

## **CAPÍTULO 4: OTROS MARCADORES DE INTERÉS**

Un marcador de ADN es cualquier región del genoma, heredable y que presenta polimorfismo dentro de la población.

Los SNPs son el tipo de marcadores en los que se está trabajando más en los últimos años, por ser los más abundantes, y porque se están desarrollando tecnologías paralelas que permiten aprovechar el conocimiento y uso de toda esa información.

Pero en el caso del avestruz, el conocimiento sobre su genoma es tan escaso, que podemos recurrir a técnicas de homología de secuencia con otras especies (en las que la información disponible es mayor) para la identificación de genes y, simultáneamente, de marcadores.

Se seleccionaron genes descritos en diversas especies, y con un grado de homología que sugiriera alto grado de conservación a lo largo de la evolución. En nuestro caso seleccionamos 4 genes: BCL-XL (Gen involucrado en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos), Nramp (Gen de resistencia natural a patógenos endocelulares), DECR (Gen 2-4 dienoyl CoA reductasa) y GH (Gen de la hormona de crecimiento).

La estrategia consiste en diseñar cebadores sobre la secuencia de regiones conservadas, que permitan su amplificación por PCR. Si la PCR muestra una banda nítida y del tamaño esperado (aproximadamente), se clona y se secuencia. Una vez confirmado que se trata del gen esperado, se busca polimorfismo para esa región, amplificando y secuenciando el producto en distintos individuos.

Para todos los cebadores amplificamos bandas como potenciales secuencias del gen correspondiente en el avestruz. Una vez secuenciadas y comparadas con los genes en las demás especies, sólo en uno de los casos resultó ser la banda esperada. Se trataba de un fragmento de la Hormona de Crecimiento (GH).

### LA HORMONA DE CRECIMIENTO

Por homología de secuencia con el pollo, se comprobó que la banda amplificada correspondía a parte de los Exones 2 y 3 y el intrón 2 del avestruz.

Simultáneamente Komanu y col. (1999) describieron el ADN copia de este gen en el avestruz, y la homología de su secuencia también confirmó los resultados.

Amplificamos, clonamos y secuenciamos este fragmento del gen de la GH en ocho individuos, dos de cada subespecie, y se realizó un alineamiento múltiple de sus secuencias

junto con las del pollo (*Gallus gallus*) y el ADNc del avestruz. Para ello se utilizó el programa Clustal V (Figura 7).

Ambos animales de cada subespecie mostraron secuencias idénticas entre ellos, por lo que sólo se muestra una de ellas en la Figura. Únicamente los dos ejemplares de *S. c. camelus* mostraron un leve polimorfismo, y se incluyen ambas secuencias en el alineamiento.

Los polimorfismos detectados se pueden clasificar en tres grupos (cada tipo ha sido señalado con un color distinto en la Figura 7):

1. Polimorfismos entre las subespecies
2. Polimorfismos entre nuestras secuencias y el ADNc del avestruz
3. Polimorfismos entre el avestruz y el pollo

La homología en las regiones codificantes (exones) era prácticamente del 100% entre el pollo y el avestruz. Incluso los primeros nucleótidos de los extremos del intrón 2, conservan una cierta homología con el intrón 2 del pollo, aunque ésta se pierde enseguida (señalado como --- en el alineamiento).

En la región codificante, únicamente detectamos polimorfismo entre nuestras secuencias y el ADNc, concretamente en dos nucleótidos en el exón 3, en la región de hibridación del cebador. Probablemente se deba al hecho de que nosotros diseñamos los cebadores de acuerdo con la secuencia de pollo, con la que sí existe homología en estos dos nucleótidos, y se trate de un artefacto de la secuenciación, debida, precisamente, al diseño de los cebadores.

Finalmente, entre las secuencias de subespecies se encontraron 3 polimorfismos más, 2 correspondientes a un único nucleótido cambiado (por lo tanto corresponden a marcadores SNPs, SNP1 y SNP2 en la Figura) y el otro debido a un número variable de adeninas (entre 1 y 3). Los SNPs mostraban un nucleótido cambiado únicamente en los dos ejemplares de *S. c. molybdophanes*, mientras que el número de adeninas variaba en función del individuo, tal como ocurre en los dos *S. c. camelus*.

Claves de interpretación de la Figura 7:

cDNA: Secuencia de ADN copia

MASS: *S. c. massaicus*

MOLY: *S. c. molybdophanes*

AUST: *S. c. australis*

CAM 1 y 2: Dos ejemplare de *S. c. camelus*

Gall: Secuencia del pollo (*Gallus gallus*)

\*\*\*\*\* Indica homología de bases en el alineamiento

[EXONES 3 y 2](#)

[CEBADORES](#)

INTRON 2

-  Polimorfismo entre subespecies (en región del Intrón 2)
-  Polimorfismo entre avestruz y pollo (en los extremos del Intrón 2)
-  Polimorfismo entre ADNc de avestruz y nuestra secuenciación (en Exón 3)

CLUSTAL V multiple sequence alignment

```

cDNA      GGGAGCAGGAATGGTTCAGATAAAGTAAACAAAAATGCTGACTGGGAATTTTGTGGCGTGTCTCTGTTCCCTCCGGAATATAGTGGTTC-----
MAS1      GGGAGCAGGAATGGTTCAGATAAAGTAAACAAAAATGCTGACTGGGAATTTTGTGGCGTGTCTCTGTTCCCTCCGGAATATAGTGGTTCCTGTGGGAAATATC
MOL1      GGGAGCAGGAATGGTTCAGATAAAGTAAACAAAAATGCTGACTGGGAATTTTGTGGCGTGTCTCTGTTCCCTCCGGAATATAGTGGTTCCTGTGGGAAATATC
ODT6      GGGAGCAGGAATGGTTCAGATAAAGTAAACAAAAATGCTGACTGGGAATTTTGTGGCGTGTCTCTGTTCCCTCCGGAATATAGTGGTTCCTGTGGGAAATATC
OST3      GGGAGCAGGAATGGTTCAGATAAAGTAAACAAAAATGCTGACTGGGAATTTTGTGGCGTGTCTCTGTTCCCTCCGGAATATAGTGGTTCCTGTGGGAAATATC
OST5      GGGAGCAGGAATGGTTCAGATAAAGTAAACAAAAATGCTGACTGGGAATTTTGTGGCGTGTCTCTGTTCCCTCCGGAATATAGTGGTTCCTGTGGGAAATATC
Gall      *****

```

```

cDNA      -----
MAS1      CCAAATCACTCAGATCTCTTGTTCCTGTACTGGCAGAAGACCATAGACACTTTTCTCAGGCTGTTCTGAATGGTTACTCTTTGCAAAAAAAAAAAAA
MOL1      CCAAATCACTCAGATCTCTTGTTCCTGTACTGGCAGAAGACCATAGACACTTTTCTCAGGCTGTTCTGAATGGTTACTCTTTGCAAAAAAAAAAAAA
ODT6      CCAAATCACTCAGATCTCTTGTTCCTGTACTGGCAGAAGACCATAGACACTTTTCTCAGGCTGTTCTGAATGGTTACTCTTTGCAAAAAAAAAAAAA
OST3      CCAAATCACTCAGATCTCTTGTTCCTGTACTGGCAGAAGACCATAGACACTTTTCTCAGGCTGTTCTGAATGGTTACTCTTTGCAAAAAAAAAAAAA
OST5      CCAAATCACTCAGATCTCTTGTTCCTGTACTGGCAGAAGACCATAGACACTTTTCTCAGGCTGTTCTGAATGGTTACTCTTTGCAAAAAAAAAAAAA
Gall      *****

