

# COEVOLUCIÓN DE LOS VIRUS DE LA MIXOMATOSIS Y DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA CON EL CONEJO (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS* L., 1758) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

FERNANDO ALDA<sup>1</sup>, TANIA GAITERO<sup>1,2</sup>, LOURDES ALCARAZ<sup>1</sup>, RAFAEL ZARDOYA<sup>1</sup>,  
IGNACIO DOADRIO<sup>1</sup> Y MÓNICA SUÁREZ<sup>2</sup>

## RESUMEN

El conejo (*Oryctolagus cuniculus* L., 1758) es un endemismo de la Península Ibérica y una especie clave del ecosistema mediterráneo. Durante las últimas décadas las poblaciones de conejo de la Península Ibérica han sufrido un grave declive debido a dos enfermedades: la mixomatosis y posteriormente la enfermedad vírica hemorrágica. En la actualidad, existen proyectos de recuperación y potenciación de las poblaciones naturales de conejo en zonas protegidas (por ejemplo, el Parque Nacional de Cabañeros y la Finca Estatal de Lugar Nuevo) basados en la repoblación a partir de poblaciones donantes. Sin embargo, estas reintroducciones no tienen en cuenta ni el genotipo de los conejos ni el de los virus asociados. En este trabajo, se investigó la variabilidad y estructura genética en las poblaciones donantes de conejos para la repoblación del Parque Nacional de Cabañeros y la Finca Estatal de Lugar Nuevo, así como en otras poblaciones de conejo para 11 *loci* microsatélites y el gen mitocondrial citocromo b, así como en los virus de la mixomatosis y de la enfermedad hemorrágica. La combinación de los datos genéticos de conejos y virus permite determinar si la existencia de individuos resistentes a estas enfermedades es debida a la singularidad genética de los propios conejos o de los virus que portan. La variabilidad genética del virus de la mixomatosis fue muy baja, mientras que el virus de la enfermedad hemorrágica presentó una variabilidad mucho mayor. Ninguno de los dos virus presentó una estructura genética clara, pero en las comparaciones a pares sí se detectaron poblaciones con tipos de virus significativamente diferenciados. Las poblaciones de conejo estudiadas mostraron una diferenciación genética significativa, directamente relacionada con la distancia geográfica entre ellas. Según los datos obtenidos, el genotipo de los conejos no está correlacionado con la probabilidad de padecer ninguna de las dos enfermedades, ni con ser infectado por un determinado tipo de virus.

**Palabras clave:** coevolución, conejo, enfermedad hemorrágica, mixomatosis, *Oryctolagus cuniculus*.

## SUMMARY

The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L., 1758) is an Iberian endemism and a key species in the Mediterranean ecosystem. For the last decades, the rabbits from the Iberian Peninsula have been suffering a severe reduction in their populations because of two diseases: myxomatosis and secondly rabbit hemorrhagic disease. At present, there are recovery plans for natural rabbit populations inhabiting

<sup>1</sup>Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2; 28006 Madrid

<sup>2</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Avda. Puerta de Hierro, s/ n; 28040 Madrid

protected areas, such as the Parque Nacional de Cabañeros, which are based on repopulations from donor populations. However, these reintroductions do not take into account the genotypes of the rabbits or of their associated viruses. In this study, we investigated the genetic structure and variability in the populations that donate rabbits for the Parque Nacional de Cabañeros and the Finca Estatal de Lugar Nuevo, as well as in other populations, based on 11 microsatellite *loci* and the mitochondrial cytochrome b gene, and the myxoma virus and rabbit hemorrhagic disease virus. The genetic information of both rabbits and viruses allows us to determine if the resistance of individuals to these diseases is due to the genetic characteristics of the rabbits or that of the infecting virus. The genetic variability of the myxoma virus was very low. On the other hand the variability of the rabbit hemorrhagic disease virus was much higher. None of the virus studied showed a clear genetic structure, but we did find populations with significantly differentiated virus haplotypes. We found a significant genetic structure among the studied rabbit populations, which was highly correlated with their geographic distance. According to our data, neither the probability of suffering any of the two diseases, nor the probability of being infected with a certain type of virus, is related with the individual's genotype.

**Key Words:** coevolution, European rabbit, rabbit hemorrhagic disease, myxomatosis, *Oryctolagus cuniculus*.

## INTRODUCCIÓN

El conejo (*Oryctolagus cuniculus* L., 1758) es una especie originariamente endémica de la Península Ibérica y sur de Francia. Su perfecta adaptación al ecosistema mediterráneo unida a una alta tasa de reproducción (SORIGUER 1981) favoreció hasta hace pocos años el mantenimiento de grandes poblaciones de este lagomorfo en la Península Ibérica. Estudios filogenéticos de los conejos ibéricos basados en el análisis de genes mitocondriales han podido determinar la existencia de dos grupos filogenéticos bien diferenciados dentro de la Península Ibérica que se denominaron A y B, respectivamente (BRANCO *et al.* 2000). El grupo A se distribuye en el suroeste de la Península Ibérica mientras que el grupo B aparece en el resto de la Península.

