

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
Facultad de Veterinaria

DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL AVESTRUZ (*Struthio camelus*)



"Embarque del avestruz" Mosaico de los s. III y IV
Villa Imperiale del Casale de la Piazza Armerina, Sicilia

TESIS DOCTORAL

NATALIA BELLO PIGEM

Bellaterra (Barcelona), Marzo 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
Facultad de Veterinaria

**DESARROLLO DE MARCADORES
MOLECULARES EN EL AVESTRUZ**
(Struthio camelus)

Natalia Bello Pigem

Bellaterra (Barcelona), Marzo 2001

A mi familia

Al Joan i la Teresa, de Can Caliro

Esta tesis ha sido posible gracias a muchas personas. Cada una ha aportado algo: sus conocimientos, su trabajo o su apoyo. Es imposible nombrarlas a todas en estas líneas, pero mi sentimiento de profunda gratitud va dirigido a todas y cada una de ellas. Agradezco sinceramente, us agraeixo sincerament,

Al Dr. Armand Sánchez Bonastre, per la seva confiança i suport en tot moment, així com el rigor científic en la direcció d' aquesta tesi.

A tots els meus companys i amics de laboratori, Marcel, Alex, Neus i tots els demás, gent amb qui he compartit i après tantes coses, i no sols de l' àmbit científic. Gràcies per aquest bon ambient de treball i amistat.

A mi familia, ¡en el sentido más amplio!, por vuestro apoyo, vuestro amor y vuestra ilusión. Gracias porque siempre estáis a mi lado.

A mis amigos y amigas, por su cariño, sus risas, sus broncas y sus ánimos. Als meus amics i amigues, per tots els bons moments, per la companyia i l' entusiasme. A Rafa, porque eres tú.

A los miembros de GEN-ES por su financiación y confianza, que han hecho posible esta tesis, especialmente a Peter Bradshaw y a Joan y Teresa de l' Estruç d'Or, a ellos y a los criadores de avestruces en general, por su entusiasmo y valentía, y también por las muestras biológicas facilitadas.

To the members of the Department of Biochemistry and Microbiology from the University of Zululand (South Africa) for their hospitality. To Dr. Carlos Bezuidenhout for his collaborative work, his friendship and for taking care of me.

To Dr. Robinson (University of Pretoria, South Africa) and Dr. Ostrowski (National Wildlife Research Centre, Saudi Arabia) for their kind collaboration in providing ostrich samples.

Este trabajo ha sido financiado mediante un Convenio de Colaboración entre la UAB y GEN-ES Genètica de l' Estruç, y también por la concesión de una Beca per a l' acabament de Tesis Doctorals de rellevant interès industrial, social o empresarial (TDOC) concedida por el Departament d' Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Historia y Situación Actual	1
1.1.1. Perspectiva histórica	1
1.1.2. Situación Actual	4
1.2. La cría del avestruz	7
1.2.1. Ficha técnica	7
1.2.2. Producción	8
1.2.3. Otras consideraciones de interés	9
1.3. Taxonomía	12
1.3.1. Las Ratites	12
1.3.2. Subespecies de avestruz	13
1.4. Marcadores moleculares	16
1.4.1. Microsatélites	17
1.4.1.1. Características	17
Identificación individual y relaciones de parentesco	18
Evaluación de polimorfismo y estudios poblacionales	19
Mapas genéticos	19
Estudios evolutivos	20
1.4.1.2. Alelos nulos y homoplasia	22
Alelos nulos	22
Homoplasia	22
1.4.1.3. Microsatélites en el genoma aviar	23
1.4.2. RAPDs	25
1.4.3. SNPs	26
2. OBJETIVOS DE LA TESIS	29
RESULTADOS	31
Capítulo 1: Obtención de ADN genómico a partir de plumas	31
Artículo: Isolation of genomic DNA from feathers	32
Capítulo 2: Identificación de un marcador específico de sexo	36
Artículo: The identification of a sex-specific DNA marker using a RAPD assay	37
Addenda al capítulo 2: Posicionamiento cromosómico del marcador	40

Capítulo 3: Análisis de marcadores microsatélites	44
Selección de marcadores	44
Índices de polimorfismo y frecuencias alélicas	45
Análisis de subespecies	50
Nuevos alelos descritos	50
Estudios poblacionales	51
Capítulo 4: Otros marcadores de interés	53
La hormona de Crecimiento	53
DISCUSIÓN	59
I. Obtención de ADN genómico a partir de plumas	59
II. Marcadores RAPDs	61
III. Marcadores específicos de sexo	66
IV. El posicionamiento cromosómico	70
V. Microsatélites: Alelos y sus frecuencias	71
VI. Identificación individual	72
VII. Test de paternidades y relaciones de parentesco	73
VIII. Identificación de subespecies	74
Árbol filogenético	74
Marcadores específicos	78
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	93
ANEXOS	95
I. Secuencia del marcador de sexado (GenBank)	95
II. Condiciones de amplificación y secuencia de cebadores de microsatélites	97

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL

1.1.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

El registro fósil para nueve especies del género *Struthio* data del Plioceno (último periodo del Terciario, hace 5-2 millones de años) y las sitúa en África, Europa y el Este Asiático. Sin embargo sólo una de ellas, *Struthio camelus* (el avestruz) sobrevivió, localizada en el continente Africano y parte de Arabia (*Freitag 1992*).

Según demuestran unas pinturas rupestres encontradas en las montañas Saharianas de Erongo, el avestruz ya era conocido por el hombre hace más de 9000 años (*Carbajo y col. 1997*) y, desde entonces las referencias al avestruz a lo largo de la historia de la humanidad son continuas.

Los egipcios utilizaban sus plumas como símbolo de justicia y poder. En las civilizaciones antiguas de Siria y Babilonia, hace 2300 años, era utilizado como animal de tiro en carruajes (*Buxadé 1999, Vandervoodt-Javis 1994*). En las culturas Romana, Griega y China también se cuenta con referencias al avestruz (*Anderloni 1998, Carbajo y col. 1997*). En el siglo XVIII, poblaciones de bosquimanos del Kalahari, utilizaban los huevos de avestruz, una vez vacíos, como recipientes de agua (*Wagner 1986*).

Pero fue posteriormente cuando los avestruces comenzaron a ser utilizados con un fin más concreto y relacionado con la actualidad: la obtención de sus plumas.

Las plumas de avestruz han sido un elemento ornamental en numerosos emblemas y escudos, desde la Edad Media hasta la actual insignia del Príncipe de Gales (*Anderloni 1998*), y a lo largo de la historia han sido utilizadas como signo de distinción por su perfecta simetría y belleza (*Esteves 1999, Carbajo y col. 1997*).

La industria del avestruz, propiamente dicha, aparece a finales del siglo XVIII y, sobre todo, en el XIX, como resultado de la gran demanda de plumas por parte de Inglaterra, EEUU y Francia (*Buxadé 1999*).

Por aquel entonces, las plumas se obtenían cazando animales salvajes (*Wagner 1986*), y la enorme demanda en el mercado provocó un grave descenso del número de especímenes en la primera mitad del siglo XIX. Colonos de Cape Province, en Sudáfrica, se dieron cuenta de que si continuaban con la persecución de las poblaciones silvestres, agotarían la nueva fuente

de recursos, y algunos de ellos empezaron a adoptar polluelos huérfanos y alimentarlos a mano. Estos fueron los primeros avestruces domesticados (*Anderloni 1998, Gurri 1993, Vandervoodt-Javis 1994*).

Por lo tanto, durante más de 90 siglos el avestruz ha sido un animal útil al hombre, pero sólo a partir del siglo XIX, podemos referirnos a él como animal doméstico (*Buxadé 1999, Carbajo y col. 1997*).

Las poblaciones salvajes de avestruz en África se distribuyen en dos grupos, los avestruces del Norte y los del Sur, separados por un cinturón de bosques de *Brachystegia* (“miombo”) en África central (*Freitag 1992, Buxadé 1999*). La población del Norte engloba tres de las subespecies de avestruz existentes (*S. c. camelus, S. c. massaicus y S. c. molybdophanes*), mientras que la del Sur la forma únicamente la subespecie restante (*S. c. australis*).

Así pues, nos encontramos con que la población fundacional domesticada se centró en avestruces sudafricanos salvajes (*Struthio camelus australis*), llevados a la cautividad.

Cuando se comprobó que la domesticación era un éxito, y con la aparición de la primera incubadora artificial (inventada por Arthur Douglas en 1869), fueron floreciendo nuevas explotaciones (*Carbajo y col. 1997*) y el número de avestruces en granjas en Sudáfrica aumentó de los 80 iniciales a cerca de 25.000 en 1875 (*Wagner 1986, Buxadé 1999*).

Entre 1870 y 1900 se introdujeron numerosos especímenes de avestruz norte africano (*S. c. camelus*) y avestruz árabe (*S. c. syriacus*, ahora extinguida) para ser cruzados con la población local, con el objetivo de obtener una mejora en la calidad de la pluma (*Vandervoodt-Javis 1994, Freitag 1992*). A esta población híbrida mejorada se la bautizó con el nombre de “African black” en 1903 (*Carbajo y col. 1997*).

Animados por el éxito del negocio, la cría de avestruces empezó a extenderse por todo el mundo. A finales del siglo XIX aparecieron las primeras granjas fuera del continente africano, en Europa y América del Norte (*Anderloni 1998, Wagner 1986, Carbajo y col. 1997*), pero la gran crisis estaba por llegar.

La historia de la industria del avestruz está llena de altibajos. Tras el periodo de auge por la gran demanda de plumas (1800-1910), en 1914 la industria sudafricana contaba con casi un millón de ejemplares domesticados (*Gurri 1993, Carbajo y col. 1997*). Pero el estallido de la

Primera Guerra Mundial (1914-1918), junto con el cambio de modas en el vestir, provocó un colapso en la industria, y el precio de la pluma cayó en picado. La depresión económica mundial y el hundimiento del mercado provocaron la quiebra de la mayor parte de granjeros, y en 1935 la población de animales apenas superaba los 30.000 ejemplares (*Wagner 1986, Buxadé 1999*).

A partir de 1942 hubo una pequeña mejora en la economía de la cría de avestruces, debido, entre otros factores, a la diversificación de la producción: aumenta el consumo de carne de avestruz, y se acrecienta el interés por su piel, para ser transformada en cuero (*Gurri 1993, Buxadé 1999*).

Sin embargo los efectos socioeconómicos de la Segunda Guerra Mundial (1939-1945) tuvieron implicaciones devastadoras en la industria del avestruz, que sufrió su segunda gran crisis (*Wagner 1986*).

A partir de la década de los sesenta el sector empieza a recuperarse y la explotación de avestruces vuelve a extenderse en Sudáfrica, esta vez con la carne y el cuero como productos principales.

En el resto del continente africano aparecen granjas importantes en Namibia, Botswana y Zimbabwe (*Gurri 1993*). Paulatinamente también van reapareciendo explotaciones en el resto del mundo, empezando por EEUU, principalmente en Texas y California, y Australia (*Vandervoodt-Javis 1994, Carbajo y col. 1997*).