```

```

cDNA      -----
MAS1      AAAAAAAAAAGAAAGAAAGTGTCTCTGTGCAGGACTGTCAAAATAGGAAGCAGGAGTTCACAAAGTAAATAGTTACTTGSAACTAAAGGCTTCCTCTTTG
MOL1      AAAAAA--AGAAAGAAAGTGTCTCTGTGCAGGACTGTCAAAATAGGAAGCAGGAGTTCACAAAGTAAATAGTTACTTGSAACTAAAGGCTTCCTCTTTG
ODT6      AAAAAAAGAAAGAAAGTGTCTCTGTGCAGGACTGTCAAAATAGGAAGCAGGAGTTCACAAAGTAAATAGTTACTTGSAACTAAAGGCTTCCTCTTTG
OST3      AAAAAAAGAAAGAAAGTGTCTCTGTGCAGGACTGTCAAAATAGGAAGCAGGAGTTCACAAAGTAAATAGTTACTTGSAACTAAAGGCTTCCTCTTTG
OST5      AAAAAA--AGAAAGAAAGTGTCTCTGTGCAGGACTGTCAAAATAGGAAGCAGGAGTTCACAAAGTAAATAGTTACTTGSAACTAAAGGCTTCCTCTTTG
Gall      *****

```

```

cDNA      -----
MAS1      TTAAGCCAAAAGGGCTAATAAAGTGCACAAAAGTATTCAGACTAGGTTCTGCTTAGGAATAGATGACCCCCCATGGACAGCTCTCACCAAGGCAGACATGCT
MOL1      TTAAGCCAAAAGGGCTAATAAAGTGCACAAAAGTATTCAGACTAGGTTCTGCTTAGGAATAGATGACCCCCCATGGACAGCTCTCACCAAGGCAGACATGCT
ODT6      TTAAGCCAAAAGGGCTAATAAAGTGCACAAAAGTATTCAGACTAGGTTCTGCTTAGGAATAGATGACCCCCCATGGACAGCTCTCACCAAGGCAGACATGCT
OST3      TTAAGCCAAAAGGGCTAATAAAGTGCACAAAAGTATTCAGACTAGGTTCTGCTTAGGAATAGATGACCCCCCATGGACAGCTCTCACCAAGGCAGACATGCT
OST5      TTAAGCCAAAAGGGCTAATAAAGTGCACAAAAGTATTCAGACTAGGTTCTGCTTAGGAATAGATGACCCCCCATGGACAGCTCTCACCAAGGCAGACATGCT
Gall      *****

```

cDNA  
 MAS1  
 MOL1  
 ODT6  
 OST3  
 OST5  
 Gall

```

-----
CATGTCATCTGATGGCAA TAGCAGAGACCAGATAGTTTTAAACACTCAGAATTTGGTGAGGGCCATAGGTGACCAACTCAGAAAATCTTGCAAAGAGGTCT
CATGTCATCTGATGGCAA TAGCAGAGACCAGATAGTTTTAAACACTCAGAATTTGGTGAGGGCCATAGGTGACCAACTCAGAAAATCTTGCAAAGAGGTCT
CATGTCATCTGATGGCAA TAGCAGAGACCAGATAGTTTTAAACACTCAGAATTTGGTGAGGGCCATAGGTGACCAACTCAGAAAATCTTGCAAAGAGGTCT
CATGTCATCTGATGGCAA TAGCAGAGACCAGATAGTTTTAAACACTCAGAATTTGGTGAGGGCCATAGGTGACCAACTCAGAAAATCTTGCAAAGAGGTCT
CATGTCATCTGATGGCAA TAGCAGAGACCAGATAGTTTTAAACACTCAGAATTTGGTGAGGGCCATAGGTGACCAACTCAGAAAATCTTGCAAAGAGGTCT
-----
*****

```

cDNA  
 MAS1  
 MOL1  
 ODT6  
 OST3  
 OST5  
 Gall

```

-----
GGCCATAAATCTGACCTGTCTTACTAAGGCGTACTCTCCTTACCCCGAGCTGACAGAGAAGACACCGGATGGTTAAAAATGTCCTCTGTTCTTAGGAACTTAT
GGCCATAAATCTGACCTGTCTTACTAAGGCGTACTCTCCTTACCCCGAGCTGACAGAGAAGACACTGATGGTTAAAAATGTCCTCTGTTCTTAGGAACTTAT
GGCCATAAATCTGACCTGTCTTACTAAGGCGTACTCTCCTTACCCCGAGCTGACAGAGAAGACACCGGATGGTTAAAAATGTCCTCTGTTCTTAGGAACTTAT
GGCCATAAATCTGACCTGTCTTACTAAGGCGTACTCTCCTTACCCCGAGCTGACAGAGAAGACACCGGATGGTTAAAAATGTCCTCTGTTCTTAGGAACTTAT
GGCCATAAATCTGACCTGTCTTACTAAGGCGTACTCTCCTTACCCCGAGCTGACAGAGAAGACACCGGATGGTTAAAAATGTCCTCTGTTCTTAGGAACTTAT
-----
*****

```

cDNA  
 MAS1  
 MOL1  
 ODT6  
 OST3  
 OST5  
 Gall

```

-----
ATTGGCCCCGGGTTGGCGAGCCATGGCACAGTCTCCAAACCACCAAGCTAATGAGCAGGAGATGCTCCGATA CCGCAACACTTACGAACTCITTTGTATG
ATTGGCCCCGGGTTGGCGAGCCATGGCACAGTCTCCAAACCACCAAGCTAATGAGCAGGAGATGCTCCGATA CCGCAACACTTACGAACTCITTTGTATG
ATTGGCCCCGGGTTGGCGAGCCATGGCACAGTCTCCAAACCACCAAGCTAATGAGCAGGAGATGCTCCGATA CCGCAACACTTACGAACTCITTTGTATG
ATTGGCCCCGGGTTGGCGAGCCATGGCACAGTCTCCAAACCACCAAGCTAATGAGCAGGAGATGCTCCGATA CCGCAACACTTACGAACTCITTTGTATG
ATTGGCCCCGGGTTGGCGAGCCATGGCACAGTCTCCAAACCACCAAGCTAATGAGCAGGAGATGCTCCGATA CCGCAACACTTACGAACTCITTTGTATG
-----
*****

```

cDNA  
 MAS1  
 MOL1  
 ODT6  
 OST3  
 OST5  
 Gall

```

-----
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
TCTCAGCAGCCAGGAGGTGAAGATGCTGAGCCCTCAGCAGCGTTGGCAAACAGG
-----
*****

```

## **I. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE PLUMAS**

El desarrollo de marcadores moleculares de interés para la cría de avestruces no tendría sentido si éstos no se llegan a utilizar. El objetivo final de la puesta a punto de este protocolo es facilitar al máximo la tarea a los criadores para que analicen a sus animales mediante marcadores moleculares.

El uso habitual de las plumas como muestra biológica para la obtención de ADN es un método robusto y muy útil en investigación, producción y clínica de aves, donde el uso de estos marcadores moleculares está cada vez más extendido (*Allerman 1996, Dodgson y col. 1997*)

En un principio se optimizó un protocolo de obtención de ADN a partir de sangre, con excelentes resultados. La sangre de avestruz, como la de todas las aves, tiene los glóbulos rojos nucleados, y, por lo tanto, contenedores de ADN. Un ml. de sangre de avestruz contiene, a “grosso modo”, la misma cantidad de células nucleadas que 400 ml. de sangre humana (*Ganong 1990, Spinu y col. 1999*), lo que la convierte en el material biológico de elección para la obtención de ADN genómico en esta especie.

Sin embargo la extracción de sangre en los avestruces no es sencilla. En aves de corta edad, debido al tamaño de los vasos sanguíneos, es necesaria una gran experiencia para obtener sangre en suficiente cantidad y sin dañar al polluelo. En los adultos la dificultad surge por problemas de captura y sujeción del animal (para lo que son necesarias varias personas), así como por conducta agresiva y peligrosa de las aves en época reproductiva.

Otra ventaja del uso de las plumas radica en su estabilidad, ya que no requieren condiciones especiales de conservación. Cuando optimizamos este protocolo, las plumas utilizadas fueron de todo tipo y tamaño. Incluso plumas recogidas del suelo proporcionaron ADN en suficiente calidad y cantidad para su análisis.

Por lo tanto, a modo de resumen, las ventajas del uso de plumas sobre la sangre, se concretan en tres puntos:

1. Más fáciles de recoger.
2. Al poder conservarse a temperatura ambiente no es necesario refrigeración o condiciones especiales en el almacenamiento y envío al laboratorio.
3. El análisis se puede realizar incluso si el animal está ausente (para tomar muestras de nido sin molestar a los reproductores, o en casos de robo o muerte del animal)

Nuestro artículo describe el primer protocolo para la obtención de ADN de buena calidad y cantidad tanto a partir de plumas frescas como plumas con algunos meses de antigüedad.