La divergencia entre estos dos grupos se debió originar durante las glaciaciones del Pleistoceno, cuando los animales quedaron probablemente aislados en dos refugios, a partir de los cuales se han extendido. Además, los conejos del grupo A son ligeramente más pequeños que los del grupo B, lo que ha permitido describir dos subespecies *Oryctolagus cuniculus algirus* (Loche, 1858) y *Oryctolagus cuniculus cuniculus* (L., 1758), respectivamente (VILLAFUERTE 2002). Hasta la Edad Media la distribución natural del conejo estaba limitada a la Península Ibérica y al sur de Francia (CALLOU 1995). El hombre introdujo el conejo de

tipo B por toda Europa y de ahí al resto del mundo, dando lugar a las razas domésticas.

Dos enfermedades han disminuido los efectivos del conejo en la Península Ibérica, la mixomatosis que apareció a principios de los años 1960 y redujo hasta en un 90% las poblaciones de conejo (BARCENA *et al.* 2000) y la enfermedad hemorrágica del conejo que a finales de los años 1980 produjo una nueva mortandad de alrededor del 60% de la población peninsular (ARGÜELLO *et al.* 1998).

El virus de la mixomatosis (MV) pertenece a la familia *Poxviridae* y tiene como material genético ADN bicatenario. Las cepas del virus de la mixomatosis existentes en la Península Ibérica proceden de una cepa original denominada Lausanne (BARCENA *et al.* 2000). La enfermedad suele ocasionar unas lesiones típicas llamadas mixomas, tanto en el punto de inoculación del virus como en los párpados, el mentón y la zona genital. La muerte se produce según la virulencia de la cepa, entre 9 y 35 días post-infección (FENNER 1983). Los brotes de esta enfermedad son estacionales, siendo más frecuentes durante los meses templados. Generalmente los conejos jóvenes son más susceptibles a la enfermedad. La mixomatosis induce una respuesta inmune con anticuerpos que persisten durante bastante tiempo, protegiendo a los conejos de nuevas infecciones. Las hembras gestantes inmunizadas transfieren anticuerpos a sus crías.

El virus de la enfermedad vírica hemorrágica (RHDV) tiene un genoma ARN de cadena simple y pertenece a la familia *Caliciviridae*. El virus infecta a los conejos por vía directa a través del aire o bien por transmisión oro-fecal y la enfermedad tiene un periodo de incubación de 48-72h. La viremia ocasiona un fallo orgánico múltiple con múltiples hemorragias, congestión y edema pulmonares y necrosis hepática (ARGÜELLO *et al* 1998). Aunque el primer caso constatado de virus de la fiebre hemorrágica altamente virulento se dio en China, las evidencias filogenéticas apoyan la existencia de varios focos simultáneos en diferentes lugares de Europa como origen de la enfermedad en este continente (FORRESTER *et al.* 2006).

El descenso de la población de conejos en la Península Ibérica conlleva un declive en las poblaciones de sus más de 40 depredadores habituales. Entre ellos destacan el lince ibérico (*Lynx pardinus*) y el águila imperial (*Aquila adalberti*), cuyo estado crítico se debe en gran medida a la disminución de esta presa clave (FERRER 2005; RODRÍGUEZ & DELIBES 1992). Además, el conejo es probablemente junto con la perdiz la especie cinegética más importante en España. Por todo ello, existen diversos proyectos de recuperación y potenciación de las poblaciones naturales de conejo, centrados en la mejora del hábitat mediante el aumento de la disponibilidad de alimento (MORENO & VILLAFUERTE 1995), la construcción de vivares adecuados y la repoblación a partir de poblaciones donantes. Sin embargo, no existe ningún estudio genético que establezca cómo puede afectar a la supervivencia del conejo la relación filogenética de las poblaciones donantes y receptoras, así como la variabilidad genética de las cepas de los virus de la mixomatosis y la enfermedad hemorrágica del conejo existentes en ambos tipos de poblaciones.

Con este propósito en el presente trabajo se investigó la variabilidad y estructura genética de las poblaciones de conejo donantes y receptoras utilizadas en los actuales planes de repoblación, así como la del MV y del RHDV que infectan a los conejos. El estudio está centrado en el Parque Nacional de Cabañeros y la Finca Estatal de Lugar Nuevo, donde las poblaciones naturales son

anualmente reforzadas con introducciones. Se trata de un trabajo que utiliza el método comparativo, y por ello para entender la estructura genética de los conejos y sus virus en estas zonas protegidas es necesario analizar muestras de toda la Península Ibérica con el fin de poder interpretar los resultados en su conjunto. Mediante la combinación de ambos tipos de estudios se pretende determinar si la existencia de individuos resistentes a estas enfermedades es debida a que son singulares desde el punto de vista genético o a que son portadores de cepas de virus menos virulentas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos propuestos se recogieron un total de 629 muestras de conejos procedentes de 18 poblaciones de la Península Ibérica en el transcurso de los años 2004-2006.