Posteriormente en Israel también se multiplicaron las granjas cuando su Gobierno favoreció el desarrollo de esta actividad a través de subvenciones. Ahora este país es uno de los mayores productores mundiales, pero todo el volumen es exportado, ya que, por motivos religiosos, la carne de avestruz no se puede consumir en Israel (*Buxadé 1999*).

En Europa la cría de avestruces empezó bastante más tarde que en EEUU y su historia es corta. Alemania, Italia y Francia fueron los impulsores (*Vandervoodt-Javis 1994*), aunque cuando en 1993 ya se crea la European Ostrich Association, participan miembros de 15 países europeos distintos, que ejercen una importante labor de promoción y formación de esta actividad ganadera (*Buxadé 1999, Vandervoodt-Jarris 1994*). En España aparecen las primeras granjas en 1993 (*Gurri 1994*), y la primera asociación de criadores, l' Associació Catalana de Criadors d'Estruços, se funda en Noviembre de 1994.

1.1.2. SITUACIÓN ACTUAL

En el ámbito mundial, el líder indiscutible sigue siendo la República Sudafricana, con el 80% de la producción. Especialmente en la zona de Oudshoorn, donde se centra el 60% de la actividad ganadera de avestruz en Sudáfrica (lo que representa casi el 50% mundial), y donde la Klein Karoo Cooperative (KKC) agrupa a las mayores granjas (*Van Zyl 1999*).

La KKC se creó en 1945, con una política de monopolio parecida a la del comercio de diamantes, y durante 45 años controló e incluso prohibió la salida de animales vivos de Sudáfrica hacia otros países. Hoy sigue liderando el mercado: regula los mataderos y coordina las actividades de marketing de sus productos (*Van Zyl 1999, Buxadé 1999, Vandervoodt-Javis 1994*).

A modo de ejemplo del liderato sudafricano, en 1996 se calcula que fueron sacrificados 346.353 avestruces en el mundo, el 80% de los cuales fueron abatidos en mataderos de este país. El 20% restante estaba repartido entre: EEUU (7%), Namibia (5%), Israel (3,7%), Zimbabwe (2,6%), Europa (1,2%) y otros países (0,5%) (*Van Zyl 1998*).

En lo relativo a censo mundial actual de animales en los principales países productores, los datos se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Censo de avestruces en diversas regiones del mundo en 1999

Región	Censo global (cabezas)
Sudáfrica	800.000
EE.UU.	500.000
Australia	70.000
Europa	45.000
Canadá	20.000
Botswana	18.000
Israel	16.000
Zimbabwe	15.000

Fuente: *Buxadé 1999*

En Europa los países donde esta industria está teniendo más desarrollo son Francia e Italia, pese a que España tiene el mayor número de animales. El tamaño de las explotaciones es enormemente heterogéneo, aunque la mayoría de ellas son muy pequeñas, hablando de una media en la UE de 17-20 avestruces/granja (*Buxadé 1999*). Algunos datos referentes al censo de animales y el número de explotaciones, se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Censo de avestruces y de explotaciones en la UE en 1999

Región	Núm. de granjas	%	Censo global (cabezas)	%
U.E.-16	2.600	100,0	45.000	100,0
Francia	1.200	46,1	8.000	17,8
Italia	800	30,8	10.000	22,2
España	300	11,6	20.000	44,4
Gran Bretaña	150	5,8	2.000	4,4
Holanda	100	3,8	2.000	4,4
Otros	50	1,9	3.000	6,7

Fuente: *Buxadé 1999*

En España los inicios no fueron fáciles. En su condición de nueva actividad ganadera y adornada con promesas de gran rentabilidad y beneficios a corto plazo, el negocio adquirió una estructura piramidal, basado en la venta de reproductores y pollitos a elevado precio para las nuevas granjas que iban apareciendo y hubo mucha especulación (*Gurri y Castelló 1994, Buxadé 1999*).

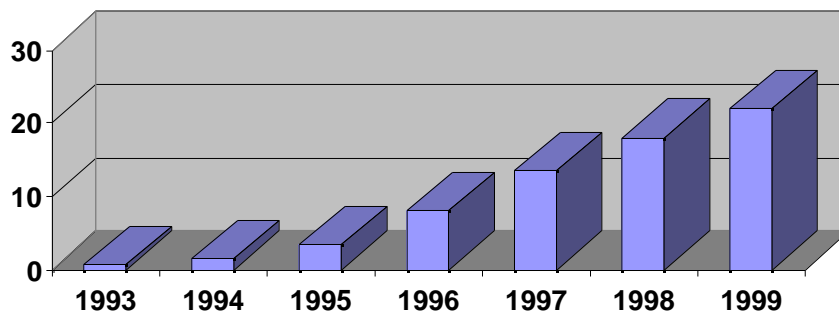
Florecieron pequeñas explotaciones, muchas veces sin un conocimiento real del origen de los animales, de sus parentescos o estado sanitario, y, sobre todo, sin una definición ni estudio del mercado al que se dirigían sus productos (*Gurri 1993*). La falta de organización, de mataderos homologados, de un buen canal de distribución y campañas publicitarias que orientaran el consumo, convirtieron la carne de avestruz, a ojos del consumidor, en un producto exótico de elevado precio y difícil de conseguir.

Ahora, una vez superada esta etapa, y desde un punto de vista de los países con un mercado más consolidado, la industria de avestruces en España se encuentra todavía en su infancia, comparable con la industria Americana o Australiana hace 5 años (*Benson 2000*).

El espectacular crecimiento de la cabaña de avestruces española en estos primeros años refleja la gran expansión que ha tenido el sector (Figura 1). Se calcula que el censo en 1999 fue de 18.000-23.000 animales, y el número de granjas alrededor de 300 (*Buxadé 1999*), aunque hay estimaciones muy variables sobre esta última cifra, debido a la falta de un censo oficial, y se barajan cifras de hasta 1.500 explotaciones españolas en ese año (*Miño 1999*).

En cualquier caso, todos los autores coinciden en afirmar que la distribución de animales en España es muy irregular, ya que una docena de explotaciones albergan cientos de animales cada una, mientras que el resto de la cabaña está muy atomizado, en granjas que no superan la decena de avestruces (*Buxadé 1999*).

Figura 1. **Evolución de la cabaña de avestruces en España** (expresado en miles)



Fuente: ATIDA Avestruces. Real Escuela de Avicultura. Arenys de Mar

En la actualidad existen en España una veintena de mataderos homologados, cooperativas y varias asociaciones de criadores (*Miño 1999*), pero todavía se precisa un desarrollo más estable y la definición del mercado de la carne, el cuero y los productos secundarios para poder afirmar que se trata de una actividad ganadera con futuro en nuestro país.

1.2. LA CRÍA DEL AVESTRUZ

1.2.1 FICHA TÉCNICA DEL AVESTRUZ

Nombre científico: *Struthio camelus*

Talla: adulto: 2,1-2,8 m.
nacimiento: 25-30 cm.

Peso: nacimiento: 0,4-0,9 Kg.
adulto: 90-150 Kg.
al sacrificio (11-13 meses): 90-100 Kg.

Crecimiento: los 6 primeros meses: 0,28 Kg/mes
en el primer año: 0,25 Kg/mes

Longevidad: 30-40 años (en estado salvaje)
40-60 años (en cautividad)

Velocidad en carrera: hasta 60 km./h.

Alimentación: dieta herbívora (forraje, alfalfa y pienso)
requerimientos energéticos (mantenimiento): 2.500 Kcal./Kg.

Producción: unidad: 1 macho: 2 hembras
vida productiva: 30-45 años

Producción de carne: rendimiento a la canal: 25-45 Kg/ave
% carne de Primera: 20-35 Kg/ave

Producción de plumas: plumas coberteras: 1-1,5 Kg/año/ave
plumas blancas (macho): 0,4-0,6 Kg/año/ave

Producción de piel: 1,2 m²/ ave

Reproducción: madurez sexual: 2-3 años hembra/ 3-4 años macho
temporada: Marzo - Octubre

Puesta: incubación: 42 días
nidada: 12-16 huevos
ritmo: 1 huevo/2 días
núm. de huevos/temporada: 30-60
peso del huevo: 1,2-1,7 Kg.
pico de puesta: séptimo año (hasta 80 huevos/temporada)

Fuente: Elaboración propia, a partir de bibliografía consultada (Buxadé 1999, Gurri 1993 y 1994, Anderloni 1998, Carbajo y col. 1997, Wagner 1986).

1.2.2. PRODUCCIÓN

Los principales productos comercializables que se obtienen de la cría de avestruces son los siguientes:

1. Animales vivos (futuros reproductores): Incluye huevos embrionados, polluelos desde 1 día de vida a varios meses y animales adultos. En los inicios de la industria, sin duda, la venta de animales vivos a otras granjas que empezaban, aportaba la mayor parte de los beneficios de la actividad, y había tanta demanda que todos los animales eran destinados a reproductores, prestando escasa atención a su valor como tal o a la mejora de caracteres productivos (*Gurri y Castelló 1994, Gurri 1993*). Sin embargo, en los últimos dos o tres años la situación está cambiando, el mercado se estabiliza y los precios de los reproductores han caído de forma muy significativa y se espera que continúe esta tendencia a la baja (*Buxadé 1999, Miño 1999*).

2. Carne y vísceras: En España es el producto comercial de más valor (*Miño 1999*). La carne de avestruz es una carne roja y firme, con un aspecto parecido a la de bovino. Tiene unas cualidades organolépticas y nutricionales excelentes. Su contenido en grasa no supera el 2% y los niveles de colesterol son inferiores a la carne de vacuno, pollo o pavo (*Esteves 1999, Gurri 1993, AOA 1998*). Estas características la convierten en un producto ideal de acuerdo con las nuevas tendencias de una alimentación más saludable y baja en grasas. En la actualidad, ya se realizan tests de consumidores y estudios sobre preferencias del aspecto y color de la carne (*Benson 2000, Lacombe Research Centre 1997*).

En el despiece, la carne de Primera proviene del muslo (pese a que se habla de bistec o solomillo), mientras que la de Segunda proviene del cuello y alas, y es utilizada para hamburguesas o salchichas. La carne se comercializa fresca o como “biltong” (carne secada al sol y especiada, muy popular en Sudáfrica).

En cuanto a vísceras, son apreciados el hígado y la molleja, para productos elaborados como patés o embutidos. La grasa también se aprovecha, en la industria cosmética y farmacéutica (*Buxadé 1999*).

3. Piel (cuero): Actualmente es uno de los productos que da más beneficios, y con un mercado cada vez más consolidado (*Buxadé 1999*), especialmente en Sudáfrica, donde supone el 75% de los ingresos provenientes de un animal.

La piel de avestruz produce un cuero muy apreciado en marroquinería por su belleza y elasticidad. Sin embargo hay mucha variedad en la calidad y cantidad (superficie) de las pieles obtenidas, debido a una falta de selección y homogeneidad en las poblaciones. Recientemente se han iniciado estudios sobre la edad óptima de sacrificio para mejorar la calidad del cuero y también se tienen en cuenta las técnicas de faenado en los mataderos o tipos de valla en los corrales para estropear lo mínimo posible la piel de los animales (*Van Zyl 1999*).

4. Plumas: A diferencia de los inicios de la industria, éstas ya no son el producto estrella, y actualmente los criadores las consideran casi un subproducto (además, al arrancarlas, existe un riesgo de dañar la tan preciada piel) (*Buxadé 1999*).