Existen varios trabajos en los que los autores han trabajado con plumas como material biológico de partida, aunque en algunos casos su finalidad era el aislamiento de ADN viral de patógenos alojados en su cañón y no el ADN aviar (*Davidson y col. 1986, Ritchie y col. 1989*).

En una revisión sobre los trabajos en que se utilizaban plumas como fuente de ADN genómico de la propia ave, hemos hallado que en algunos casos se trataba de muestras de museo, de especies extinguidas (*Robinson y Matthee 1999*) o con más de 100 años de antigüedad (*Ellegren 1991*). O que, pese a ser material fresco, también utilizaron un protocolo de extracción de ADN antiguo, para obtener el material a partir de plumas molidas (*Griffiths y Tiwari 1995*).

El problema de este tipo de protocolos está en la cantidad y calidad del ADN obtenido. *Ellegren (1991)*, mediante una extracción con resina chélex, obtiene pequeñas cantidades de ADN desnaturalizado. En nuestro caso el protocolo permite obtener ADN en suficiente calidad y cantidad para ser evaluado en un gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, porque mantiene su estructura de doble cadena.

En el caso de *Robinson y Matthee (1999)*, el grado de degradación del ADN obtenido de las plumas, les obligó a realizar dos PCRs de fragmentos de pequeño tamaño y solapar sus secuencias para poder analizar la región de 504 pb de ADN mitocondrial objeto de su estudio. Aunque el ADN degradado pueda ser amplificado en pequeños fragmentos, su mal estado puede acarrear problemas de inespecificidad en la amplificación (*Pääbo y col. 1990*).

Otros dos trabajos en aves constatan el uso de plumas, además de la sangre, como fuente de ADN genómico para amplificación por PCR (*Ellegren 1992, Trefil y col. 1999*).

*Ellegren (1992)* amplifica hasta 268pb usando, nuevamente, una resina chélex para la extracción. *Trefil y col. (1999)* describen un protocolo más similar al nuestro, también basado

en una lisis celular e incubación con proteinasa K, pero también incluyen DTT (dithiothreitol) para facilitar la digestión de la pluma (queratina). En su caso amplifican 447pb.

Aunque ambos trabajos demuestran la utilidad de su protocolo para obtener ADN para su amplificación por PCR de fragmentos relativamente pequeños, no hay datos sobre su uso en otro tipo de análisis.

Con el ADN que nosotros hemos obtenido de plumas no sólo se han realizado los análisis moleculares por PCR (donde la cantidad de ADN requerido es poca), sino que ha sido utilizado con éxito para trabajos experimentales en el laboratorio donde la cantidad e integridad de la doble cadena del ADN son cruciales como es el caso de la realización de southernns.

## **II. MARCADORES RAPDs**

En las aves el sexo viene determinado por dos cromosomas, el Z y el W (machos ZZ y hembras ZW). En general se considera que el cromosoma W es de menor tamaño, rico en ADN repetitivo y con pocas secuencias codificantes (*Ellegren y Sheldon 1997, Clinton 1994, Griffiths y Holland 1990, Fridolfsson y col. 1998*).

Las diferencias morfológicas y de tamaño de este cromosoma son la base para el sexado por cariotipo (*Takagi y col. 1972, Popescu 1989*) o por citometría de flujo y espectrofluorometría, que miden el contenido de ADN en el núcleo celular, siendo menor en las hembras (*Nakamura y col. 1990, Rous y col. 1994*).

Posteriormente otras técnicas moleculares se han basado en la identificación de sólo un fragmento o región del cromosoma W para la determinación de sexo. El éxito o fracaso de estas técnicas depende de la proporción y complejidad de secuencias únicas del cromosoma W respecto al Z.

Las primeras técnicas estaban basadas en hibridación diferencial en machos y hembras (*Halverson y Dvorak 1993*), a veces de regiones suficientemente conservadas como para que sirviera de marcador molecular en más de una especie de ave (*Dvorak y col. 1992, Halverson y Dvorak 1993*)

Sin embargo, actualmente las técnicas basadas en la PCR son las de elección, por su rapidez, fácil realización y poco requerimiento de ADN, especialmente cuando la zona del W a amplificar es una región de repeticiones en tándem, ya que permite hacer la PCR a partir de muy pocas células o con pocos ciclos (*Clinton 1994*).

Los primeros ensayos utilizando PCR para la identificación de regiones específicas de las hembras, se realizaban en condiciones poco exigentes (*low-stringency* PCR) utilizando un cebador tipo RAPDs (corto y de secuencia aleatoria) o la mezcla de dos cebadores más largos (20-30 pb) también de secuencia aleatoria (*Griffiths y Tiwari 1993*). Se observó un mayor número de bandas (detección de polimorfismo) cuando se utilizaban los cebadores cortos, y finalmente se optó por ellos como herramienta de rastreo al azar del genoma.

Cuando se trabaja con RAPDs todos los elementos que puedan inducir a variación en la amplificación, y que no sea el propio polimorfismo genético, deben ser eliminados o, por lo menos, minimizado su efecto.

La calidad y cantidad de ADN genómico utilizado es uno de esos elementos. Un exceso de ADN genómico puede inhibir la amplificación (*Lessells y Mateman 1998, Williams y col. 1990*). La presencia de compuestos contaminantes o residuales del proceso de extracción también pueden inhibir la reacción. Aunque estos dos factores deben controlarse en cualquier análisis basado en la PCR, la amplificación de marcadores RAPDs es especialmente sensible, ya que pequeñas variaciones conllevan a aparición/desaparición de bandas (*Cushwa y Medrano 1996*). La identificación de marcadores debe estar basada en reacciones estables y repetibles, por ello, una vez extraídos los ADNs, éstos deben ser cuantificados y visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para comprobar su homogeneidad en aspecto, cantidad e integridad.

Otros aspectos a tener en cuenta son el ciclo térmico y las concentraciones de los componentes de la reacción (mix) de la PCR.

En el ciclo térmico la temperatura de hibridación del cebador vendrá determinada por su contenido en G y C. Sin embargo el hecho de que sea tan corto va a implicar temperaturas muy bajas, alrededor de 36-40°C. Temperaturas superiores a 40°C evitarán la mayor parte de las amplificaciones (*Williams y col. 1990*).

El número de ciclos también varía de unos autores a otros. Nosotros adoptamos la estrategia de Ambady y col. (1996) para aumentar la robustez de las amplificaciones. Ello consiste en realizar los primeros ciclos de la PCR a temperaturas de hibridación en el margen superior de lo que nos permite el cebador, para aumentar la especificidad. Luego, en los ciclos de amplificación exponencial (donde el molde para la polimerasa va a ser, básicamente, las

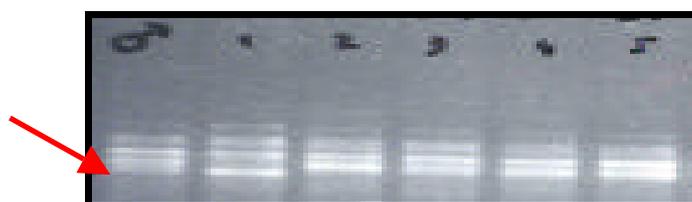
secuencias amplificadas en los primeros ciclos) se baja la temperatura de hibridación, y los ciclos son más rápidos, etapas más cortas (Horvat y Medrano 1995)

En lo que se refiere a los componentes de la reacción (mix) de la PCR, dos de ellos son claves: el tipo de polimerasa utilizado y la concentración de  $MgCl_2$ . En varios trabajos se ha descrito la aparición de polimorfismo en función de la polimerasa utilizada (ver la revisión de Cushwa y Medrano 1996), por lo que es aconsejable especificar siempre la enzima utilizada, especialmente si el trabajo es en colaboración con otros laboratorios.

En cuanto a la concentración  $MgCl_2$ , se estima que si ésta es elevada favorecerá la amplificación de bandas (Ambady y col. 1996), sin embargo también se ha descrito este efecto por concentraciones demasiado bajas (Cushwa y Medrano 1996), lo que sugiere, de nuevo, que lo importante es encontrar unas condiciones de amplificación optimizadas en cada caso.