En las diferentes poblaciones analizadas se determinó si los conejos habían estado expuestos a los virus mediante análisis serológicos basados en la técnica de ELISA indirecto. Se pusieron a punto técnicas de amplificación por PCR del MV y del RHDV, y se detectó el tipo de cepa de la que eran portadores cada uno de los animales enfermos. En el caso del MV, se extrajo el ADN principalmente a partir de muestras de hisopos conjuntivales y la variabilidad genética se analizó en siete fragmentos del genoma viral ; NC\_001132; CAMERON *et al.* 1999). En el caso del RHDV, se extrajo el ARN a partir de muestras de pulmón y la variabilidad se analizó mediante PCR anidada.

Para todos los conejos analizados, tanto sanos como enfermos, se determinó mediante análisis de polimorfismo de longitud del ADN mitocondrial si pertenecían al grupo A o B. Para ello se amplificó el gen mitocondrial completo del citocromo *b* y se digirió por separado con dos enzimas de restricción *HaeIII* y *AluI* cuyos patrones de corte en geles de agarosa son diferentes para cada uno de los linajes mitocondriales (BRANCO *et al.* 2000). Además, para cada individuo se obtuvieron los genotipos de 11 microsatélites (MOUGEL *et al.* 1997; SURRIDGE *et al.* 1997).

Los datos de secuencia correspondientes a los virus y los de polimorfismo de longitud correspondientes a los conejos fueron analizados con métodos clásicos de genética de poblaciones e inferencia filogenética para determinar variabilidad y estructura genética. Una vez obtenidos los datos genéticos de los virus y de los conejos se testó si existía alguna diferencia entre las características genéticas de los conejos sanos y de los enfermos, así como la posible relación entre los valores de diferenciación genética de los virus y de los hospedadores. Para ello, se realizaron dos tipos de análisis factoriales de correspondencias (FCA). En el primero de ellos se analizó, para cada virus y cada población, si existe una asociación significativa entre el genotipo de los conejos y su estado sanitario (sano o enfermo). En el segundo se analizó, para cada virus, si existe una asociación significativa entre los genotipos de los conejos analizados y el haplotipo de virus que les infectaba. También se testó si existía relación entre los haplotipos virales y los mitocondriales.

## RESULTADOS

### Muestras

Las poblaciones muestreadas cubren gran parte de España e incluyen regiones típicas de conejos tanto del grupo A como del grupo B, así como particularmente regiones de contacto de ambos tipos mitocondriales. En total se obtuvieron muestras de 19 localidades:

1. Lérida (L'Urgell y La Segarra).
2. La Rioja (Logroño)
3. Valladolid (cuena del río Eresma y río Cega)
4. Madrid 1 (Colmenar del Arroyo, Navalagamella y Quijorna)
5. Madrid 2 (Ajalvir)
6. Toledo 1 (Toledo, Bargas y Mocejón)
7. Toledo 2 (Argés)
8. Ciudad Real 1 (Santa Cruz de Mudela)
9. Ciudad Real 2 (Torre de Juan Abad)
10. Ciudad Real 3 (Almodóvar del Campo y Brazatortas)
11. Albacete

12. Jaén 1 (Andújar)
13. Jaén 2 (Vilches)
14. Cáceres 1 (Valencia de Alcántara)
15. Cáceres 2 (Cáceres)
16. Cádiz (Medina Sidonia)
17. Valencia (Vall d'Albadia y Buñol)
18. Baleares (Mallorca)
19. Galicia (Lugo, esta población sólo se incluyó en los análisis del MV)

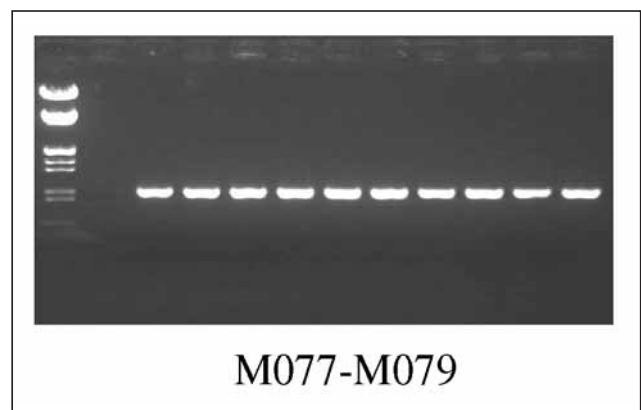
Durante el periodo de este estudio, las poblaciones de Toledo 1, Toledo 2 y Cádiz fueron donantes de conejos, mientras que la población de Ciudad Real 1 fue receptora de conejos.