A pesar de ello, siguen teniendo un pequeño mercado en Asia, donde se usan como elemento ornamental, y también en Europa y EEUU, para hacer plumeros de limpieza y en la industria automovilística, por sus características antimagnéticas (*Esteves 1999*).

5. Huevos: Un huevo de avestruz equivale a 24 huevos de gallina (*Wagner 1986*). Pese a ello no existe una industria del ovoproducto del avestruz bien desarrollada, porque siempre ha resultado más rentable fecundar los huevos e incubarlos para la obtención de pollitos que como producto de alimentación humana.

Los huevos infértiles (o rotos) son aprovechados como elemento decorativo, e incluso se hacen concursos artísticos de huevos de avestruz pintados, como el que hubo en la feria de ExpoÁviga en Barcelona en 1992.

1.2.3. OTRAS CONSIDERACIONES GENERALES DE INTERÉS

1. Instalaciones

Los avestruces se crían en régimen extensivo o semiextensivo.

Las instalaciones deben incluir (*Gurri y Castelló 1994*):

- a) Parques de tierra: Al aire libre con un pequeño cobertizo con el comedero y bebedero. En ellos se alojan los animales de engorde destinados a sacrificio y los reproductores. Cada unidad reproductora (un macho y dos hembras) debe tener el suyo (1000-1500 m²), aunque en Sudáfrica los reproductores están en manadas, y en Israel en grupos pequeños

(*Gurri 1993*). Es importante que en los parques no haya objetos extraños ni materiales diversos que puedan ingerir y que les ocasionen lesiones digestivas y/u obstrucciones.

- b) Local de primera edad (hasta los 15 días): Cubierto y con calefacción.
- c) Local de segunda edad (hasta 3 meses): Semicubierto, y con un parque exterior.
- d) Local para la incubación y las operaciones relacionadas con la misma (si es que se incuban los huevos en la propia explotación).

La aclimatación de los avestruces no presenta ningún problema, ya que son animales muy rústicos y, por lo tanto, adaptables a cualquier climatología y, pese a ser originarios de un continente cálido, los adultos soportan bien temperaturas rigurosas de invierno hasta 10° bajo cero (*Gurri y Castelló 1994, Kapala 1996*).

2. Reproducción

El avestruz es una especie polígama. Tanto machos como hembras se aparean con más de un individuo del sexo opuesto en cada temporada. Los machos se aparearán con todas las hembras que entren en su territorio, pero una hembra puede visitar distintos territorios, dominados por machos distintos (*Hicks-Allredge 1998*). Además la puesta se organiza por nidada común, es decir, varias hembras ponen sus huevos en el mismo nido. La hembra dominante incubará todos los huevos del nido (suyos y de otras hembras) durante el día, y el macho lo hará durante la noche. Una vez nacidos los polluelos, todos serán cuidados también en grupo (*Kimwele y col. 1998, Hicks-Allredge 1998*).

Con este sistema de cría, cualquier pollo nacido en un grupo puede tener distintos padres o madres potenciales. Por supuesto, en unidades reproductoras de tríos el macho siempre va a ser conocido, pero no la madre. En sistemas de producción de grupos de reproductores (en Sudáfrica o Israel) el problema de identificación de los progenitores se acentúa más.

3. Dimorfismo sexual

Los avestruces adultos presentan un claro dimorfismo sexual en su plumaje. Los machos son negros, con plumas blancas en los extremos de las alas y en la cola. Las hembras presentan un plumaje más uniforme, marrón o gris. El color de sus plumas se explica por mecanismos de adaptación relacionados con el camuflaje, ya que el macho incuba los huevos de noche, mientras que la hembra lo hace durante el día (*Anderloni 1998*).

Sin embargo no es hasta los 16 meses de edad que el macho empieza a mostrar su plumaje negro y sólo a partir de los dos años la diferencia ya es obvia (*Wagner 1986*).

Aparte del dimorfismo sexual por el plumaje, el macho presenta un pene intromitente oculto, pero su identificación no es fácil hasta edades avanzadas (*Carbajo y col. 1997*). También existen otros sistemas de sexado: La técnica quirúrgicas, mediante laparoscopia, implica la anestesia del animal y es una técnica invasiva (*Levinson 1995*). Hay evidencias de que las hembras nacen de huevos más pequeños (*Deeming y col. 1993A y 1993B*) pero las diferencias de peso del huevo pueden ser debidas a factores diversos, y éste nunca ha sido un sistema utilizado para sexar a los animales. El sexado por cariotipo debería incluir la tinción de banda, ya que el par de cromosomas sexuales son de tamaño muy parecido (*Takagi y col. 1972*).

En la compra de reproductores de avestruz la economía va contrarreloj. De la compra de un huevo para incubar a la adquisición de reproductores adultos, el precio se puede multiplicar casi por 100 (*Gurri 1993*). Si además tenemos en cuenta la dificultad que se va añadiendo por el manejo de las aves a medida que aumentan de edad y peso, la conclusión es que interesa un sexado seguro a la edad más temprana posible.

4. Manejo

Éste es un punto a destacar por los problemas de agresividad de algunos animales, que pueden suponer un peligro real para el granjero y las demás aves (*Buxadé 1999*). Los avestruces conviven mediante el establecimiento de unas fuertes y activas relaciones sociales, concretadas en jerarquías y dominancias (*Pérez 1999*) y, especialmente en época reproductiva, no se debe subestimar el peligro que suponen.

Atacan y se defienden con patadas o coces. No hay más que ver sus potentes patas, preparadas para la carrera, para darse cuenta del daño que pueden hacer con ellas (*Wagner 1986*).

En definitiva, podemos afirmar que es básico limitar al máximo la manipulación y el estrés de los animales en actividades como la recogida de huevos, desparasitación o la colocación de crotales y microchips, sobre todo en época reproductiva.

1.3. TAXONOMÍA

1.3.1. LAS RATITES

El avestruz, *Struthio camelus* (Linneo 1758) pertenece al grupo de las Ratites (aves corredoras), que equivale al Orden Struthioniformes (Cooper y col. 1992). Tabla 3.

Estas aves se caracterizan por su incapacidad de volar y la ausencia de quilla en el esternón (en la quilla es donde insertan, en el resto de las aves, los potentes músculos pectorales que mueven las alas para el vuelo). Tampoco tienen huesos neumáticos. Las alas en estas aves son rudimentarias y presentan dedos vestigiales (Anderloni 1998, Buxadé 1999).

Tabla 3: **Aves ratites existentes**
(Clase: Aves / Subclase: Neornithes / Orden Struthioniformes)

SUBORDEN	FAMILIA	LOCALIZACIÓN
Struthioni	Struthionidae Avestruz: <i>Struthio camelus</i>	África
	Rheidae Ñandú: <i>Rhea nobilis</i> <i>Rhea americana</i> <i>Pterocnemia pennata</i>	Brasil, Argentina y Perú
Casuarii	Casuariidae Casuario: <i>Casuariua benetti</i> <i>C. unappendiculatus</i> <i>C. casuarius</i>	Nueva Guinea, Islas Molucas y Nueva Bretaña
	Emu: <i>Dromaius novaehollandiae</i>	Australia
	Apterygidae Kiwi: <i>Apteryx australi</i> <i>Apteryx owenii</i> <i>Apteryx haastii</i>	Nueva Zelanda

Fuente: Elaboración propia a partir de bibliografía consultada (Freitag 1992, Cooper y col. 1992; Anderloni 1998, Carbajo y col. 1997)

El avestruz, único miembro de la familia *Struthionidae*, es el ave de mayor tamaño existente y presenta unas características que lo diferencian del resto de las aves: Sus pies poseen únicamente dos dedos, con 4 falanges cada uno. El dedo medial o interior es el funcional y mucho mayor que el lateral. Presentan un largo cuello, desnudo o parcialmente cubierto de una pluma pequeña y suave. Los muslos también están prácticamente desprovistos de plumas. Los machos presentan grandes escamas o espejos en los tarsos y tienen el órgano sexual intromitente (phallus o pene) (Anderloni 1998).

1.3.2. LAS SUBESPECIES DE AVESTRUZ

Dentro de la familia *Struthionidae* se han descrito 6 subespecies de avestruz, pero sólo 4 de ellas siguen existiendo en la actualidad. Las subespecies se distinguen por características fenotípicas de los individuos adultos tal como el tamaño corporal, color de la piel, tamaño y porosidad del huevo, presencia/ausencia de un área calva en la cabeza y una banda de plumas blancas alrededor del cuello (Buxadé 1999, Bezuidenhout 1999).

Las subespecies de *S. camelus* existentes son las siguientes:

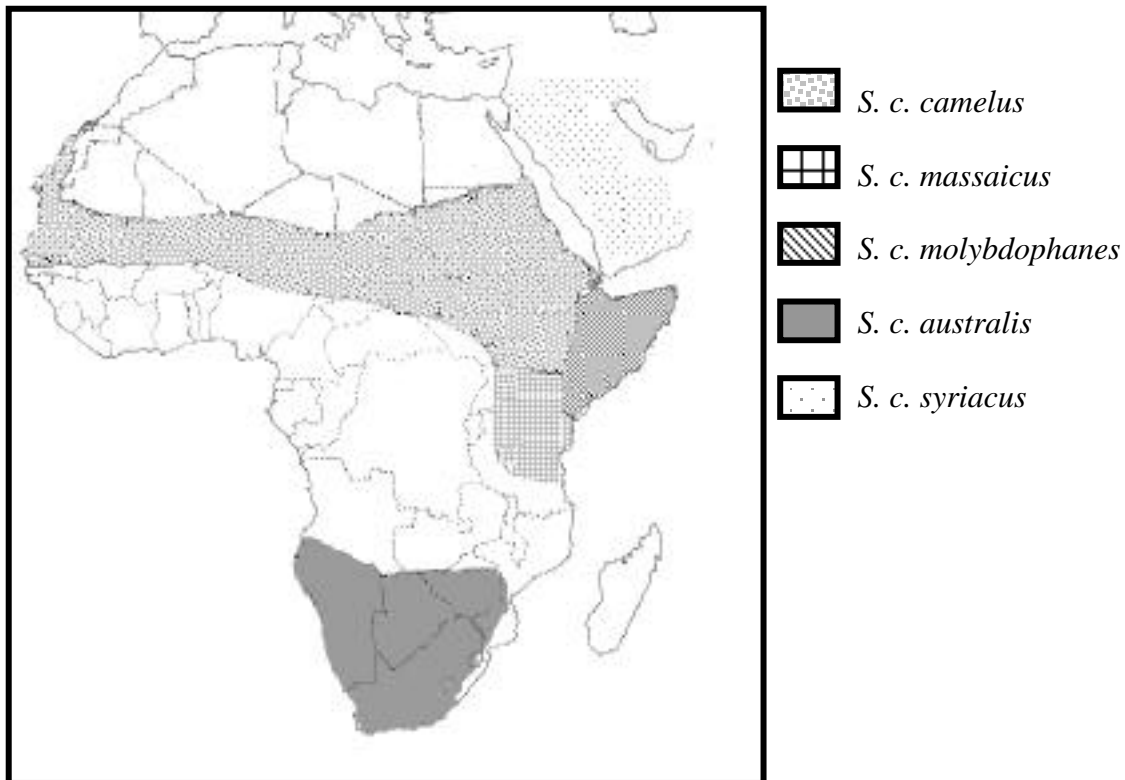
- ❖ *Struthio camelus australis*, Gurney (*S. c. australis*): Estas aves son nativas del Africa al sur del río Zambezi (de Zimbabwe a Cape Province, en la República Sudafricana). Figura 2. Son conocidos como animales “Cuello Negro”, y algunas veces “Cuello Azul” (aunque generalmente son *S. c. molybdophanes* los denominados así). El *S. c. australis* es de menor tamaño, mas estilizado y de patas más cortas que el avestruz norte africano (*S. c. camelus*). El dedo menor no suele tener uña o garra, y las escamas tarsales suelen ser continuas. La piel del cuello y cuerpo es azulada en los machos y gris oscuro en las hembras. En los machos sexualmente maduros, la piel de la frente, alrededor de los ojos y las escamas tarsales adquieren un tono rojo escarlata en época reproductiva. No presentan zona calva en la cabeza. Los huevos presentan poros profundos que dan un aspecto granuloso a su cáscara y son más ovales que los de los avestruces del norte (Carbajo y col. 1997, Anderloni 1998, Bezuidenhout 1999).
- ❖ *Struthio camelus camelus*, Linnaeus (*S. c. camelus*): Originario del Norte y Oeste Africano, desde Sudán a Mauritania. Figura 2. En su dedo menor aparece una uña y presenta escamas en el dedo principal. El color de la piel en los polluelos tiene un tono