El uso de *pools* de ADN (*Pool* de ADN: mezcla equitativa de ADNs de individuos que presentan una característica común, en nuestro caso, el género) minimiza la posibilidad de tomar como marcador de sexo una banda de polimorfismo individual (Griffiths y Tiwari 1993, Lessells y Mateman 1998). A pesar de ello, si la banda es intensa, puede manifestarse en el *pool* (Figura 8), por eso es necesario confirmar posteriormente por análisis individual cualquier marcador potencial, y comprobar que está presente en todos y cada uno de los individuos del *pool* (en nuestro caso hembras) y ausente en todos y cada uno de los animales del otro *pool* (machos).

Figura 8. Polimorfismo individual detectado en un *pool* de ADN



En la amplificación del *pool* de ADN (machos) del primer carril, la última banda que aparece (la de menor tamaño) es debida un polimorfismo individual del animal número 1 de los 5 componentes del *pool*.

Nosotros recurrimos a la estrategia del doble *pool* antes de la confirmación individual. Ello consiste en re-analizar los marcadores potenciales en un segundo *pool* formado por individuos distintos, para ver si se mantiene la banda como potencial marcador. Esta estrategia está pensada para evitar el trabajo que supone el análisis individual en los casos de falsos

marcadores (por ejemplo, en nuestro trabajo, con esta estrategia se descartaron 18 de los 29 marcadores potenciales iniciales).

Una vez confirmado individualmente, su análisis por Southern blot permite reconfirmar su uso como marcador de sexo y nos da una idea del número de copias presente en el genoma.

Cuando el cebador RAPD se ha confirmado como marcador de sexo, existen tres alternativas (*Griffiths y Tiwari 1993*):

1. Usarlo directamente en una PCR en condiciones poco exigentes. La ventaja es que las bandas que coamplifican sirven como control de amplificación del ADN.
2. Clonar y secuenciar el fragmento y diseñar cebadores específicos sobre la secuencia. Los cebadores más largos son más específicos, y por lo tanto aumenta la fiabilidad del análisis. Pero, en contrapartida, conlleva a la optimización de un control de amplificación en paralelo, para no atribuir sexo masculino a muestras que, sencillamente, han sufrido un fallo técnico.
3. Si el Southern ha confirmado que se trata de una secuencia únicamente presente en hembras y en elevado número de copias, el método más rápido para el análisis es una hibridación en dot, usando la secuencia como sonda, especialmente para un número elevado de muestras.

El principal inconveniente de este tipo de marcadores es que suelen ser especie-específicos, tal como se ha demostrado en numerosos estudios (*Haig y col. 1994, Griffiths y Tiwari 1993, Lessells y Mateman 1998*). Aunque por otro lado, la identificación de un marcador por RAPD en una especie, que luego se usó como sonda en genotecas de esa y otras especies, es la estrategia que usaron Griffiths y col. en 1996 para la identificación del primer marcador de sexo prácticamente universal para todas las aves, el CHD.

En la Tabla 8 se esquematizan los principales métodos genéticos de sexado usados hasta la actualidad, incluidos los marcadores RAPDs, y sus principales ventajas e inconvenientes.

Tabla 8. Métodos genéticos de sexado: Principales ventajas e inconvenientes

<b>Método</b>	<b>Principales ventajas</b>	<b>Principales inconvenientes</b>	<b>Ejemplos</b>
Cariotipo	Válido para todas las especies	Muy laborioso	<i>Takagi y col. 1972</i>
Espectrofluorimetría	Válido para la mayoría de especies (crom. W significativamente menor que Z)	Requiere de un espectrofluorómetro Requiere muestras de sangre	<i>Rous y col. 1994</i>
Citometría de flujo	Válido para la mayoría de especies (crom. W significativamente menor que Z)	Requiere de un citómetro de flujo	<i>Nakamura y col. 1990</i>
Sondas cromosómicas W	Visualización clara y específica	No útil para todas las especies El desarrollo de la sonda es laborioso	<i>Dvorak y col. 1992</i>
RAPDs	Basado en la PCR Sirve de control positivo de amplificación	Marcadores no universales entre especies Repetibilidad cuestionada	<i>Griffiths y Tiwari 1993</i>
PCR especie-específica	Basado en la PCR Diagnóstico directo por electroforesis	Sólo útil para una especie o familia cercana Desarrollo de control de amplificación	<i>Griffiths y col. 1992</i>
CHD + RFLP	Basado en la PCR Válido para todas las aves no ratites	Adecuación de la enzima en cada especie Riesgo de contaminación con ADN humano	<i>Griffiths y col. 1996</i>
CHD + SSCP	Basado en la PCR Válido para todas las aves no ratites	Requiere equipo de electroforesis para SSCP	<i>Ellegren 1996</i>
CHD + polimorfismo en tamaño del producto	Basado en PCR sin manipulación posterior Válido para todas las aves no ratites	Para algunas especies, el polimorfismo debe resolverse en gel de acrilamida	<i>Griffiths y col. 1998</i>
AFLP	Basado en la PCR Genera un gran número de bandas (50-500)	Digestión enzimática y uso de adaptadores Separación y análisis de bandas complejos	<i>Griffiths y Orr 1999</i>

Fuente: Elaboración propia a partir de bibliografía consultada (la citada en los ejemplos, y además: *Ellegren y Sheldon 1997, Delhanty 1989, Popescu 1989, Lessells y Mateman 1998*)

### **III. MARCADORES ESPECÍFICOS DE SEXO**

En el sexado de las aves existe un marcador específico por excelencia: el gen del CHD (Chromodomain helicase DNA binding protein) descrito por Griffiths y col. en 1996.

Se trata de un gen muy conservado en muchas especies, tanto aves como mamíferos (p.e. la homología pollo - ratón varía entre 85 y 100%, *Griffiths y col. 1996*).

En las aves, este gen está ligado a los cromosomas sexuales, existiendo una copia ligada a cada cromosoma (CHD-W y CHD-Z), con pequeñas variaciones en su secuencia, pero con una elevada homología a nivel aminoacídico (*Fridolfsson y Ellegren 2000*).

El diagnóstico de sexado está basado en técnicas de diferenciación de los dos productos amplificados con los cebadores P2 y P3 en las aves (ver las distintas técnicas en la Tabla 8).

Al principio se realizaba mediante digestión enzimática del producto amplificado (*Lessells y Mateman 1996*), pero posteriormente se describió un cebador, P8 (*Griffiths y col. 1998*), situado más alejado y que incluye un intrón del gen en su amplificación con P2. Este intrón difiere de tamaño entre la copia del gen ligada al W y la que está ligada al Z, lo cual permite el diagnóstico por simple polimorfismo de longitud del producto (en hembras veremos dos bandas y en macho sólo una). El problema es que también difiere el tamaño del producto entre especies, ya que en cada una los intrones son distintos, y hay que optimizar el protocolo para las nuevas especies con una pareja control.

Además se ha observado que para algunas especies la diferencia de tamaño entre los productos es tan pequeña, que debe resolverse en geles de acrilamida, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) o digestión enzimática (*Griffiths y col. 1998*). Recientemente también se ha descrito el uso de la electroforesis capilar para la separación de los dos productos (*Lesaicherre y col. 2000*).

Cuando Griffiths describió el gen CHD y comprobó su utilidad como marcador de sexo, lo hizo en 17 especies de aves distintas, y con representantes de las dos infraclases principales (Neoaves y Eoaves). Ello sugería que este gen estaba conservado en toda las aves (el avestruz es un Eoave, pero el pollo también, que es el que usó como principal representante de esta infraclase). Sin embargo no es así, el CHD es un gen que permite un método de sexado universal para todas las aves EXCEPTO ratites (*Ellegren 1996, Griffiths y col. 1996, Griffiths y col. 1998*).

Cuando se ha clonado el CHD en avestruces, siempre ha resultado una secuencia única, sugiriendo que ambas copias (W y Z) son idénticas o que el cromosoma W carece de su copia homóloga al CHD-Z (*Kahn y Quinn 1999, Ogawa y col. 1998*).

