

## ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO MEDIANTE MICROSATÉLITES EN *STRUTHIO CAMELUS* (AVESTRUZ)

Natalia Bello Pigem y Armand Sánchez Bonastre  
Unitat de Genètica i Millora. Facultat de Veterinària.  
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.

### INTRODUCCIÓN

El avestruz, único miembro de la familia *Struthionidae*, es la mayor ave viva existente. Se reconocen 3 razas (Cuello Rojo, Cuello Azul y Cuello Negro) de acuerdo con su tamaño y el color de su cuello y piel del muslo. Sin embargo las diferencias son tan significativas que algunos autores postulan la existencia de 4 subespecies de acuerdo con estas características y su origen geográfico en África (Kumari and Kemp, 1998). Además de la importancia de ser el único miembro de una importante familia, el avestruz resulta comercialmente interesante como resultado de su cría para producción de carne en África, Australia, y, más recientemente, en Europa.

La cría de avestruces está cobrando una importancia creciente en nuestro país. Al igual que en cualquier otra especie de producción, para plantear cualquier plan de mejora genética, resulta básico tener a los animales identificados individualmente y disponer de un registro fiable de las genealogías. Para ello se vienen utilizando en los últimos años marcadores de ADN del tipo microsatélites, que consisten en repeticiones de 2 a 5 nucleótidos en el genoma, con un elevado nivel de polimorfismo. En el avestruz han sido descritos 28 microsatélites (Kumari and Kemp 1998; Kimwele *et al.* 1998; Ward *et al.* 1998) todos ellos de repeticiones de 2 pares de bases. En este trabajo presentamos la puesta a punto de 8 de estos marcadores y los resultados correspondientes a 96 ejemplares de diversas explotaciones en nuestro país. Los resultados obtenidos han permitido estimar las frecuencias alélicas, PIC (Índice de polimorfismo de cada marcador), PE (Probabilidad de que una serie de alelos codominantes, de frecuencias conocidas, detecten un falso progenitor) y PS (probabilidad genética de distinguir individuos cercanos entre sí) de estos marcadores en esta población de animales.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se extrajo sangre de 96 animales, de raza cruzada y provenientes de 7 explotaciones distintas. El ADN genómico se obtuvo a partir de 5 µl de sangre que se incubó con 250 µl de tampón de lisis (10 mM tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,2), 50 µl de SDS 5% y 50 µgr de proteinasa K, a 37°C o/n. Se procedió a la precipitación salina de las proteínas con 150 µl de NaCl 5M y el ADN, tras ser precipitado con etanol, se resuspendió en 100 µl de TE.

Se optimizaron las amplificaciones de los microsatélites en dos PCR múltiplex, que únicamente diferían en la temperatura de unión del cebador. Para los microsatélites L001, L012, L011 y Osm1 dicha temperatura fue de 58°C, mientras que para L009, L014, Osm2 y Osm6 la temperatura fue de 60°C. En ambos casos el ciclo térmico de las PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 120seg., seguida de 27 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 58/60°C y 30 seg. a

72°C, y una extensión final de 15 minutos a 72°C. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 15 µl, que contenían 1,5 µl de 10XPCR buffer, 0,15 µl de dNTP 5 mM, 0,15 µl de cada uno de los 8 cebadores a concentración 10 µM, 0,45 µl de MgCl 50 mM, 1,6 U de Taq Polimerasa (GibcoBRL) y 3 µl de la solución de ADN genómico. El resultado de la PCR se comprobó mediante electroforesi capilar con marcaje fluorescente en un equipo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La optimización de los 8 microsatélites en dos PCR múltiplex de 4 marcadores cada una, permite determinar el genotipo de varios loci de forma rápida. Los resultados obtenidos del estudio de 96 animales para estos marcadores en cuanto a número de alelos, PIC, PE y PS se presentan en la tabla 1.

Los resultados muestran un elevado polimorfismo en los 8 marcadores, siendo la probabilidad de exclusión combinada del 99,9899%. El número de alelos promedio para estos 8 microsatélites es de 16,7. En estudios anteriores, con 14 microsatélites para 18 animales, los alelos promedio por marcador fueron 13 (Kumari and Kemp, 1998), y en el trabajo de Kimwele *et al*, 1998 el promedio fue de 6 para 7 marcadores en 14 individuos. En nuestro caso por primera vez se analizan un número elevado de animales de una población muy heterogénea, con ejemplares de distinto origen, con bajos niveles de consanguinidad y en los que la selección aplicada es todavía prácticamente inexistente. Todo ello explica el elevado nivel de polimorfismo encontrado, en que podemos destacar marcadores como el L001 o L009 cuyo valor de P.E. supera el 80%.

Únicamente se conocen datos sobre las frecuencias alélicas para 12 de los 28 marcadores descritos, para 5 de ellos se genotiparon 50 individuos, pero para los 7 restantes únicamente se contaba con 14 animales. La gran heterogeneidad genética detectada en esta especie y la probable existencia de diversas subespecies pone de manifiesto la necesidad de incrementar el número de ejemplares y poblaciones analizadas antes de poder considerar estos valores como referentes para esta especie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kimwele, Graves, Burke and Hanotte (1998) *Molecular Ecology* **7**, 247-255  
Kumari and Kemp (1998) *Molecular Ecology* **7**, 133-140  
Ward, McPartlan, Matthews and Robinson (1998) *Animal Genetics* **29**, 331

**Tabla 1:** Valores de PIC, PE y PS para 8 microsatélites en el avestruz.

<b>MICROSATÉLITE</b>	<b>Nº DE ALELOS</b>	<b>P.I.C.</b>	<b>P.E.</b>	<b>P.S.</b>
<b>L001</b>	20	0.894776	0800612	0.6996967
<b>L009</b>	29	0.914375	0.825957	0.199265
<b>L011</b>	16	0.765387	0.606758	0.626632
<b>L012</b>	15	0.818950	0.683135	0.656662
<b>L014</b>	11	0.714749	0.534999	0.599911
<b>OSM1</b>	15	0.809746	0.660424	0.652233
<b>OSM2</b>	22	0.906897	0.774802	0.254065
<b>OSM6</b>	6	0.600779	0.388573	0.538461

P. E. combinada de los 8 microsatélites: 99,9899%