amarillo crema, mientras que en los machos adultos, durante la época de apareamiento, la piel en piernas, cuello y cabeza adquiere un tono rojo brillante. Se les conoce como “Cuellos Rojos” o “Barbary birds”. En la cabeza presentan una coronilla calva, y también un collar de plumaje blanco en el cuello. Las hembras son de color marrón pálido, pero en época de apareamiento, el cuello, pico y cola se vuelven rojizos. Los huevos son lisos y de mayor tamaño que los de las aves de Sur (Anderloni 1998, Buxadé 1999, Bezuidenhout 1999).

- ❖ *Struthio camelus massaicus*, Neumann (*S. c. massaicus*): Presentes en la zona que abarca el Este de Kenya y casi todo Tanzania. Figura 2. Son animales de tamaño medio. Su cabeza puede ser parcialmente calva. En los machos aparece un delgado collar blanco, y las plumas, tanto de la cola como de las alas, también son blancas. El cuello y muslos de los individuos de ambos sexos son gris pálido y vira a rojo en la época reproductiva (Buxadé 1999, Bezuidenhout 1999). Se les llama “Avestruz masai” pero también “Cuellos Rojos” al igual que a los *S. c. camelus*.

- ❖ *Struthio camelus molybdophanes*, Reichenow (*S. c. molybdophanes*): El área geográfica donde se encuentra esta subespecie incluye el este de Kenya, Somalia y Etiopía. Figura 2. Presenta la zona calva en la cabeza, como *S. c. camelus*, pero el cuello y muslos son gris azulado, por ello se denominan comúnmente “Cuellos Azules”. El plumaje del cuerpo de los machos es marcadamente negro. Las plumas de la cola son blancas y también las hay en el cuello, formando un ancho collar. Los animales que pertenecen a esta subespecie son de gran tamaño (Anderloni 1998, Buxadé 1999, Bezuidenhout 1999). A pesar de que hay solapamiento en las áreas geográficas de distribución de las subespecies del Norte (*S. c. camelus*, *S. c. massaicus* y *S. c. molybdophanes*), *S. c. molybdophanes* presenta diferencias morfológicas, comportamentales y moleculares muy claras respecto a las otras dos subespecies (Freitag 1992, Kumari y Kemp 1998) y también respecto a *S. c. Australis*.

Se describen otras dos subespecies más, actualmente desaparecidas. *Struthio camelus syriacus*, el avestruz Árabe, fue muy valorado por sus plumas, pero su caza indiscriminada le llevó a darlo por extinguido en 1941, aunque se informó que todavía se vieron algunos ejemplares en 1968 (Buxadé 1999, Carbajo y col. 1997) Ocupaba parte de la Península Arábiga. Figura 2. La sexta subespecie, *Struthio camelus spatzi*, del Noroeste Africano se hibridó completamente con *S. c. camelus* (Bezuidenhout 1999).

Figura 2: **Distribución geográfica de las subespecies de avestruz**

Finalmente, se habla de “*Struthio camelus domesticus*” para referirse a los animales que encontramos en las explotaciones para su producción y que han sido domesticados.

Se trata de animales cruzados de distintas subespecies, sin ningún tipo de regulación, y sólo podríamos referirnos a él como una variedad. También se refieren a ellos como “African black” (EEUU) (igual que la primera población híbrida, en 1903 (Carbajo y col. 1997)) o “Cape Feather Bird” (Sudáfrica) (Anderloni 1998, Buxadé 1999).

Las subespecies existentes en la actualidad únicamente se encuentran en “pureza” en poblaciones que se han mantenido relativamente aisladas durante largos períodos de tiempo y que han sido protegidas de la hibridación con otras subespecies para la conservación de su identidad genética (Freitag 1992).

Por todo lo visto a lo largo de historia de la domesticación del avestruz, la aparición de los híbridos comerciales y el cambio en los criterios de selección de los animales (en función de qué producto primaba: plumas, carne o cuero), se deduce que la identidad genética de los

animales domesticados se perdió hace décadas, y que ahora debemos trabajar para recuperarla.

Los primeros estudios para la identificación genética de las subespecies de avestruces se realizaron mediante el análisis del ADN mitocondrial (*Freitag 1992, Freitag y Robinson 1993*), y más recientemente con marcadores nucleares tipo RAPDs (*Bezuidenhout 1999*) y microsátélites (*Kumari y Kemp 1998, Kimwele y col. 1998*).

1.4. MARCADORES MOLECULARES

El desarrollo de marcadores moleculares de ADN ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética de animales y plantas. El análisis del genoma y la creación de mapas genéticos de alta resolución se están desarrollando a gran velocidad gracias al uso de estos marcadores. Su potencial radica en su elevado número y en la facilidad de análisis por PCR (*Saiki y col. 1988*).

Uno de los principales objetivos de la investigación en producción animal es la de identificar regiones del genoma de nuestros animales asociadas a caracteres de interés. Suelen ser genes que controlan la expresión de caracteres de importancia económica, o asociados a enfermedades. Muchos de estos caracteres se expresan de forma muy variada y son controlados por un elevado número de genes.

Para identificar regiones de ADN asociadas con un carácter en particular, el método más utilizado es el de usar marcadores distribuidos en el genoma para analizar una población que muestra variación fenotípica para ese carácter (referida a una población control). Analizando la asociación de varios alelos segregando en cualquier de los marcadores con el carácter de interés nos permite identificar las regiones de esos genes.

Los marcadores genéticos más utilizados son los basados en clonación y secuenciación de fragmentos de ADN, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (*fingerprint markers*) (*Dodgson y col. 1997*).

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad (*Cheng y Crittenden 1994*):

- a) Buena distribución a lo largo del genoma,
- b) Alto grado de polimorfismo
- c) La técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica
- d) Debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios

Si nuestro trabajo se centra en el estudio de una especie en concreto, los marcadores moleculares que presentan alto grado de variabilidad intraespecífica son las herramientas más útiles para realizar numerosos tipos de análisis en nuestras poblaciones (*Dawson y col. 1997*).

A continuación se detallan las características de algunos de tipos de marcadores moleculares más utilizados actualmente, y sus aplicaciones.

1.4.1. MICROSATÉLITES

1.1.4.1. CARACTERÍSTICAS

También denominados STRs (*short tandem repeats*) (*Hancock 1999*).

Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones en tándem de unidades de 2-6 nucleótidos (pe (CA)_n). La variación en el número de repeticiones es lo que constituye los múltiples alelos, transformándolos en marcadores muy polimórficos (*Tautz 1989, Gibbs y col. 1997*). Parece ser que éstos se generan por un fenómeno de deslizamiento sobre la secuencia repetida durante la replicación de ADN (*Schlötterer y Tautz 1992*).

Su análisis está basado en la amplificación por PCR, de modo que se realiza de forma fácil, rápida, a bajo coste y la cantidad de ADN necesaria para su realización es mínima (*Cheng y col. 1995, Luikart y England 1999*).

Los microsatélites pueden analizarse empleando geles de poliacrilamida y tinción de nitrato de plata o bromuro de etidio, mediante autorradiografía o, lo más habitual, mediante sistemas automatizados de electroforesis con marcaje fluorescente.

Los microsatélites están más o menos distribuidos a lo largo del genoma de los eucariotas, pero en baja frecuencia en las regiones codificantes y, quizás, telómeros, aunque su presencia en regiones codificantes se ha asociado a enfermedades (*Hancock 1999, Armour y col. 1994, Tautz y Schötterer 1994*).

Sin embargo todavía se desconoce el significado funcional de estas secuencias, aunque la hipótesis más aceptada apunta a que están relacionados con el empaquetamiento y condensación del ADN en los cromosomas de los eucariotas (*Vanhala y col. 1998*).

Las características de estas secuencias los han convertido en marcadores moleculares de elección para diversos tipos de estudios:

Identificación individual y relaciones de parentesco:

El elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos.

Además, el hecho que presenten herencia mendeliana, los convierte en marcadores de elección para tests de paternidades y elaboración de genealogías. En múltiples trabajos se ha demostrado que los alelos de los microsatélites segregan mendelianamente (Revisión por *Ellegren 1992, Dawson y col. 1997, Hanotte y col. 1994*). Ello se hace usando como control familias de genealogía conocida, y comprobando que todos los descendientes comparten uno de los alelos con el padre y otro con la madre.

El análisis de paternidades permite evaluar a los reproductores como tales, evaluando su éxito en producir descendencia, pero en las aves también son muy utilizados en estudios ecológicos, de comportamiento sexual y en biología evolutiva.

Por ejemplo, *Ellegren (1992)* utilizó los microsatélites para detectar fertilizaciones foráneas (descendencia ilegítima) en aves silvestres. En otro trabajo, se estudió la fidelidad al nido, año tras año, de los halcones, mediante el análisis de los polluelos de las distintas temporadas (*Nesje y col. 2000*). La utilidad y fiabilidad de los microsatélites también han sido comprobadas cuando no se tiene conocimiento *a priori* de ninguno de los progenitores, en especies de aves de incubación parásita (aves que ponen sus huevos en nidos de otras aves, para que éstas los incuben) (*Alderson y col. 1999*).

En lo que se refiere a otras relaciones de parentesco distintas de las paternidades, los microsatélites fueron usados en un trabajo con ratones silvestres para diferenciar grados de parentesco de primer grado (padre descendiente, hermanos) y segundo grado (medios hermanos). Los autores utilizaron 20 microsatélites de heterozigosidades moderadas (0,62-0,75), y obtuvieron un 97% y 80% de éxito respectivamente (*Blouin y col. 1996*).

