guerrini M, Rheindt FE, Barbanera F. Genome-wide markers redeem the lost identity of a heavily managed gamebird. Proc Biol Sci. 2021 Mar 31;288(1947):20210285. doi: 10.1098/rspb.2021.0285. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33757344; PMCID: PMC8059960.

González-Prendes R, Pena RN, Richart C, Nadal J, Ros-Freixedes R. Long-read de novo assembly of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) genome. Sci Data. 2024 Aug 22;11(1):908. doi: 10.1038/s41597-024-03659-5. PMID: 39191744; PMCID: PMC11349902.

Grant P.R., Grant R., Markert J.A., Keller L.F., Petren K. (2004). Convergent evolution of Darwin's finches caused by introgressive hybridization and selection. Evolution 58(7): 1588–1599.

Gwee CY, Lee QL, Mahood SP, Hung Le Manh, Tizard R, Eiamampai K, Round PD, Rheindt FE. (2021). The interplay of colour and bioacoustic traits in the differentiation of a Southeast Asian songbird complex. Mol Ecol. 2021 Jan;30(1):297-309. doi: 10.1111/mec.15718. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33135269.

Kawamoto, M. T. Análise de técnicas de distribuição espacial com padrões pontuais e aplicação a dados de acidentes de trânsito e a dados de dengue de Rio Claro–SP. 69 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu: Botucatu, SP, 2012.

Kolchanova S, Kliver S, Komissarov A, Dobrinin P, Tamazian G, Grigorev K, Wolfsberger WW, Majeske AJ, Velez-Valentin J, Valentin de la Rosa R, Paul-Murphy JR, Guzman DS, Court MH, Rodriguez-Flores JL, Martínez-Cruzado JC, Oleksyk TK. (2019). Genomes of three closely related Caribbean amazons provide insight for species history and conservation. Genes (Basel). 16;10(1):54.

McCarthy E.M. (2006). Handbook of avian hybrids of the world. Oxford University Press, New York.

Padrós, J. (1991). Situación actual del sector. Presente y Futuro. In La Perdiz Roja: 7–10. Barcelona: Fundación la Caixa, AEDOS.

Rizzatti, M., Batista, N. L., Spode, P. L. C., Erthal, D. B., de Faria, R. M., Scotti, A. A. V., ... &

Quoos, J. H. (2020). Mapeamento da COVID-19 por meio da densidade de Kernel. Metodologias e Aprendizado, 3, 44-53.

Villanúa, D., Pérez-Rodríguez, L., Casas, F., Alzaga, V., Acevedo, P., Viñuela, J., & Gortázar, C. (2008). Sanitary risks of red-legged partridge releases: introduction of parasites. European Journal of Wildlife Research, 54, 199-204.