### Serología

Los resultados de las serologías (ELISA) indicaron una alta prevalencia de animales positivos (con un elevado número de anticuerpos). Puesto que las pruebas de serología solamente se pueden hacer a partir de animales vivos, no todas las poblaciones pudieron ser analizadas. Se observaron diferencias notables en el número de positivos de MV en las poblaciones estudiadas: Toledo 1 (100%), Ciudad Real 1 (80%) y Cádiz (30%). En el caso del RHDV, los porcentajes de positivos en las poblaciones analizadas son en general menores: Toledo 1 (62%), Ciudad Real 1 (60%) y Cádiz (44%).

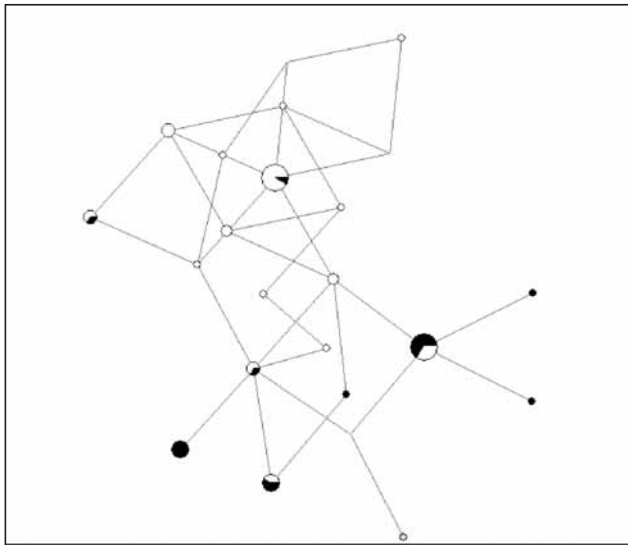
### Mixomatosis

Se analizaron siete fragmentos que abarcaban 23 genes del MV con un total de 7681pb. Se detectó amplificación positiva (Figura 1) de los siete frag-



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de un fragmento del genoma del MV.

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of one of the PCR-amplified fragments of the MV genome.



**Figura 2.** Red de haplotipos de MV. En blanco se muestran los conejos infectados tipo A y en negro los de tipo B. En gris se representa el MV de la cepa Lausanne.

**Figure 2.** Network of MV haplotypes. White denotes that infected rabbits belong to type A and black to type B. The size of each circle is proportional to the frequency of its haplotype. The Lausanne MV strain is indicated in grey.

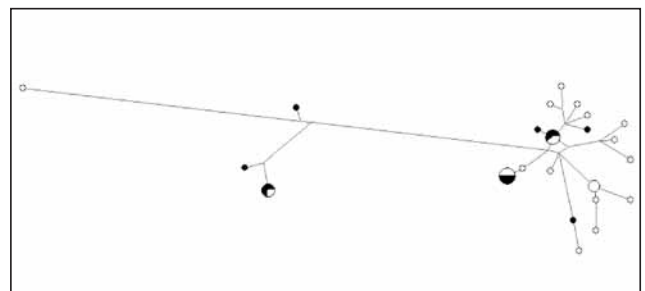
mentos en 80 individuos distribuidos en ocho de las poblaciones analizadas. Las secuencias obtenidas resultaron estar bastante conservadas a nivel inter- e intrapoblacional y muy similares a la cepa Lausanne (se diferenciaban de ésta entre 1 y 5 nucleótidos). Las 80 secuencias de virus analizadas dieron lugar a un total de 24 haplotipos diferentes de virus. La población que más diversidad de tipos de virus presentó fue Jaén, en la que las cuatro muestras resultaron ser haplotipos diferentes (dos de ellos también presentes en Ciudad Real 3), seguida de Ciudad Real 3 con 16 haplotipos diferentes de virus.

Se obtuvieron valores significativos de diferenciación genética (estadístico  $F_{ST}$ ; sólo para las comparaciones de Ciudad Real 3 con el resto de poblaciones españolas, Albacete con Madrid 2, Toledo 1 y Galicia, así como la comparación de Toledo 1 y Baleares. En los análisis demográficos se obtuvieron valores significativos del estadístico  $F$  de Fu (FU 1997), lo que sugiere que las poblaciones del MV están en expansión. Tanto la red de haplotipos como el árbol de NJ (SAITOV&NEI 1987) obtenido con distancias corregidas con el modelo de Tamura-Nei (TAMURA&NEI 1993) apenas mostraron resolución (Figura 2)

## Enfermedad Vírica Hemorrágica del Conejo

Se consiguió amplificar un fragmento de 573pb del RHDV de 37 individuos procedentes de siete poblaciones. La variabilidad encontrada en este virus fue más alta que para el MV. En total se encontraron 16 haplotipos distintos para el RHDV. El tipo de virus más común se encontró en tres poblaciones: Jaén 1, Toledo 1 y Albacete. Madrid 1 fue la única población que no compartía ninguno de sus haplotipos con el resto de las poblaciones. Ninguna de las comparaciones para establecer diferenciación genética entre las poblaciones con RHDV fue significativa.