Con un número de marcadores relativamente pequeño, especialmente si presentan elevado polimorfismo, se tiene suficiente poder de resolución para analizar relaciones de parentesco e identificaciones individuales (*Dawson y col. 1997*).

Evaluación de polimorfismo y estudios poblacionales:

Probablemente esta es el área en que han sido más extensamente utilizados.

El estudio de estos marcadores permite la identificación de cada alelo por locus, y obtener datos poblacionales de los animales, tal como las frecuencias alélicas, las cuales, a su vez, permiten estimar distancias genéticas entre poblaciones (*Ponsuksili y col. 1999, Bowcock y col. 1994*).

Para ello se han desarrollado nuevos métodos estadísticos, que se ajustan a los datos generados por estos marcadores (*Slatkin 1995, Goldstein y col. 1995A y 1995B, Goodman 1997, England 1999*). Estos métodos han sido revisados recientemente por Luikart y England (1999).

Son muchos los ejemplos de estudios de cálculo de polimorfismo y distancias genéticas entre poblaciones cercanas. En mamíferos se han usado tanto para estudios de nivel de polimorfismo en especies en peligro de extinción (*Ali y col. 1999*) como en el estudio del origen geográfico de diversas poblaciones humanas (*Bowcock y col. 1994*).

Más relacionado con nuestro campo de interés, hay múltiples estudios poblacionales realizados mediante microsatélites, tanto en aves silvestres (*Dawson y col. 1997, Shou-Hsien Li y col. 1997, Neumann y Wetton 1996, Hanotte y col. 1994*) como en aves domésticas, sobre todo en pollos (*Zhou and Lamont 1999, Vanhala y col. 1998, Ponsuksili y col. 1999, Takahashi y col. 1998, Crooijmans y col. 1993*).

Mapas genéticos:

Al tratarse de marcadores polimórficos, abundantes y distribuidos aleatoriamente a lo largo del genoma, se han utilizado extensamente en la elaboración de mapas genéticos.

Existen proyectos internacionales para elaborar estos mapas en las principales especies domésticas (Roslin Institute, <http://www.ri.bbsrc.ac.uk>), en los que encontramos abundantes marcadores microsatélites descritos. Por ejemplo, el mapa genético del pollo (ChickMap) tiene posicionados más de 360 microsatélites, descritos por varios autores (p.e. *Cheng y Crittenden 1994, Khatib y col. 1993, Gibbs y col. 1995*).

Un mapa genético bien surtido de marcadores es una herramienta muy útil para identificar genes responsables de caracteres de interés. Se trata de buscar asociación entre varios alelos, en cualquiera de los marcadores, segregando en poblaciones que presentan el carácter de interés, para identificar regiones del genoma donde es más probable que se encuentre el gen responsable de ese carácter (*Cheng y col. 1995*).

Estudios evolutivos:

Desde un punto de vista evolutivo, los microsatélites son interesantes porque están presentes en la mayoría, sino en todos, los genomas de los organismos superiores (*Hancock 1999, Longmire y col. 1999*), y el estudio de la presencia de estos marcadores en nuevas especies puede dar una idea de la distribución evolutiva de los mismos (*Longmire y col. 1999*).

Para la aplicación de los microsatélites al estudio evolutivo de las especies es imprescindible estudiar los fenómenos de mutación de los propios marcadores.

La tasa de mutación en secuencias microsatélites es muy superior a la de secuencias únicas no codificantes (*Primmer y Ellegren 1998*). Se calcula que su frecuencia está entre $2,5 \times 10^{-5}$ a 10^{-2} mutaciones por generación (revisado por *Weber y Wong 1993*).

Los estudiosos de la evolución de los microsatélites en aves, intentan averiguar qué modelo de mutación siguen estas secuencias, y existen aproximaciones teóricas basadas en modelos matemáticos que comparan número de alelos o heterocigosidad observada y esperada, para estudiar su modelo de mutación (*Primmer y Ellegren 1998*).

En los primeros trabajos donde se utilizaron los microsatélites para estudios de genética de poblaciones y evolución, los modelos testados fueron el SMM (*Stepwise Mutation Model*) y el IAM (*Infinite Allele Model*) (*Estoup y col. 1995*).

Al principio se esperó que los microsatélites siguieran el SMM, pero los análisis experimentales demostraron que no se trata de un modelo simple (*Goldstein y Schlötterer 1999*). Parece que, dependiendo del tamaño de la unidad de repetición, un microsatélite se adapta más a un modelo o al otro. Los microsatélites de repeticiones de 3-5 pb parece que sí siguen el SMM (*Tautz y Schlötterer 1994*), mientras que los de 1-2 pb siguen el IAM (*Vanhala y col. 1998*), al igual que los minisatélites (repeticiones de 15-70 pb) (*Estoup y col. 1995*).

Además de las aproximaciones teóricas del modelo, existen una serie de observaciones empíricas, confirmadas por varios autores y trabajos, que nos pueden ser de utilidad en el estudio de la evolución (mutación) de los microsatélites:

1. Las mutaciones suelen ser paso a paso, cada vez incrementa una unidad de repetición: Las mutaciones en los microsatélites involucran únicamente una unidad de repetición en la gran mayoría de los casos (*Weber y Wong 1993, Goldstein y Schlötterer 1999*).
2. Tendencia al aumento del número de repeticiones: Las mutaciones causan con mayor frecuencia un aumento en el número de repeticiones más que una disminución, es decir,

- que la frecuencia de mutaciones es mayor cuanto mayor es el número de repeticiones en un alelo (a más longitud, más polimorfismo) (*Primmer y col. 1996A y 1996B*).
3. Mayor tasa de evolución en unidades de repetición mayores: Tanto Primmer y Ellegren (1998) como Weber y Wong (1993) en humanos, encontraron una tasa de mutación (evolución) mucho mayor en microsatélites de unidades de repetición de 4pb que en microsatélites de 2pb. Ello puede estar más o menos relacionado con la observación de que el número de mutaciones es mayor cuanto mayor es el número de repeticiones, haciendo alusión ambas a un mayor tamaño de la secuencia repetida.
 4. Las interrupciones en la secuencia repetida conllevan a una disminución del polimorfismo: Ello es debido, probablemente a la interrupción del proceso de deslizamiento generador de polimorfismo (*Schlötterer y Tautz 1992, Primmer y Ellegren 1998*). Las interrupciones en las secuencias repetitivas parecen estabilizar el tándem de repeticiones, haciendo que los microsatélites interrumpidos sean menos variables que los puros o perfectos (*Estoup y col. 1995*). Ello está de acuerdo con la observación de que una sustitución nucleotídica es lo que suele transformar un microsatélite perfecto en uno imperfecto (*Angers y Bernatchez 1997*).
 5. Menor polimorfismo a más distancia evolutiva: Los microsatélites son más polimórficos en la especie de origen en la que fueron clonados, que en las especies parecidas o cercanas en las que también amplifican (*Ellegren y col. 1995, Primmer y col. 1996B*). Los loci son bastante estables en distancias evolutivas moderadas, no demasiado lejanas, ya que se conservan entre especies, o por lo menos sus regiones flanqueantes, donde se sitúan los cebadores (*Tautz y Schlötterer 1994*).
 6. La tasa de mutación puede ser distinta entre sexos: En el trabajo de Weber y Wong (1993) existe una mayor tasa de mutación en machos que en hembras, justificado por el hecho de que en la espermatogénesis existen más divisiones celulares que en la ovogénesis.
 7. Asociación de tripletes a enfermedades: Se han descrito expansiones anormales de microsatélites de repeticiones de 3 nucleótidos, que se asocian con el fenómeno de Anticipación (aparición de enfermedades en edades más tempranas) (Revisado por *Goldstein y Schlötterer 1999*).

1.4.1.2. ALELOS NULOS Y HOMOPLASIA

Algunos factores pueden disminuir el poder y la sensibilidad de los microsatélites como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Los dos factores principales son los alelos nulos y la homoplasia.

Alelos nulos

Se habla de alelos nulos cuando un alelo no puede ser amplificado, debido, principalmente, a una mutación en el punto de hibridación del cebador. Ese alelo no amplifica y el individuo es catalogado como homocigoto (*Dawson y col. 1997*).

La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia es baja. En caso de identificación de paternidades, cabe sospechar la presencia de alelos nulos cuando todos los marcadores apuntan a un progenitor homocigoto para el marcador excluyente, y que el descendiente sea también homocigoto para ese marcador, con el alelo maternal. Un alelo nulo puede conllevar a excluir a estos animales como posibles progenitores en un análisis de paternidad y, además, desviar las estimaciones de frecuencias alélicas en poblaciones.

Otro método para sospechar la presencia de alelos nulos es el cálculo de la Deficiencia de Heterocigotos para el equilibrio Hardy-Weinberg, aunque en el caso de Alderson y col. (1999) este análisis no les sirvió para detectar su alelo nulo, que se presentaba con una frecuencia de hasta 6,2% en su población.

Para solucionar el problema de los alelos nulos se pueden diseñar cebadores alternativos fuera del punto de la mutación y volver a analizar a los individuos clasificados como homocigotos (*Dawson y col. 1997, Neumann y Wetton 1996, Mundy y Woodruff 1996*).

Homoplasia

Homoplasia es el hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño pero no debido a que sean idénticos, sino a que los tomamos como idénticos por tener el mismo tamaño, pero existen diferencias en su estructura, inserciones de una parte y deleciones de otra, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (*Primmer y Ellegren 1998*).

Éste es un tipo de polimorfismo que se puede detectar únicamente por secuenciación, y no puede pasar inadvertido en caso de analizar a nuestros animales mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños.

La homoplasia en los tests de paternidad y parentesco nos puede hacer atribuir una relación cuando no la hay o viceversa.

También puede ser fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo, y, por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia. (Tautz y Schlötterer 1994).

1.4.1.3. MICROSATÉLITES EN EL GENOMA AVIAR

El genoma de las aves es pequeño, en comparación con el de los mamíferos ($1,2 \times 10^9$ pb genoma aviar versus 3×10^9 pb en mamífero) (Gibbs y col. 1997). Además, sus intrones son más cortos y presenta menos elementos repetitivos (a modo de ejemplo, los LINE/SINE de las aves no tiene cola poliA, que son origen de elementos repetitivos simples en mamíferos) (Primmer y col. 1997, Longmire y col. 1999).

Puesto que el número de microsatélites suele tener una correlación positiva con el tamaño del genoma, no debe sorprendernos la cantidad de trabajos que constatan la escasez de microsatélites en el genoma de las aves en comparación con el de los mamíferos (Primmer y col. 1997, Ponsuksili y col. 1999, Gibbs y col. 1997).

Se estima que en las aves se encontraría, como media, un microsatélite pequeño (tomando como modelo $(CA)_{10}$) cada 20-39 Kb, y hasta uno cada 136-150 Kb para microsatélites mayores (Primmer y col. 1997). Ello supone, por ejemplo, entre 10 y 20 veces menos que en humano.

En el avestruz se han descrito hasta el momento 29 microsatélites (Primmer y col. 1996B, Ward y col. 1998, Kumari y Kemp 1998, Kimwele y col. 1998) (Tabla 4) y todos ellos están formados por repeticiones de 2 pb.