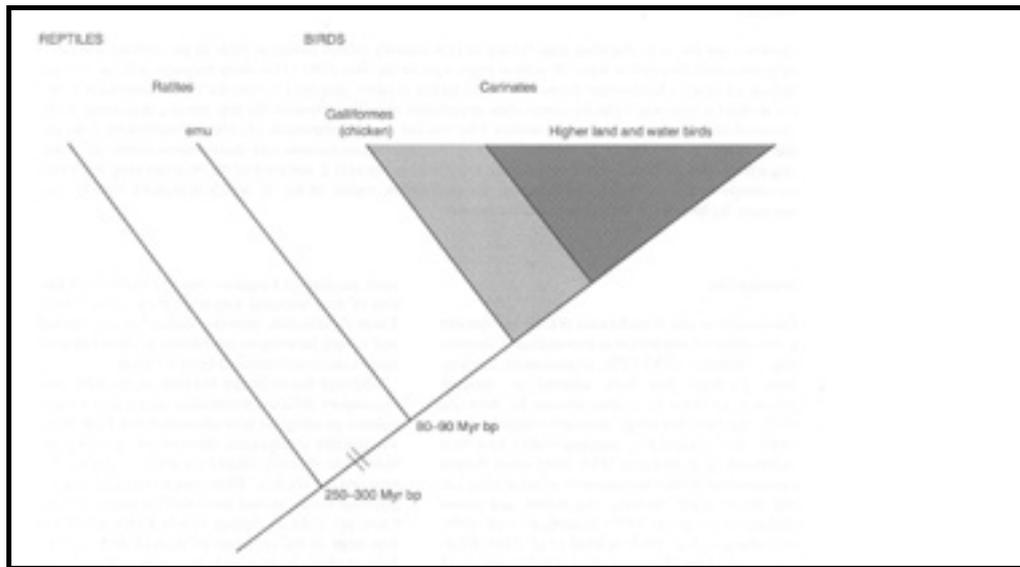
El CHD no sirve de marcador de sexado en el avestruz ni otros ratites. En el intento de poder dar una explicación a ello, debemos plantearnos cómo evolucionaron los cromosomas sexuales en estas aves y en las aves no-ratites.

Los cromosomas sexuales de las aves evolucionaron a partir de un par de cromosomas autosómicos. Ello se deduce por el hecho de que tanto genes como otro tipo de secuencias identificados en el cromosoma W tienen copias homólogas en el Z (*Fridolfsson y col. 1998*). Existen estudios de hibridación que han demostrado que los cromosomas sexuales de las ratites son muy parecidos entre ellos, también en el avestruz, es decir, que existen pocas regiones exclusivas del W, y éstas se encuentran mayoritariamente en la región centromérica (*Shetty y col. 1999*).

Para explicar la diferencia que encontramos entre los cromosomas sexuales de ratites y no-ratites (evidenciada por la no universalidad del marcador de sexado de Griffiths) se plantean dos hipótesis:

- a) Los cromosomas sexuales de las ratites y los de los no-ratites se originaron de pares distintos de cromosomas autosómicos. Eso es factible, puesto que las ratites fueron las primeras en divergir del tronco común del resto de aves, hace 80 millones de años (*Shetty y col. 1999*, Figura 9). Esta posibilidad implicaría que los cromosomas sexuales de las aves no-ratites empezaron a diferenciarse como cromosomas sexuales y entre sí, después de la divergencia de las aves ratites.
- b) Los cromosomas sexuales de todas las aves provienen del mismo par de cromosomas autosómicos. Los avestruces divergieron y posteriormente, tanto en ratites como no-ratites, se fueron diferenciando en Z y W. Esta teoría es compatible con el trabajo de *Ogawa y col. (1998)* sobre marcadores sexuales conservados en los dos grupos de aves.

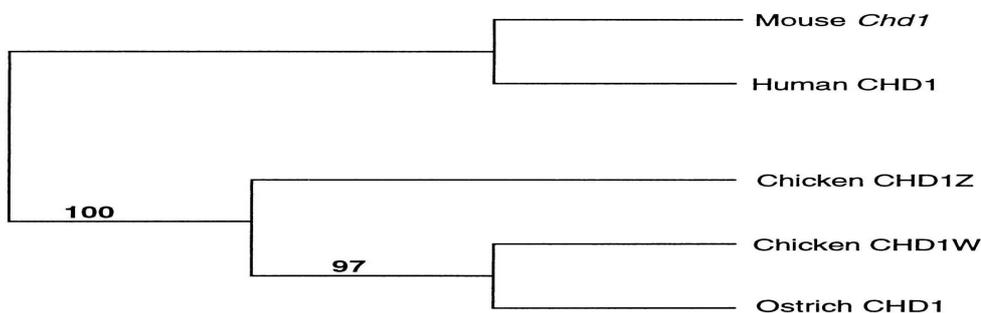
Figura 9. Evolución taxonómica de las aves



Fuente: Shetty y col. 1999

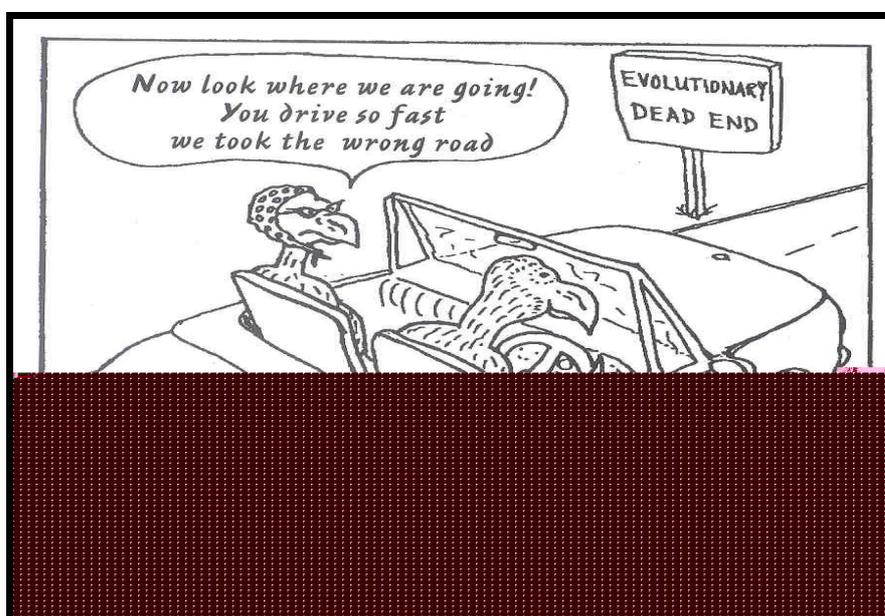
El grupo de Hans Ellegren en Uppsala (Suecia) ha trabajado mucho en el estudio de la evolución de los cromosomas sexuales en aves. Junto con Fridolfsson y col. (1998), realizaron trabajos de hibridación entre el CHD de avestruz y los CHD-Z y CHD-W del pollo (además de humano y ratón) para observar su grado de homología, y el resultado fue sorprendente: el CHD del avestruz era muy cercano a la copia CHD-W, y sin embargo existía una marcada divergencia entre ambas copias en el genoma del pollo (CHD-W y CHD-Z), (Figura 10).

Figura 10. Divergencia entre el pollo y el avestruz para el gen CHD



A tree depicting the phylogenetic relationship among chicken CHD1Z, chicken CHD1W, ostrich, human and murine CHD1 gene. Figures indicate bootstrap support for branches (1000 replicates). The total length was 242 steps, the consistency index = 0,781, the retention index = 0,701, and the homoplasy index = 0,219. (Fridolfsson y col. 1998)

La explicación que se le da a este resultado es que W y Z de las no-ratites empezaran a diferenciarse casi simultáneamente en el momento en que las ratites divergieron del tronco común de las aves, y que el CHD-W evolucionó más lentamente que el CHD-Z. Es la teoría del *Male Driven Evolution* (Ellegren y Fridolfsson 1997, Kahn y Quinn 1999). Esta teoría se basa en hecho que las tasas de sustitución son más frecuentes en el ADN del cromosoma Z que en el W, porque la mayoría de mutaciones ocurren durante la replicación del ADN, y hay mas replicación en la espermatogénesis que en la ovogénesis. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en el caso del gen CHD esto sólo es así en sustituciones sinónimas entre los 2 cromosomas (Fridolfsson y Ellegren 2000).