El árbol de NJ obtenido para los nuevos haplotipos de RHDV y los publicados anteriormente muestra que los virus españoles forman un grupo natural (Figura 3). El virus AST89 aislado en Asturias, que se considera uno de los primeros focos de infección de RHD en España, se encuentra en una posición basal a todas las demás. Cuando se analizan sólo los aislados españoles, el árbol de NJ (distancias corregidas con el modelo GTR+I+G) y la red de haplotipos mostraron que existen dos grupos o clados de RHDV en España (Figuras 3 y 4). El Clado I es mucho más frecuente que el Clado II, incluyendo este último algunos virus de Toledo 1, Madrid 1, y Jaén 1. En el análisis demográfico, los resultados del test de neutralidad de Fu (FU 1997) indican que los datos de secuencia del RHDV no se ajustan a un modelo de población en expansión. Los parámetros demográficos indican que probablemente el Clado II sea un tipo de virus menos extendido que el del Clado I.



**Figura 4.** Red de haplotipos de RHDV. En blanco se muestran los conejos infectados tipo A y en negro los de tipo B

**Figure 4.** Network of RHDV haplotypes. white indicates that infected rabbits belong to type A, and black to type B. The size of each circle is proportional to the frequency of its haplotype.



### Conejo

La proporción de la subespecie *O. c. cuniculus* (linaje B) fue mayor para todas las poblaciones del norte y centro de la Península, mientras que en el sur predominó la subespecie *O.c.algirus* (linaje B). En ninguna de las regiones se encontraron poblaciones que tuvieran exclusivamente conejos de la subespecie *O.c.algirus*, todas ellas presentaron aunque fueran en baja proporción, conejos de la subespecie *O.c.cuniculus*. Sin embargo, en el norte y centro sí se encontraron poblaciones en las que sólo estaba presente la subespecie *O. c. cuniculus*.

Se amplificaron 11 microsatélites en un total de 587 muestras distribuidas en 18 poblaciones (Galicia no fue analizada debido al bajo número muestral). Todos los microsatélites analizados fueron altamente polimórficos (4-19 alelos). La población que globalmente presenta mayor variabilidad fue Toledo 1 y la menos variable fue Baleares. En general todas las poblaciones presentaron valores altos de diversidad.

Los valores de  $F_{ST}$  obtenidos para todos los pares de poblaciones fueron significativos para casi todas las comparaciones, a excepción de las comparaciones entre las poblaciones de Toledo 2 con Valladolid, Madrid 1 y Toledo 1 y las de Ciudad Real 2 con Ciudad Real 1, Toledo 2 y Madrid 1. En general, los valores más altos fueron los que comparaban la población de La Rioja

y Mallorca con el resto de poblaciones (0.06-0.15). Se estimó un número de poblaciones teóricas de  $K=8$  mediante inferencia Bayesiana. En sólo seis de las poblaciones analizadas la asignación de individuos tuvo una probabilidad del 70% o mayor. Estas poblaciones con un alto porcentaje de asignación fueron: Mallorca, Lérida, La Rioja, Ciudad Real 3, Cáceres 2 y Cádiz. El resto de poblaciones están formadas por una mezcla de otras poblaciones teóricas. Dentro de las poblaciones de Toledo 1 y 2 existen dos grupos bien diferenciados, que se corresponden con conejos extraídos de diferentes explotaciones cinegéticas. En cualquier caso, no existe una correlación entre genotipos puros (con un alto porcentaje de asignación), poblaciones en expansión y poblaciones donantes o receptoras.

El análisis jerárquico de AMOVA (EXCOFFIER *et al.* 1992) encontró diferencias significativas en las poblaciones de conejo en España en su totalidad. Al separar los individuos de cada población en función de su pertenencia a los linajes mitocondriales A y B también se encontró una estructura genética significativa a nivel nuclear. Sin embargo, al testar la separación en dos linajes únicamente con los conejos de la zona de contacto (Madrid 1, Madrid 2, Toledo 1, Toledo 2 y Ciudad Real 2), el resultado fue no significativo, por lo que se comprueba que existe una homogeneización de las características genéticas nucleares al mezclarse los dos tipos de conejo

Estructura Analizada	Varianza	% total	F	p
<b>1. Todos: un grupo</b>				
Entre poblaciones	0.025	6.12	$F_{ST}=0.061$	<0.0001
Dentro de poblaciones	3.859	93.88		
<b>2. Todos: dos grupos (Conejos Tipo A) (Conejos Tipo B)</b>				
Entre grupos	0.069	1.69	$F_{CT}=0.017$	0.0009
Entre poblaciones dentro de grupos	0.214	5.17	$F_{SC}=0.052$	<0.0001
Dentro de poblaciones	3.859	93.14	$F_{ST}=0.068$	<0.0001
<b>3. Zona de contacto: dos grupos (Conejos Tipo A) (Conejos Tipo B)</b>				
Entre grupos	0.015	0.38	$F_{CT}=0.004$	0.219
Entre poblaciones dentro de grupos	0.074	1.82	$F_{SC}=0.018$	<0.0001
Dentro de poblaciones	4.016	97.8	$F_{ST}=0.022$	<0.0001

Tabla 1. Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) basado en datos de microsatélites del conejo.