En el trabajo de Kimwele y col. (1998) se evalúa el polimorfismo mediante el cálculo de la heterozigosidad, que oscila entre 0,40 y 0,79. Teniendo en cuenta que sólo se analizan 14 animales, las heterozigosidades son elevadas y por lo tanto se trata de marcadores muy polimórficos. Algunos de estos microsatélites también amplificaron en otras ratites (Casuario, Ñandú y Emu).

Ward calcula la heterozigosidad y la PIC (Índice de polimorfismo de cada marcador) para 5 de los marcadores que describe (Ward y col. 1998), pero no muestra datos sobre el número de alelos ni animales estudiados para los marcadores VOS2 y VIAS-OS10. En la mayoría de los casos, la heterozigosidad y el valor de PIC también confirman el elevado polimorfismo de los microsatélites de avestruz.

Tabla 4. Microsatélites descritos en el avestruz

Nombre	Autor (año)	Alelos (animales)	Identificación	Observaciones
VOS2	Ward y col. (1994)	-	EMBL: SCREPOLYM	
VIAS-OS8	Ward y col. (1995)	5(49)	EMBL: SC22053	
VIAS-OS14	Ward y col. (1995)	18(50)	EMBL: SC22435	
VIAS-OS10	Ward y col. (1995)	-	EMBL: SC22436	
HrU2	Primmer y col. (1996B)	1(9)	GenBank AF051704	Conservado en 48 especies de aves
VIAS-OS4	Ward y col. (1998)	12(41)	EMBL: AJ002877	
VIAS-OS22	Ward y col. (1998)	5(49)	EMBL: AJ002878	
VIAS-OS29	Ward y col. (1998)	18(47)	EMBL: AJ003011	
LIST001	Kumari y Kemp (1998)	9(18)	GenBank U85808	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST002	Kumari y Kemp (1998)	6(18)	GenBank U85809	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST003	Kumari y Kemp (1998)	5(18)	GenBank U85810	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST004	Kumari y Kemp (1998)	7(18)	GenBank U85811	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST005	Kumari y Kemp (1998)	10(18)	GenBank U85812	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST006	Kumari y Kemp (1998)	7(18)	GenBank U85813	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST007	Kumari y Kemp (1998)	5(18)	GenBank U85814	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST008	Kumari y Kemp (1998)	5(18)	GenBank U85815	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST009	Kumari y Kemp (1998)	13(18)	GenBank U85816	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST0010	Kumari y Kemp (1998)	7(18)	GenBank U85817	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST0011	Kumari y Kemp (1998)	10(18)	GenBank U85818	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST0012	Kumari y Kemp (1998)	5(18)	GenBank U85819	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST0013	Kumari y Kemp (1998)	4(18)	GenBank U85820	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
LIST0014	Kumari y Kemp (1998)	5(18)	GenBank U85821	Animales <i>S. c. massaicus</i> y <i>S. c. molybdophanes</i>
OSM1	Kimwele y col. (1998)	9(14)	GenBank AF003729	Animales <i>S. c. massaicus</i>
OSM2	Kimwele y col. (1998)	6(14)	GenBank AF003730	Animales <i>S. c. massaicus</i>
OSM3	Kimwele y col. (1998)	4(14)	GenBank AF003731	Animales <i>S. c. massaicus</i>
OSM4	Kimwele y col. (1998)	5(14)	GenBank AF003732	Animales <i>S. c. massaicus</i>
OSM5	Kimwele y col. (1998)	6(14)	GenBank AF003733	Animales <i>S. c. massaicus</i>
OSM6	Kimwele y col. (1998)	5(14)	GenBank AF003734	Animales <i>S. c. massaicus</i>
OSM7	Kimwele y col. (1998)	7(14)	GenBank AF003735	Animales <i>S. c. massaicus</i>

1.4.2. RAPDs (*RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA*)

También llamado AP-PCR (*Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction*)

(*Ali y col. 1999*).

Los marcadores tipo RAPDs (*Williams y col. 1990*) son secuencias de ADN amplificadas sobre el genoma al azar, utilizando cebadores cortos y con unas condiciones de PCR que favorecen la amplificación inespecífica de varias bandas.

Ello se consigue con un número de ciclos elevado, temperaturas de hibridación de los cebadores bajas y concentraciones de MgCl₂ relativamente elevadas. Únicamente se utiliza un cebador por reacción, corto (unos 10 pb) y de secuencia arbitraria. Si dos copias de este cebador se unen a cadenas opuestas del ADN desnaturalizado en puntos suficientemente cercanos (< a 5kb) para ser amplificados por PCR, tenemos un marcador RAPD (*Benter y col. 1995*). De promedio, cada cebador amplifica entre 1 y 10 bandas (*Cushwa y Medrano 1996*).

Esta técnica detecta polimorfismo cuando uno o los dos cebadores no se hibrida por diferencias en la secuencia molde complementaria a los cebadores, y desaparece uno de los fragmentos (banda) amplificados (*Cushwa y Medrano 1996*). Las inserciones, deleciones o inversiones en el ADN también generan polimorfismo por presencia/ausencia de bandas o variación en el tamaño de éstas (*Williams y col. 1990, Welsh y McClelland 1990*).

Por lo tanto se trata de un tipo de marcadores de elección para evaluación de polimorfismos, especialmente cuando no se tiene información previa del genoma de la especie que estamos estudiando (*Williams y col. 1990*).

La facilidad de realización, mediante amplificación por PCR y análisis por electroforesis en gel de agarosa la convierten en una técnica fácil, rápida y de bajo coste (*Bezuidenhout 1999*).

Sin embargo, las propias características de la técnica pueden facilitar que aparezcan problemas de repetibilidad en los análisis. Factores como la cantidad de ADN molde, el tipo y cantidad de polimerasa utilizada, concentración de MgCl₂, contenido GC del cebador y la eficiencia del termociclador y perfil térmico del programa, pueden afectar a la amplificación. Por ello los protocolos de RAPDs-PCR deben optimizarse siempre para cada aplicación (*Cushwa y Medrano 1996, Benter y col. 1995, Ambady y col. 1996*).

Son muchos los trabajos en los que se ha usado este tipo de marcadores, y con aplicaciones muy diversas: caracterización de razas o especies (*Welsh y McClelland 1990, Chun-I Lee y*

Chang 1994, Bezuidenhout 1999), identificaciones forenses (*Chun-I Lee y Chang 1994*), estructura de poblaciones (*Lynch y Milligan 1994, Haig y col. 1994*), detección de polimorfismos (*Smith y col. 1996, Carpio y col. 1996, Plotsky y col. 1995,*), mapas genéticos y físicos (*Horvat y Medrano 1996, Levin y col. 1993*), identificación de marcadores asociados a regiones específicas del genoma (*Horvat y Medrano 1996*) e identificación de marcadores de sexo en mamíferos (*Wardell y col. 1993, Cushwa y Medrano 1996*) y en aves (*Levin y col. 1993, Griffiths y Tiwari 1993, Sabo y col. 1994, Griffiths y col. 1998, Lessels y Mateman 1998*).

1.4.3. SNPs (*SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM*)

Es el tipo de marcadores más desarrollado en el último año/dos años, principalmente en la elaboración de mapas genéticos mucho más densos de los que pueden obtenerse con otro tipo de marcadores, como, por ejemplo los microsatélites.

En el caso de las aves, además, la baja densidad de microsatélites en su genoma, y, en especial, en los microcromosomas (más ricos en región codificante que macrocromosomas o cromosomas intermedios) supone un obstáculo para el desarrollo de un mapa genético rico en marcadores, útil, por ejemplo, para la localización de QTLs (*Primmer y col. 1997*), y los SNPs podrían ser una buena alternativa como marcadores para la elaboración de mapas.

Los SNPs son polimorfismos de un solo par de bases, en el que podemos encontrar distintos nucleótidos (alelos) en la secuencia de individuos normales, siempre que la frecuencia de estos alelos sea $>1\%$ (*Brookes 1999*). Formalmente las inserciones/delecciones de un nucleótido no son considerados SNPs, por lo tanto estos marcadores podrían tener un máximo de hasta cuatro alelos (*Brookes 1999*) aunque habitualmente son dialélicos.

Se estima que la frecuencia media con que aparecen estos polimorfismos es entre 1/100 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/SNP/index.html>) y 1/1000 pb (*Brookes 1999*), siendo menos frecuentes en regiones codificantes que no codificantes.

Aunque se trata de marcadores menos informativos que los utilizados hasta ahora, su poder radica en su elevado número, ya que son los marcadores más frecuentes en el genoma. A modo de ejemplo, con fecha 21 de Nov. 2000, en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) constan más de 2,5 millones de SNPs descritos en humanos.

La utilidad de los SNPs, además de la elaboración de mapas, se basa en establecer asociaciones, a gran escala, entre éstos y fenotipos heredables (pe. enfermedades o caracteres de interés de cualquier tipo), por lo que su desarrollo debe acompañarse de una tecnología adecuada que no limite su potencial, tanto en consulta en bases de datos (SNPs descritos pueden consultarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> y, para SNPs humanos, <http://hgbase.interactiva.de>) (Brookes 1999), como en detección y genotipado (Ellis 2000, Wang y col. 1998, Germer y Higuchi 1999).

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo global de esta tesis es el desarrollo de marcadores moleculares de ADN de interés en el avestruz. El criterio seguido para la selección del tipo de marcadores en los que trabajar fue el resultado de las necesidades planteadas por los mismos criadores (convenio UAB-GEN-ES: Genètica de l' ESTRUÇ) y por los nuevos retos que surgieron en el desarrollo del presente trabajo, así como nuevas técnicas experimentales. En función del tiempo y medios disponibles, del interés científico y la aplicación práctica y utilidad de los marcadores para la cría de los avestruces, se establecieron como prioritarios los siguientes objetivos:

1. Desarrollo de un protocolo de obtención de ADN a partir de plumas. Es importante que las muestras para la extracción de ADN sean fáciles de obtener y sin riesgo para el animal o criador. Además el ADN obtenido debe ser en suficiente calidad y cantidad para garantizar el análisis de cualquiera de los marcadores descritos.
2. Desarrollar un marcador de ADN que permita determinar el sexo de los avestruces a cualquier edad. Un método seguro y que se pueda aplicar de forma sencilla, rápida y a bajo coste.
3. Desarrollar marcadores que permitan la identificación individual de los animales. Que sea fiable, inalterable y útil hasta la identificación en matadero, incluso en el despiece. Ello resolvería los problemas que plantean la identificación por crotales o chips, usados en la actualidad.
4. Desarrollar un sistema fiable de identificación de paternidades y control de genealogías, para evitar cruces consanguíneos, evaluar a los reproductores y como soporte básico en la selección.
5. Identificación genética de las subespecies de avestruces. Por su aplicación de cara a la mejora de los híbridos comerciales, conocer el material genético de partida y cómo mejorarlo. También por su interés en el estudio taxonómico y evolutivo de la especie.
6. Iniciarse en la identificación de marcadores polimórficos en el genoma del avestruz. Marcadores que un día puedan asociarse a genes de interés, o a enfermedades.

CAPÍTULO 1: OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE PLUMAS

La obtención de ADN a partir de plumas facilita enormemente la recogida de muestras para su análisis en estos animales.