Male Driven Evolution (viñeta aparecida en Nature Genetics 17:130 (1997))

Por lo tanto, el método de sexado basado en el gen CHD deja un grupo de aves al descubierto, y de ahí la importancia del desarrollo de marcadores moleculares específicos en ratites.

El nuestro fue el primer marcador descrito útil para el sexado de avestruces.

Muy poco después, y empleando la técnica de AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), Griffiths y Orr (1999) también describieron otros dos marcadores más, de 161 y 104 pb, específicos para el sexado en el avestruz

En el resto de ratites hay algunos trabajos hechos en este sentido. Ogawa y col. 1998 utilizaron tres marcadores, ZOV3, IREBP y EEO.6 ligados a los cromosomas sexuales de las aves para estudiarlos mediante FISH en avestruz y emu. Sus resultados demuestran una gran

homología de secuencias entre ratites y no-ratites, pero no permiten una identificación de sexo por PCR, ya que ninguno de los tres marcadores es exclusivo del W en estas dos especies de aves.

Posteriormente estos mismos marcadores fueron estudiados en el casuario y, en este caso, EEO.6 sí mostró señal de hibridación específica con el cromosoma W (*Nishida-Umehara y col. 1999*), convirtiéndose en el primer marcador de sexo en esta ave.

No hay ningún trabajo sobre marcadores sexuales en Kiwi y Ñandú (*Rhea*), aunque tampoco se ha intentado utilizar los marcadores descritos para otras ratites en estas dos aves. Sin embargo, para el caso del ñandú, su divergencia evolutiva respecto a las otras 4 ratites (*Cooper y col. 1992*) sugiere que ninguno de los marcadores anteriormente descritos puedan ser útiles en esta especie, ya que, evolutivamente, es la más divergente de las aves ratites.

#### **IV. EL POSICIONAMIENTO CROMOSÓMICO**

En nuestro intento de posicionar cromosómicamente el marcador de sexo mediante FISH, todo apunta a que el tamaño de la sonda (0,64 Kb) era demasiado pequeño para detectar la señal en caso de hibridación. Se considera que el tamaño mínimo de la sonda para ser detectado mediante esta técnica es 3-5 Kb (*Gosden y Hanratty 1993*). En un trabajo muy similar al nuestro, también sobre cromosomas sexuales de ratites, *Ogawa y col. (1998)* utilizaron, con éxito, sondas de entre 13 y 16 Kb.

En algunos trabajos de PRINS consultados no se especifica el tamaño de la sonda empleada (*Pellestor y col. 1995, Pellestor y col. 1998*), aunque *Rogel-Gaillard y col. (1997)* detectan señales de hibridación a partir de fragmentos de 300 pb (0,3 Kb) usando esta técnica.

Sin embargo, en el caso de *in situ* PCR no hay duda de que el tamaño de la sonda no supone un problema para su detección. Los ejemplos en que se han detectado secuencias muy cortas con gran claridad haciendo uso de la *in situ* PCR son numerosos (p.e. desde 236 pb, *Lewis 1996*).

Con la evidencia de que la técnica elegida, por lo menos la *in situ* PCR, no es el obstáculo que impidió alcanzar nuestro objetivo, otras hipótesis deben ser estudiadas, y la más convincente

se basa en la preparación de la muestra, especialmente su desnaturalización y fijación al portaobjetos, un problema frecuente y discutido en otros estudios (Dyanov y Dzitoeva 1995).

## V. MICROSATÉLITES: ALELOS Y SUS FRECUENCIAS

El elevado número de alelos que hemos descrito en nuestra población para alguno de los marcadores microsátélites, corresponde a lo que se considera normal para una especie no domesticada o una población donde apenas ha habido selección.

El número de alelos en una ave silvestre puede ser muy elevado. Dawson y col. (1997) encontraron hasta 46 alelos para un marcador analizando 41 individuos en un pájaro cantor (*Dendroica petechia*). En un trabajo de Shou-Hsien Li y col. (1997) en córvidos mejicanos (*Aphelocoma ultramarina*) se llegaron a detectar 23 alelos analizando 20 individuos. Hanotte y col. (1994) encontraron hasta 12 alelos distintos en 10 individuos de una especie de Hortelano (*Emberiza schoeniclus*).

El avestruz lleva más de 100 años domesticado, y en ese tiempo se ha ido seleccionado con fines productivos (especialmente la obtención de plumas y, posteriormente, de carne). Pero esto ocurrió principalmente en Sudáfrica, desde donde, hasta hace pocos años, estaba prohibida la exportación de animales vivos o huevos. Los ejemplares en Europa provenían de otros países africanos o de EEUU, donde la práctica de la cría de avestruces era una actividad mucho más joven, y, en consecuencia, con menor grado de selección.

En los inicios de la industria en Europa, cualquier ave era considerada adecuada para la producción, sin ningún criterio de selección previo. Un ejemplo bien ilustrativo lo encontramos en nuestro país, ya que la primera granja de avestruces que apareció en España, en 1993, obtuvo sus primeros animales de zoológicos y diversas empresas de safaris (Gurri 1994).

Sin embargo ello no tiene porque ser perjudicial. Bien al contrario, un polimorfismo genético equiparable a especies silvestres es muy prometedor, ya que nos sugiere que todo el potencial productivo de nuestros animales está todavía intacto. Aunque el polimorfismo en regiones repetitivas no codificantes (como las secuencias que contienen microsátélites) no tiene porque ser representativo del resto del genoma, sí hemos encontrado otros indicios de amplia heterogeneidad en los avestruces domesticados: al visitar algunas granjas basta con echar un vistazo a los corrales de polluelos de una misma edad para ver diferencias de tamaño,

conformación y crecimiento muy distintas entre ellos. De la misma forma, los granjeros constatan grandes diferencias entre los adultos en caracteres como índice de puesta, fertilidad, éxito reproductivo, índice de conversión o rendimiento a la canal.

A partir de la gran diversidad y heterogeneidad de la población se puede ir realizando una selección en función de los caracteres productivos que más nos interesan, e ir perfilando líneas de aves especializadas en reproducción, puesta, engorde o calidad del cuero, de la misma forma que se hizo en sus inicios con el pollo u otras especies domésticas.

## **VI. IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL**

Los valores indicadores del grado de polimorfismo (PIC) son muy elevados en todos los marcadores analizados, especialmente para L009, Osm2 y L001. No nos debe extrañar ya que este valor aumenta, básicamente, con el número de alelos descritos, y estos tres marcadores son los que presentan los valores superiores.

También la distribución de las frecuencias alélicas influye en el valor PIC, de forma que el polimorfismo es menor cuando menos homogeneidad existe entre las frecuencias. Ese es el caso de Osm6, que pese a tener sólo un alelo menos que L014, su PIC se ve disminuido porque tres de sus once alelos acumulan casi el 95% de las frecuencias.

Un índice de polimorfismo elevado es lo que nos va a garantizar el uso de los microsatélites como marcadores de identificación individual, ya que la probabilidad de encontrar a dos individuos con los mismos alelos para los 8 microsatélites es ínfima.

En varios trabajos se han utilizado marcadores con valores de PIC similares para la identificación de aves. En especies silvestres, bastaron 7 marcadores para identificar inequívocamente individuos en estudios de migración de aves (*Mundy y Woodruff 1996*), y en otros trabajos, se han utilizado estos marcadores para identificaciones forenses en perros (*Muller y col. 1999*) y humanos (*Sajantila y col. 1994*).

La identificación de los animales mediante marcadores de ADN en el avestruz, conlleva una serie de ventajas, aparte de las comunes a las demás especies. En primer lugar, se trata de un marcaje inalterable, no pueden arrancárselo ni perderlo, como ocurre con los crotales, y

tampoco implica problemas para colocárselo ni daña la preciada piel, como es el caso del microchip. Además, tratándose de una especie destinada al consumo humano, el ADN nos permitirá poder identificar el animal o su carne en cualquier momento que sea necesario.

## **VII. TEST DE PATERNIDADES Y RELACIONES DE PARENTESCO**

La gran variabilidad (polimorfismo) de los microsatélites en el avestruz los convierten en ideales para el análisis de la variabilidad genética en poblaciones, así como para investigar relaciones genéticas cercanas.