Table 1. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) based on the rabbit microsatellite data.

(Tabla 1). Un test de Mantel demostró que existe una correlación altamente significativa ( $r = 0.722$ ,  $P < 0.00001$ ) entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones analizadas.

### Correlación entre virus y hospedador

Los diferentes análisis factoriales de correspondencias realizados para cada población demostraron que no existen diferencias significativas entre los genotipos de conejos sanos y enfermos. Tampoco existieron diferencias entre un genotipo determinado de conejo y un haplotipo determinado de virus (Figuras 5 y 6). Tan sólo se observó una correlación entre los genotipos de los individuos de Baleares y el tipo de virus por el que estaban infectados. En las redes de haplotipos de los virus tampoco se observó que existiera una correspondencia entre los haplotipos virales y los linajes mitocondriales del conejo.

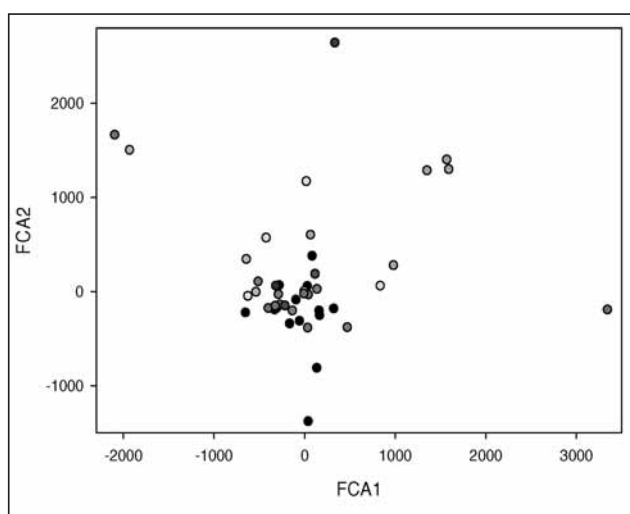
## DISCUSIÓN

La finalidad de este estudio era conocer la estructura genética de las poblaciones de conejo en la Península Ibérica, así como su relación con la estructura genética del MV y del RHDV. Para entender los resultados es necesario tener en

cuenta que la gestión de las poblaciones naturales de conejo en la Península Ibérica incluye vacunaciones, translocaciones y reintroducciones.

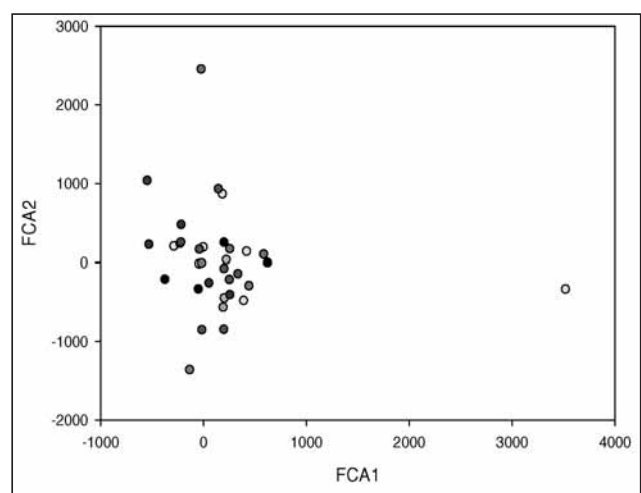
Los datos obtenidos de los análisis serológicos indican que un gran número de los conejos han estado expuestos a los dos tipos de virus. El número de individuos en los que se detectaron anticuerpos frente al RHDV fue menor que para la mixomatosis, lo cual puede ser debido a que la mayor virulencia de este virus haga que pocos individuos sobrevivan y por tanto presenten anticuerpos. En este estudio no es posible distinguir si la presencia de anticuerpos en los conejos se debe a una inmunidad natural adquirida por contacto con el virus o a que los conejos han sido vacunados.

El presente trabajo constituye el primer estudio que caracteriza la variabilidad genética del MV a nivel poblacional en la Península Ibérica. Los resultados obtenidos demuestran que se trata de un virus con una variabilidad genética muy baja, como es de esperar en un virus ADN. Esto explicaría por qué no se obtuvo una estructura ni en el árbol filogenético ni en la red de haplotipos. Aunque se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones de Ciudad Real 3 y el resto de poblaciones, la ausencia de una estructura genética en los árboles o la falta de



**Figura 5** Análisis factorial de correspondencias entre los genotipos de conejos enfermos. Cada color representa un tipo de MV.

**Figure 5.** Factorial correspondence analysis among genotypes of MV infected rabbits. Each colour represents a MV haplotype.



**Figura 6.** Análisis factorial de correspondencias entre los genotipos de conejos enfermos. Cada color representa un tipo de RHDV.