Aunque no fue uno de los objetivos planteados desde el inicio de esta tesis, sí lo fue en cuanto los primeros criadores empezaron a solicitar el análisis de algunos ejemplares para esos marcadores.

Los criadores se enfrentaban a una nueva dificultad cuando se les pedía sangre de sus animales para la obtención de su ADN, y para muchos este punto fue la causa para que se retiraran en su iniciativa de sexar o identificar a sus animales por marcadores moleculares.

Aunque la sangre es el tipo de muestra de elección para la obtención de ADN, el sistema de explotación extensivo junto con la complejidad de manejo de los avestruces adultos dificultan mucho su extracción, cosa que no ocurre con las plumas, ya que éstas pueden incluso recogerse del suelo, sin molestia alguna para el animal ni peligro para el granjero, especialmente en época reproductiva.

Se puso a punto un protocolo de obtención de ADN genómico a partir del tejido folicular de la pulpa de la pluma y de las células desescamadas de la punta del cañón.

El tamaño de la pluma del avestruz facilita la obtención de grandes cantidades de ADN a partir de una sola pluma.

Se optimizó el protocolo para conseguir ADN en suficiente cantidad y calidad para realizar diversos y numerosos análisis moleculares a partir de una muestra. Ha sido el primer protocolo publicado que permita obtener ADN genómico de estas características.

Este protocolo también se modificó y adaptó para su uso en plumas pequeñas, de aves de corta edad, u otro tipo de aves adultas (principalmente loros y rapaces), y su utilidad ha sido confirmada en nuestro laboratorio con su aplicación en más de 3000 aves pertenecientes a 150 especies distintas.

Artículo enviado y aceptado en *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*

ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM FEATHERS

Natalia Bello, Olga Francino, Armand Sánchez

Unitat de Genètica i Millora, Departament de Patologia i Produccions Animals.
Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra, (Barcelona) Spain.

Received for publication September 20, 1999

Accepted for publication June 19, 2000

ABSTRACT

The use of feathers in veterinary clinical practice simplifies the sampling of genomic DNA, specially when blood extraction is difficult due to the age or the size of the bird. This report describes a rapid and accurate protocol to isolate high quality genomic DNA from feathers. The technique includes a lysis step of the feather quill, which differs in temperature and time of incubation depending on the feather size. Purification of genomic DNA is performed with phenol: chloroform: isoamyl alcohol extraction and ethanol precipitation as described elsewhere. This protocol consistently provided significant amounts of high quality genomic DNA from more than 800 birds belonging to 120 different avian species. Genomic DNA isolated with this method was used for Southern blotting and also in several PCR systems devoted to sex determination and paternity testing.

Molecular markers are widely used in veterinary clinical practice for sex identification, marker assisted selection, parentage testing and infectious and genetic disease diagnosis.^{1,4,8} Using feathers as a genomic DNA source, instead of blood, minimizes the stress of the bird and simplifies sampling, particularly when studying large bird species such as ostrich and emu. Moreover, in juvenile birds and small parrots, the small size of the blood vessels makes blood extraction very difficult. This report describes a rapid and accurate protocol to isolate high quality genomic DNA from fresh feathers conserved two weeks at room temperature or up to one month at 4°C. A 0.5-1 cm section was cut from the terminal portion of the feather quill and placed in a 1.5 ml Eppendorf tube containing 500 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8; 2% SDS) and proteinase K at a final concentration of 175 µg/ml. Lysis temperature and incubation time was different depending on the feather size. When dealing with feathers from large birds, such as ostriches or big parrots, or when the feather quill contained soft tissue or blood (as in new growing feathers), the lysis was performed at 37°C over night with gentle shaking. On the other hand, when using small feathers devoid of soft tissue and blood, samples were incubated at 56°C for 4 hours and shaking was not necessary. After the lysis step, samples were vigorously vortexed to homogenize the lysate and centrifuged at 12000xg for 10 minutes only if non-digested soft tissue was present. The supernatant was transferred to a clean 1.5 ml Eppendorf tube and DNA was purified with a mixture of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) as described elsewhere.¹² Subsequently, 50 µl of 2M NaCl and two volumes of ethanol were used to precipitate genomic DNA. To maximize DNA recovery, this step can be performed at -20°C over night. The DNA pellet was washed in 70% ethanol and resuspended in 50-500 µl of TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) or sterile water. When the sample was a large feather or it contained soft tissue/blood, larger volumes were needed to resuspend the DNA pellet, and usually, a further RNase digestion step was required (0.1 µg/µl RNase, 2-3 hours at 37°C).

This protocol has been used to isolate genomic DNA from more than 800 birds belonging to 120 different avian species including parrots, raptorial and ratites. The technique consistently provided significant amounts of non-degraded genomic DNA (from 1 to 100 µg) (Fig. 1). It has been demonstrated that these DNA preparations can be used as template in several Polymerase Chain Reaction (PCR) systems¹¹. For instance either a 110 bp fragment from the Chromodomain-helicase-DNA-binding protein (CHD) gene, which is a sex-marker in non-ratite birds,^{6,7} or a 648bp PCR product from ostrich feathers for sex identification² (Fig. 2) are routinely amplified. Moreover, DNA isolated from feathers was successfully used to perform Southern blotting and to amplify microsatellite markers for paternity testing.

Although there have been published protocols dealing with the isolation of viral DNA from feather follicle tracks,^{3,10} only one other report describes extracting genomic DNA from feathers⁵. This previous report utilized a chelex-based technique that allows denatured genomic DNA to be obtained in minute amounts from ancient samples. The protocol described here has the advantage that the quantity and quality of the DNA preparation can be easily visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, because the DNA yield is of sufficient quantity and the DNA remains double-stranded. This feature allows checking of the amount and integrity of the isolated DNA, two parameters which are essential for the successful optimization of PCR protocols. Degradation of genomic DNA does not necessarily inhibit PCR amplification, particularly when small regions (100-200bp) are amplified,

but usually leads to non-specific amplifications⁹. Moreover, the integrity of genomic DNA is crucial when targeting large DNA fragments (e.g. several Kb) or when more demanding DNA analysis techniques are performed (e.g. Southern blot). Two different lysis procedures have been used depending on the feather size because large feathers contain much more tissue than the small ones, thus requiring a longer digestion time. Interestingly, it has been observed that the presence of contaminating RNA in the DNA samples had an inhibitory effect on PCR amplification. This problem was particularly insidious when using large feathers as a source of DNA, but the addition of a RNase digestion eliminated this problem. In summary, the nucleic acid extraction protocol described here provides a useful tool for extracting genomic DNA from feathers for the purpose of sex determination and other genomic investigations.

Acknowledgements: We are grateful to E. Sánchez for analyzing many of the samples reported in this work and to Dr. M. Amills for his critical reading of the manuscript.

Sources and manufacturers

- a. Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany.
- b. Sigma, St. Louis, MO.

References

1. Alleman AR: 1996, Molecular tools for the diagnosis of animal diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26:1223-1237.
2. Bello N, Sanchez, A: 1999, The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Mol Ecol* 8:667-669.
3. Davidson I, Maray T, Malkinson M, Becker Y: 1986, Detection of Marek's disease virus antigens and DNA in feathers from infected chickens. *J Virol Meth* 13:231-244.
4. Dodgson JB, Cheng HH, Okimoto R: 1997, DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poult Sci* 76:1108-1114.
5. Ellegren H: 1991, DNA typing of museum birds. *Nature* 354:113.
6. Ellegren H: 1996, First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non ratite birds. *Proc R Soc Lond B* 263:1635-1641.
7. Griffiths R, Daan S, Dijkstra C: 1996, Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond B* 263:1251-1256.
8. Hauge JG: 1997, From molecular genetics to diagnosis and gene therapy. *Adv Vet Med* 40:1-49.
9. Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC: 1990, DNA damage Promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 265:4718-4721.
10. Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD et al.: 1989, Characterization of a new virus from cockatoos with Psittacine beak and feather Disease. *Virology* 171:83-88.
11. Saiki R, Scharf S, Faloona F, et al.: 1985, Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Appendix E.3. Editor: Chris Nolan, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Fig. 1: Lane 1Kb: 700 ng of 1Kb ladder marker; Lane 1: *Pionus menstruus* genomic DNA; Lane 2: *Cacatua eleonora* genomic DNA. Lanes 3 to 5: Ostrich genomic DNA: without RNase digestion (3), with RNase digestion (4) and 1/10 dilution (5); Lanes 6 and 7: 50 (6) and 200 (7) ng of λ DNA.

Fig. 2: Lane ϕ Hae: 300ng of X174 DNA ϕ HaeIII marker; Lanes 1-3: Amplification of ostrich 648 bp sex-marker in three females.

Fig. 3: Lanes 1 and 3: Southern blotting on ostrich genomic DNA (female and male) with a sex-specific probe. Lanes 4 and 5: Southern blotting on ostrich amplified DNA. Lane 2 is empty to avoid transfer of the colored signal between the female (lane 1) and the male (lane 3).

Fig. 1

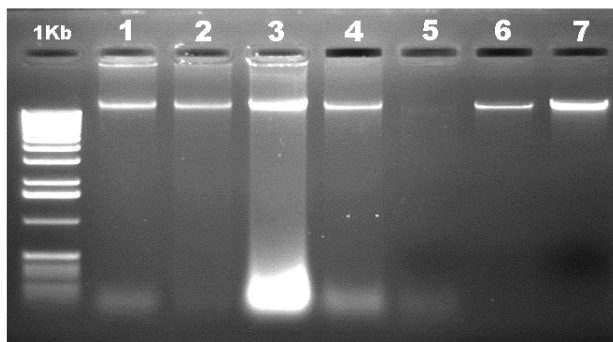


Fig. 2

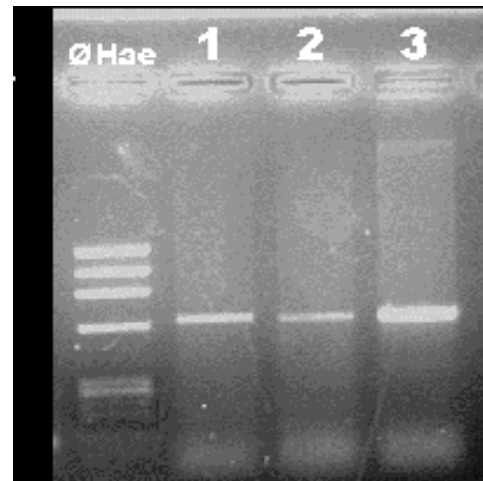
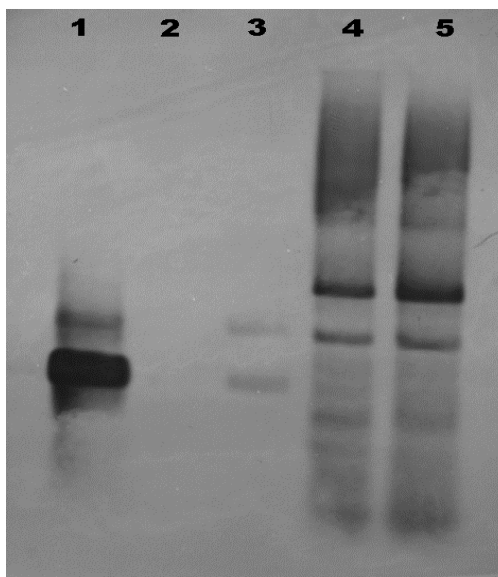


Fig. 3



CAPÍTULO 2: IDENTIFICACIÓN DE UN MARCADOR ESPECÍFICO DE SEXO

El género viene determinado por un par de cromosomas sexuales, que en el caso de las aves son el W y el Z. La hembra es el sexo heterogamético (WZ) mientras que el macho es homogamético (ZZ).