En nuestros resultados, los valores de PE son elevados, y se comportan de forma similar a PIC: aumentan con el número de alelos, pero disminuyen si existen unas pocas frecuencias alélicas que engloban la gran mayoría de la población. En contra de lo esperado, el rango de tamaños de amplificación no parece afectar a este valor, ya que los marcadores similares en número de alelos y distribución de frecuencias parecidas, y que únicamente difieren en el rango de amplificación (como es el caso de L012 y L011, con diferencias entre alelos extremos de 42pb y 20pb respectivamente) tienen valores de PE muy cercanos.

Por supuesto, el análisis de un microsatélite no será suficientemente informativo para establecer genealogías, pero el análisis simultáneo de varios de ellos es lo que le da su poder como marcador, y la posibilidad de hacerlo en PCR múltiple, facilita enormemente la tarea. El número de marcadores necesarios dependerá del índice de polimorfismo combinado de éstos. Nosotros encontramos un valor de PE combinada que nos garantiza que en un 99,997% de los casos podremos descartar a un falso progenitor. Han sido descritos valores de PE combinadas del nivel de la que nosotros encontramos en poblaciones salvajes de halcones utilizando 12 microsatélites (*Nesje y col. 2000*).

El análisis de paternidad en el avestruz doméstico mediante marcadores de ADN es fundamental, ya que tanto por el comportamiento reproductivo de la especie (polígamos y nidada común), como por el sistema de producción (reproductores en tríos o grupos mayores), no hay ningún método que nos permita identificar a los progenitores de los polluelos con plena seguridad.

Además, estos análisis nos son útiles a dos niveles: evaluar a los reproductores como tales, en función del éxito en producir descendencia, y, por otro lado, identificar a los hijos de los mejores productores, y así poder certificar su valor añadido como animales mejoradores en caso de venta.

La posibilidad de analizar a cada animal para 8 marcadores a partir de únicamente 2 PCRs múltiple, reduce al mínimo la cantidad de ADN necesaria, e incluso bastan muestras de los restos de tejido en los huevos eclosionados (membrana corio-alantoidea y restos de sangre) para obtener esa cantidad de ADN (*Kimwele y col. 1998*), lo cual resulta muy práctico para no tener que manipular al animal recién nacido.

En lo que refiere a la probabilidad de diferenciar individuos cercanos entre sí, medido por el índice PS, los valores que encontramos parecen responder a otros criterios que PIC o PE.

Observamos una disminución drástica de este valor cuando aumenta mucho el rango de tamaños de amplificación. Esto se explica porque con índices de polimorfismo tan elevados, dos individuos cercanos, por ejemplo primos en primer grado, pueden no presentar ningún alelo en común si sus padres son heterocigotos, cosa que ocurrirá con una elevada probabilidad. Además en un rango amplio, pueden ocurrir fenómenos de deslizamiento de la polimerasa y mutación con más facilidad.

Sin embargo, si el número de alelos es demasiado bajo, también tendrá un efecto negativo sobre nuestro índice, ya que los animales no emparentados pueden presentar alelos comunes con más frecuencia, y por ello nos resulte imposible diferenciarlos de los emparentados.

Parece que el índice PS es el más sensible a una distribución equilibrada entre alelos, rangos y frecuencias, como en el caso de L001 (el de mayor valor PS) con un número de alelos elevado pero en un rango moderado, y con ninguna frecuencia alélica que supere el 16%.

## **VIII. IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBESPECIES DE AVESTRUZ**

### **ÁRBOL FILOGENÉTICO**

Se ha comparado el uso de diversos marcadores para estimaciones de distancias genéticas entre poblaciones de la misma especie. Ponsuksili y col. (1999) compararon los microsatélites

con los DFPs (*DNA fingerprints* se digiere ADN genómico con una enzima de restricción, se transfiere a membrana y se hibrida con sondas de secuencias repetitivas). El grado de heterocigosidad dado por uno y otro tipo de marcador fue muy similar, pero no así los árboles filogenéticos resultantes. Hay que pensar que al usar un número de muestras limitadas y tener en cuenta sólo un criterio, el del polimorfismo genético generado por ese marcador, los resultados son sesgados para de lo que sería el árbol completo.

Primmer y col. (1996B) ya sugirieron la posibilidad de utilizar los marcadores microsatélites para la identificación de híbridos y sus especies de origen, porque las distancias genéticas medidas a través de frecuencias alélicas pueden ser utilizadas para construir un árbol filogenético.

Nosotros estudiamos las diferencias genéticas entre poblaciones calculando la distancia  $D_A$  de Nei (1983). Takezaki y Nei (1996) analizaron las diferencias entre varias distancias genéticas como la  $D_A$  (Nei 1983),  $D_C$  (Cavalli-Sforza y Edwards 1967),  $D_{SW}$  (Shriver y col. 1995) y  $\mu_2$  (Goldstein y col. 1995B) para su aplicación en el análisis de microsatélites. Su simulación en el ordenador mostró que  $D_A$  y  $D_C$  eran las distancias que obtenían una tipología de árbol más correcta. Puesto que  $D_A$  es una modificación adaptada de  $D_C$ , elegimos esta distancia para nuestros cálculos. Además, algunos trabajos confirman la utilidad de esta distancia en estudios entre razas de aves con microsatélites (p.e. Takahashi y col. 1998).

El árbol resultante nos da una idea sobre las distancias genéticas entre las cuatro subespecies, sin embargo los elevados valores del error estándar ponen en evidencia una falta de información para que los valores sean significativos.

El uso de únicamente 8 marcadores microsatélites para la construcción del árbol no supone ese límite, ya que se ve compensado por el elevado índice de polimorfismo de los mismos. En los casos en que el número de alelos por marcador es escaso, deben analizarse un número mayor de marcadores para la construcción de un árbol (Vanhala y col. 1998).

Cuando se utilizan los microsatélites para el cálculo de divergencias entre poblaciones, los fenómenos de homoplasia pueden generar independientemente alelos de tamaños similares entre grupos muy distanciados, o, al contrario, alelos muy dispares dentro del mismo grupo (Angers y Bernatchez 1997). Ello afecta a la estima de frecuencias alélicas y, por

consiguiente, a la evaluación de relación y divergencia entre especies o poblaciones, basada en la varianza del tamaño de los alelos.

En nuestro caso, el resultado está confirmado por estudios con otro tipo de marcadores, ya que el cálculo de divergencia genética entre poblaciones de subespecies de avestruz mediante microsatélites, forma parte de un trabajo más amplio, en colaboración con dos grupos de Universidades Sudafricanas.

Tratamos de estudiar las diferencias genéticas de las subespecies mediante tres aproximaciones: microsatélites (realizada por nosotros), RAPDs y análisis de ADN mitocondrial.

Los Dres. Barker y Kirby, de la Rhodes University han analizado, mediante PCR-RFLP y secuenciación, un fragmento de 400 pb del 12S rRNA y otro de 500 pb del Citocromo B. Los Dres. Bezuidenhout y Lin, de la University of Zululand han analizado a los animales por aproximación RAPDs, utilizando varios métodos estadísticos distintos.

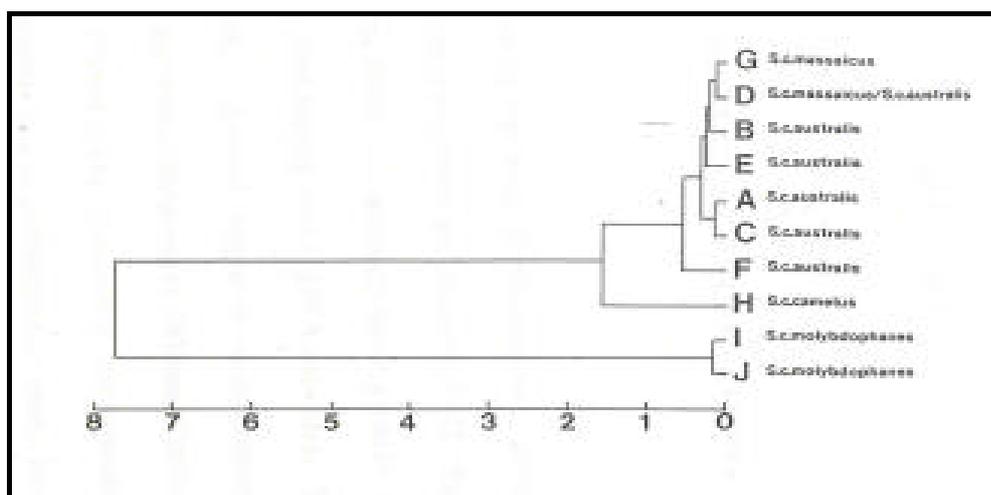
Las tres aproximaciones muestran el mismo resultado en líneas generales, sosteniendo que la divergencia de las subespecies de avestruz ocurrió inicialmente en dos grupos, de forma que *S. c. australis* y *S. c. massaicus* divergieron juntas y actualmente se muestran muy cercanas, y, por otro lado *S. c. camelus* y *S. c. molybdophanes* provienen de otro tronco, común para ambas, y del cual, posteriormente, cada una divergió. Estos resultados se publicaron en el congreso de la Southern African Society for Systematic Biology celebrado en Mtunzini (South Africa) en Julio de 2000, y actualmente se está finalizando la redacción de un manuscrito para su publicación en una revista internacional.