**Figure 6.** Factorial correspondence analysis among genotypes of RHDV infected rabbits. Each colour represents a RHDV haplotype.



correlación entre las distancias genéticas y geográficas hacen pensar que el MV en España se comporta como una única población. Esta conclusión se ve apoyada por el hecho de que 10 de los 24 haplotipos encontrados estaban presentes en más de un individuo, y cuatro de ellos también eran compartidos por más de una población. En Baleares, todos los virus compartían un mismo haplotipo que es exclusivo de esta población, lo que podría indicar un mayor aislamiento de esta población. Este aislamiento y diferenciación, se debe tener en cuenta a la hora de diseñar translocaciones de conejos desde y hacia la isla.

Por otro lado, ninguno de los haplotipos españoles es igual al de la cepa Lausanne, que fue la causante de la primera infección de mixomatosis en la Península Ibérica. De hecho, algunas cepas del MV en España son más diferentes entre sí que respecto a la cepa Lausanne. Esto es debido probablemente a la gran expansión que ha tenido el MV en España, como así lo reflejan los tests demográficos realizados. Esta diferenciación de los virus se debe tener en cuenta a la hora de realizar las vacunaciones, ya que las cepas españolas no tienen por qué ser iguales a las cepas europeas o a la cepa Lausanne.

El fragmento analizado del RHDV mostró una mayor variabilidad que el virus de la mixomatosis. Esta mayor variabilidad es lógica en un virus de tipo ARN debido a que presentan una mayor tasa de mutación. El árbol de NJ, que incluye haplotipos europeos del RHDV, muestra que los virus españoles provienen de un único ancestro. Si se consideran únicamente las secuencias propias de este estudio se observa, tanto en el árbol de NJ como en la red de haplotipos, que las secuencias de los virus se agrupan en dos clados aunque sin soporte estadístico. El Clado I representa la variabilidad del RHDV en España, mientras que los tipos de virus del Clado II son tipos de virus poco frecuentes que probablemente se hayan visto favorecidos por las explotaciones cinegéticas del centro de España. Así, dentro del Clado II el mismo haplotipo de virus se encontró en muestras de Toledo 1 y Jaén 1. Este hecho se puede explicar si se tiene en cuenta que en la población de Jaén

existen tanto conejos autóctonos como introducidos de la provincia de Toledo. Este caso se debe tener muy en cuenta por dos razones. En primer lugar, las explotaciones cinegéticas pueden estar favoreciendo la permanencia en la naturaleza de virus que de otra manera serían poco frecuentes. En segundo lugar, las traslocaciones podrían estar sesgando los tipos de virus presentes en las poblaciones. De ahí podemos deducir la importancia que tiene el control sanitario de las poblaciones donantes de conejos. A pesar de la existencia de estos dos grupos de RHDV no existen diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones del virus, por lo que se puede decir que el RHDV en la Península Ibérica se comporta como una única población.

Con respecto a los conejos, el análisis de las frecuencias de los linajes A y B de ADN mitocondrial realizado, permite obtener varias conclusiones si se comparan con las frecuencia publicadas en un estudio de hace seis años (BRANCO *et al.* 2000). Se observa un aumento en cuanto al área de distribución de la subespecie *O.c.cuniculus* (linaje B) que avanza hacia el sur, introduciéndose en regiones en las que antes sólo se observaban individuos de *O. cuniculus algerus* (linaje A). Esta expansión podría estar ocasionada por dos factores principalmente: el primero sería una posible adaptación y mayor resistencia a enfermedades que permitiría aumentar el número de efectivos en las poblaciones de conejo en el norte y favorecería la colonización de nuevos hábitats hacia el sur; y el segundo sería debido a las campañas de reintroducción de conejos que se llevan a cabo en el sur de la Península, y que utilizarían principalmente como donantes poblaciones del centro de la Península Ibérica (por ejemplo Toledo 1) en las que la mayoría de los individuos tienen el haplotipo B.

Todos los análisis realizados para determinar la estructura genética de las poblaciones de conejo han indicado que efectivamente existe una estructuración y, por tanto, una diferenciación significativa de las poblaciones de conejo. En los análisis de asignación Bayesiana, Baleares, Lérida, La Rioja y Cádiz fueron consideradas como poblaciones claramente diferenciadas con

porcentajes de asignación superiores al 90%, seguidas de Ciudad Real 3 y Cáceres con porcentajes de asignación superiores al 70%. El resto de las poblaciones están formadas por mezcla de otras poblaciones teóricas y deben resultar de la mezcla natural en el pasado o de reintroducciones más recientes. La alta estructura genética encontrada en las poblaciones de conejo sugiere una baja tasa de dispersión de la especie. Este resultado viene apoyado por el alto nivel de significación del test de Mantel para el aislamiento por distancia, en el que se revela que el mayor condicionante para la diferenciación genética de las poblaciones es la distancia geográfica a la que se encuentran. Si efectivamente los conejos por sí solos se dispersan poco, el aumento de conejos del grupo B en la mitad sur de la Península se debería a las translocaciones realizadas por el hombre más que a colonizaciones naturales.