Para obtener un marcador de sexo basta con identificar una secuencia exclusiva del cromosoma W y optimizar una PCR que amplifique únicamente esa región. Para una aproximación de este tipo, y sin ningún conocimiento previo del genoma que estamos estudiando, los RAPDs son los marcadores de elección, ya que permiten registrar el genoma de forma fácil, rápida y aleatoria en la búsqueda de la región de interés.

Para evitar amplificar polimorfismos individuales se trabajó con una estrategia de *pooles* (mezclas) de ADN de machos y de hembras. Tras el análisis de los productos amplificados por 200 cebadores, uno de ellos se confirmó como marcador RAPD de sexado en los avestruces.

La conversión de un marcador RAPD a un marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) se consigue mediante la clonación y secuenciación de la banda amplificada y diseño de cebadores para amplificar de forma específica únicamente nuestro marcador (*Cushwa y Medrano 1996*).

En nuestro caso estos cebadores fueron denominados SS1 y SS2 y amplifican un fragmento de 648 pb en las hembras. Adicionalmente, y como control interno de amplificación del ADN de todos los individuos analizados, se optimizó una PCR múltiplex, en la que también se amplifica uno de los microsatélites de avestruz descritos (*Kumari y Kemp 1998*).

La secuencia del marcador de sexo se introdujo en la base de datos del GenBank, con número de acceso AF063887, y está incluida en el Anexo I.

Tanto el cebador RAPD que dio lugar al marcador de sexo como los cebadores específicos descritos después (SS1 y SS2) se utilizaron para analizar otras aves ratites, en concreto 4 emús, y no ratites (varias especies de rapaces y psitácidas) pero en ningún caso amplificaron una banda del tamaño esperado o que diferenciara los dos sexos.

ADDENDA al Capítulo 2

POSICIONAMIENTO CROMOSÓMICO DEL MARCADOR DE SEXO

Pese a que todas las evidencias apuntan a que nuestro marcador de sexo se encuentra situado en el cromosoma W de las hembras de avestruces (ya que la PCR no amplifica en machos y éste es el único cromosoma del que carecen), nos propusimos recurrir a técnicas de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), PRINS (*Primed In Situ Labeling*) e *in situ* PCR para confirmar su posicionamiento.

Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Francesca Vidal, del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CULTIVO CELULAR

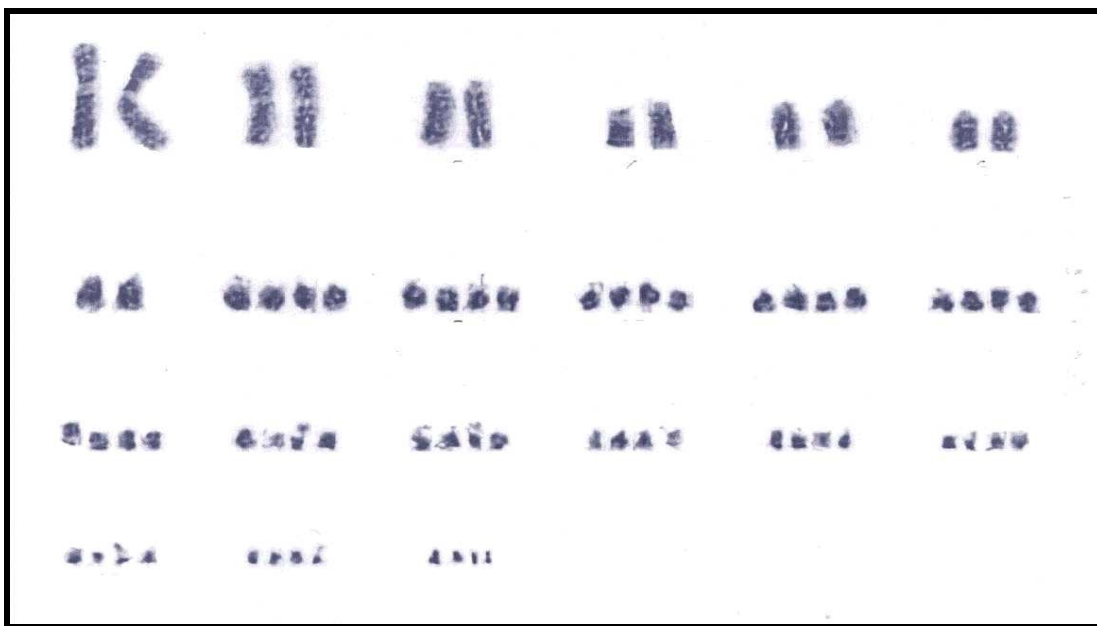
Se cultivaron células a partir de muestras de sangre entera de 2 machos y 2 hembras siguiendo protocolos estándar de citogenética. Al medio de cultivo (RPMI + 20% SFB + 1% glutamina) se le añadió estimulador de linfocitos (PKW, Gibco BRL®) y se cultivaron durante 72h a 37°C en una estufa convencional. Para su visualización se realizaron lavados en carnoico (3:1 metanol:acético) y extensión, fijación y tinción en un portaobjetos.

Se pudieron observar células en división y cromosomas metafásicos, que se separaron y alinearon por pares (Figura 3).

El cariotipo del avestruz consta de 80 cromosomas, de los cuales únicamente los 6 primeros pares son macrocromosomas, y ninguno de ellos es heteromórfico (*Takagi y col 1972*). Los cromosomas W y Z son muy similares (*Griffiths y Orr 1998*). En estudios realizados con FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) únicamente se distinguen por marcadores específicos (*Ogawa y col. 1998*).

Nota: Todos los ensayos para el posicionamiento del marcador de sexado se realizaron por duplicado, con preparaciones de cromosomas de macho y de hembra, para monitorizar cualquier diferencia entre ellas.

Figura 3: Cromosomas metafásicos de avestruz.



Nota: La determinación de tamaño y ordenación de los cromosomas se hizo de forma automatizada de acuerdo con estándares humanos, por eso se presentan pares cromosómicos (microcromosomas) distintos agrupados en un mismo tamaño, y sólo se identifican 35 de los 40 pares cromosómicos descritos en el avestruz.

FISH (FLUORESCENT *IN SITU* HIBRIDIZACIÓN)

La hibridación *in situ* es una técnica citogenética que utiliza sondas específicas para la detección y localización de regiones cromosómicas de interés sobre una extensión, generalmente metafásica (Popescu 1989). Se habla de FISH cuando la detección de la hibridación se hace por marcaje fluorescente.

La hibridación se realizó siguiendo el protocolo del Manual Oncor® (1994) para hibridación *in situ*. La solución de hibridación contiene la sonda marcada con digoxigenina a una concentración final de 5 ng/μl en una solución de formamida. Se probó una desnaturalización por separado (sonda a 75°C y preparación a 73°C) y también una codesnaturalización de ambas (a 75°C).

La hibridación fue a 37°C durante toda la noche, seguida por una serie de lavados post-hibridación y la detección con anti-digoxigenina marcada con fluorescencia. También se realizó una amplificación de la señal de detección mediante anticuerpos (Ac) anti-anti-digoxigenina, marcados con fluorescencia.

En la observación de las preparaciones en el microscopio de fluorescencia no se detectó señal de hibridación.

PRINS (PRIMED *IN SITU* LABELING)

Se trata de una técnica a medio camino entre la hibridación *in situ* y la *in situ* PCR. Se realiza sobre preparaciones celulares o cromosómicas, y se le añaden los mismos componentes que para una PCR, pero con sólo un cebador, específico, y que es el que se hibrida para luego amplificarse con la polimerasa. El programa térmico puede consistir en un solo ciclo con dos pasos: hibridación y elongación. La detección se realiza por observación en el microscopio de fluorescencia. El marcaje puede ser en el cebador o en los nucleótidos libres.

Esta técnica ha sido utilizada con éxito en estudio de regiones específicas en cromosomas tanto metafásicos como en núcleo interfásico (*Rogel-Gaillard y col. 1997, Pellestor y col. 1995; Pellestor y col. 1998; Koch y col. 1989*)

En nuestro caso realizamos distintos ensayos de PRINS, usando uno de los cebadores de la PCR específica de sexado y nucleótidos marcados. Se desnaturalizaron las preparaciones y se fijaron. La mix fue preparada según Pellestor y col. (1995), con ligeras adaptaciones. El programa térmico consistía en un ciclo largo y 27 más rápidos. La temperatura de hibridación del cebador fue la misma que para la PCR específica. Se amplificó la señal de detección mediante Ac fluorescentes.

Este protocolo se realizó por duplicado, usando uno de los cebadores específicos de sexado cada vez.

A la visualización en el microscopio de fluorescencia, observamos múltiples señales en el interior de las células, inespecíficas y sin diferencia entre machos y hembras. No se observaba ninguna señal en los cromosomas metafásicos.

IN SITU PCR

Como último recurso para la localización de forma específica y clara de nuestro marcador, recurrimos a la técnica de *in situ* PCR, por su mayor sensibilidad en la detección de secuencias de copia única (*Gosden y Hanratty 1993*).

Esta técnica permite la realización de una PCR sobre preparaciones cromosómicas, células en suspensión o cortes histológicos (*Bagasra y Seshamma 1993*). Los componentes de la reacción son los mismos que en una PCR convencional, usando ambos cebadores. El programa térmico también es similar, aunque empieza por un ciclo largo de hibridación de los cebadores y elongación, y lo siguen 20-40 ciclos convencionales (*Lewis 1996*). Es una técnica que requiere grandes esfuerzos de optimización, especialmente en la preparación del material biológico y su desnaturalización (*Bagasra y Seshamma 1993*).

Existen dos modalidades de *in situ* PCR, la directa y la indirecta. En la directa el marcaje para su detección viene dado por los cebadores o por los nucleótidos. En la indirecta, tras la amplificación debe haber una hibridación del producto amplificado con una sonda marcada, a modo de hibridación *in situ* (*Lewis 1996*).

Realizamos múltiples ensayos de *in situ* PCR con nuestras preparaciones cromosómicas y los cebadores específicos. En el intento de optimizar la amplificación se probaron combinaciones jugando con distintos ciclos térmicos (de 27 a 35 ciclos rápidos), concentraciones de $MgCl_2$ (1,5; 2,5 y 3,5 mM), cantidades de polimerasa (de 0,2 a 5U) y de marcas comerciales distintas.

Se observaron algunas diferencias en la calidad y localización de la señal, siendo más intensa en glóbulos blancos que en rojos, y con concentraciones de $MgCl_2 > 2,5$ mM, y diferencias según el tipo de polimerasa usado.

A pesar de ello no conseguimos obtener una señal suficientemente clara, única por célula y que no apareciera en los machos. En ningún caso se observó señal sobre los cromosomas.