Hasta ahora los árboles filogenéticos de subespecies de avestruz estaban basados, en secuenciación de ADN mitocondrial (Freitag 1992, Freitag y Robinson 1993) y análisis por RAPDs (Bezuidenhout 1999).

En la aproximación por RAPDs, sólo se analizaron 3 de las subespecies (no contaban con muestras de *S. c. camelus*), y únicamente 1 ó 2 individuos por subespecie. Los resultados no son concluyentes porque (debido al escaso número de individuos analizados) varían en función del tipo de análisis estadístico de los datos (Bezuidenhout 1999).

Freitag y Robinson (Freitag 1992, Freitag y Robinson 1993) analizan las subespecies mediante RFLP sobre ADN mitocondrial. El número de animales estudiado es suficiente para todas las subespecies, excepto *S. c. camelus*, en que sólo consta de un individuo. Se definen 10 haplotipos, y el árbol filogenético resultante se muestra en la Figura 11 (Freitag y Robinson 1993).

Figura 11. **Árbol filogenético mediante el análisis de ADN mitocondrial**



Phenogram derived from UPGMA cluster analysis of 10 mtDNA haplotypes of the ostrich. A to J represent individual haplotypes. Scale reflects percentage sequence divergence.

Nuestros resultados, mediante las tres aproximaciones, muestran que las subespecies *S. c. molybdophanes* y *S. c. camelus* son más cercanas de lo que postulan Freitag y Robinson.

Aunque nosotros contamos con más representantes de la subespecie *S. c. camelus* (8 individuos), sólo contamos con dos *S. c. molybdophanes* (Freitag y Robinson analizaron 8). En ambos casos, los resultados pueden estar sesgados por la falta de representantes de una u otra subespecie.

En lo que se refiere a *S. c. australis* y *S. c. massaicus*, todos los trabajos apuntan a una divergencia relativamente reciente entre las dos poblaciones. Ello sugiere que la actual barrera geográfica que separa a las subespecies del norte y la del sur no era efectiva hace 30.000 años (cuando divergieron ambas subespecies, Freitag y Robinson 1993). Esta barrera está formada

por una zona árida con vegetación de *Brachystegia* (“miombo”) que abarca Tanzania, Zambia, Angola y Congo (Zaire).

Las barreras geográficas “vegetales” pueden estar sujetas a cambios dinámicos, por alteraciones del clima o acción del hombre, y es probable que en el pasado, sus características sí permitieran una comunicación y flujo genético entre las dos poblaciones.

Antiguamente los avestruces se distribuían, con toda probabilidad, libremente por el continente africano y el este asiático, pero con el tiempo, las barreras geográficas y naturales tal como bosques, grandes ríos y lagos, fueron separando las áreas donde estaban establecidas distintas poblaciones de esos animales ancestrales. Este tipo de barreras son especialmente infranqueables para el avestruz, por su incapacidad de volar.

El sistema del Great Rift sí se ha mantenido inalterable durante millones de años, y puede haber provocado una barrera muy eficiente de cara al aislamiento de *S. c. molybdophanes* del resto de sus poblaciones vecinas (Freitag 1992, Freitag y Robinson 1993). El patrón geográfico de este sistema montañoso también ha sido discutido como clave para la divergencia de otras especies de aves silvestres africanas (Freitag y Robinson 1993).

Entre *S. c. molybdophanes* y *S. c. massaicus*, se han documentado, además, diferencias en sus requerimientos de hábitat ecológico, patrones de comportamiento y patrones reproductivos (Bezuidenhout 1999, Freitag 1992, Freitag y Robinson 1993). Esta teoría está apoyada por el hecho de que, fenotípicamente, el *S. c. molybdophanes* es la subespecie más diferenciada de las cuatro.

## MARCADORES ESPECÍFICOS

Hemos encontrado marcadores de ADN que únicamente se han presentado en una de las subespecies, como es el caso de nuevos alelos descritos en microsatélites o mutaciones SNP en el gen la hormona de crecimiento.

Estadísticamente los resultados no son significativos, ya que el número de animales analizados para algunas subespecies es muy bajo y por lo tanto, de momento, no podemos hablar de un marcador inequívoco de subespecie.

En el caso de los marcadores SNPs de la GH, los dos individuos *S. c. molybdophanes* presentan la mutación. Se trata de animales fundadores de una población, y por lo tanto no es

posible que su homología se deba a que uno lo haya heredado del otro. Sería muy interesante poder analizar a otros animales de esta subespecie para este marcador, y ver hasta qué punto se trata de un marcador específico.

En el caso de los nuevos alelos descritos, vemos que éstos se centran en dos subespecies: *S. c. camelus* y *S. c. molybdophanes*.

En todos los casos (todos los nuevos alelos en todos los marcadores), éstos alelos descritos implican un incremento en el rango de amplificación hacia tamaños superiores, aumentando el número de repeticiones, y, por lo tanto la tasa de mutación (*Primmer y col. 1996A*).

De acuerdo con lo que se conoce sobre el patrón de evolución de los microsatélites (revisado por *Primmer y Ellegren 1998*), estos resultados sugieren que estas dos subespecies han sufrido una tasa de mutación (evolución) similar, apoyando nuestra teoría sobre la divergencia de las subespecies, reflejada en el árbol filogenético que hemos elaborado.

Sobre la secuencia del alelo 137 de Osm6 de *S. c. molybdophanes*, vemos que el polimorfismo se debe a la inserción de una secuencia de 30 pb. El mismo animal presenta los alelos 137 y 121. Pese a que el salto de tamaño es muy grande, respecto a los alelos más frecuentes (97, 99 y 101), ello no tiene por qué estar directamente relacionado con el salto evolutivo. Pueden ocurrir procesos mutacionales complejos en poblaciones muy relacionadas e incluso en alelos encontrados en la misma población (*Angers y Bernatchez 1997*).

Al igual que existen microsatélites que se han conservado a lo largo de la evolución y están presentes de forma muy similar en muchas especies de aves distintas (*Primmer y Ellegren 1998*), también puede ocurrir lo opuesto. Estudios de microsatélites compuestos o múltiples han revelado que pueden ocurrir deleciones o inserciones de partes enteras de la estructura de un microsatélite entre especies muy cercanas o incluso subespecies (*Estoup y col. 1995, Angers y Bernatchez 1997*), como es nuestro caso.

En cambio, el hecho de que *S. c. camelus* presente alelos cercanos al de *S. c. molybdophanes* (117 y 121) sí sugiere que unos se han generado por mutación de los otros, ya que la mayoría de las mutaciones en microsatélites involucran pocas unidades de repetición, y por lo tanto este dato apunta nuevamente a un origen común de estas dos subespecies.

En el trabajo de Kumari y Kemp (1998) se evalúa el polimorfismo de 14 microsatélites en un panel de 6 *S. c. massaicus* y 12 *S. c. molybdophanes*. Para todos los marcadores encuentra alelos presentes únicamente en una de las dos subespecies, y para dos de los microsatélites, las dos poblaciones no comparten ningún alelo. Este resultado ilustra la divergencia descrita entre estas dos subespecies, apoyando los estudios previos (*Freitag 1992, Freitag y Robinson 1993*) y los nuestros.