El análisis de AMOVA realizado indicó que en general la reintroducción de individuos basándose en el linaje mitocondrial al que pertenecen puede ser una estrategia adecuada, ya que la estructura genética nuclear de los conejos se corresponde con la existencia de los dos linajes mitocondriales. Sin embargo, este no es el caso en la zona de contacto entre los dos linajes, siendo esta zona precisamente una de las áreas donantes de conejos más importantes (Toledo 1). Esto se debe a que en esta zona existe una homogenización de las características genéticas de los conejos, independientemente si son del linaje A o del B. El hecho de introducir conejos de esta zona en otras poblaciones, lo que producirá será una homogenización acelerada de todas las poblaciones, perdiéndose así las características

genéticas de cada población y, por tanto, su acervo genético y posibles adaptaciones al medio ambiente. En este sentido, idealmente las reintroducciones en el Parque Nacional de Cabañeros y la Finca Estatal Lugar Nuevo deberían realizarse a partir de Fincas donantes lo más cercanas posibles en el sur de la Península y fuera de la zona de contacto de los linajes mitocondriales A y B.

En general, todos los análisis realizados para intentar desvelar una asociación entre los conejos y los virus resultaron no significativos. Las características genéticas de los conejos no condicionan la susceptibilidad de padecer ninguna de las dos enfermedades estudiadas. Así mismo, todas las cepas de cada virus tienen la misma capacidad de producir cada una de las enfermedades estudiadas en todos los conejos, aunque no se conoce si todos los tipos de virus identificados producen una enfermedad con igual virulencia.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los conejos presentan una cierta estructura genética probablemente debida a una baja tasa de dispersión, siendo las translocaciones las responsables principales de la mezcla genética entre poblaciones. Tanto el MV como el RHDV no parecen presentar ningún tipo de estructura, aunque en el caso del RHDV de la población Toledo 1 se aprecia cierta singularidad que hay que tener en cuenta a la hora de usar esta población como donante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGÜELLO, J.L., LLANO, A. & PÉREZ ORDOYO GARCÍA, L.L. 1998. Enfermedad vírica hemorrágica del conejo en España. *Medicina Veterinaria* 5: 645-650.
- BARCENA, J., MORALES, M., VAZQUEZ, B., BOGA, J.A., PARRA, F., LUCIENTES, J., PAGES-MANTE, A., SANCHEZ-VIZCAINO, J.M., BLASCO, R. & TORRES, T.M. 2000. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *Journal of Virology* 74: 1114-1123.
- BRANCO, M., FERRAND, N. & MONNEROT, M. 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome b gene. *Heredity* 85: 307-317.
- CALLOU, C. 1995. Modifications de l'aire de répartition du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) en France et en Espagne, du Pléistocène à l'époque actuelle. Etat de la question. *Anthropozoologica* 21: 95-114.
- CAMERON, C., HOTA-MITCHELL, S., CHEN, L., BARRETT, J., CAO, J.X., MACAULAY, C., WILLER, D., EVANS, D. & MCFADDEN, G. 1999. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* 264: 298-318.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes - Application to Human Mitochondrial-DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479-491.
- FENNER, F. 1983. Biological control as exemplified by smallpox eradication and myxomatosis. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 218: 259-285.
- FERRER, M. 2005. El águila imperial ibérica. *Ecosistemas XIV*: 1-7.
- FORRESTER, N.L., TROUT, R.C., TURNER, S.L., KELLY, D., BOAG, B., MOSS, S. & GOULD, E.A. 2006. Unravelling the paradox of rabbit haemorrhagic disease virus emergence, using phylogenetic analysis; possible implications for rabbit conservation strategies. *Biological Conservation* 131: 296-306.
- FU, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- MORENO, S. & VILLAFUERTE, R. 1995. Traditional Management of Scrubland for the Conservation of Rabbits *Oryctolagus cuniculus* and Their Predators in Donana-National-Park, Spain. *Biological Conservation* 73: 81-85.
- MOUGEL, F., MOUNOLOU, J. & MONNEROT, M. 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics* 28: 58-71.
- RODRIGUEZ, A. & DELIBES, M. 1992. Current Range and Status of the Iberian Lynx *Felis pardina* Temminck, 1824 in Spain. *Biological Conservation* 61: 189-196.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SORIGUER, R. 1981. Biología y dinámica de una población de conejos (*Oryctolagus cuniculus* L. 1758) en Doñana, SO, España. *Doñana Acta Vertebrata* 15: 141-150.
- SURRIDGE, A.K., BELL, D.J., RICO, C. & HEWITT, G.M. 1997. Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species. *Animal Genetics* 28: 302-305.
- TAMURA, K. & NEI, M. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial-DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- VILLAFUERTE, R. 2002. *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758). En: L. J. Palomo and J. Gisbert (eds.) *Atlas de los Mamíferos terrestres de España*. pp. 464-467. Madrid

