



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMÍA E INGENIERÍA FORESTAL
Departamento de Zootecnia

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA NORTE
Instituto de Ciencias Biomédicas

Proyecto FIA BIOT-01-P-027
“Desarrollo y Aplicación de una metodología de sexaje en Ratites mediante
Marcadores Moleculares de ADN”

INFORME TÉCNICO FINAL

Santiago, 23 de septiembre del 2005

I. ANTECEDENTES GENERALES

NOMBRE DEL PROYECTO

“Desarrollo y Aplicación de una metodología de sexaje en Ratites mediante Marcadores Moleculares de ADN”

FECHA DE APROBACIÓN

Noviembre del 2001

FORMA DE INGRESO AL FIA

Concurso Proyectos de Biotecnología, 2001

AGENTE EJECUTOR

Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Zootecnia

AGENTES ASOCIADOS

**Universidad de Chile
Laboratorio Bytech**

COORDINADOR DEL PROYECTO

Sr. Manuel Camiruaga Labatut

COSTO TOTAL

APORTE FIA

PERÍODO DE EJECUCIÓN 36 meses

31 de Diciembre del 2001 al 31 de diciembre del 2004

II. RESUMEN EJECUTIVO

Con el presente informe se termina el período de trabajo del proyecto completando las actividades inconclusas presentadas en el informe anterior y terminando las actividades nuevas propuestas en la reitemización.

El objetivo del proyecto de poder desarrollar una metodología molecular para la determinación del sexo en aves ratites (avestruz, emú y ñandú) fue logrado íntegramente determinando tres marcadores específicos para cada especie que amplifican con exactitud para la característica deseada. Del mismo modo la actividad adicional propuesta referida a la metodología molecular para la determinación de parentesco en avestruces logró la obtención de marcadores que permiten obtener dicha conclusión.

Si bien los resultados técnicos obtenidos cumplen las expectativas planteadas, las proyecciones comerciales de la técnica son variables, ya que en los estudios llevados a cabo durante la realización del proyecto se logró constatar el alto grado de interés del medio por estas herramientas biotecnológicas, los que sin embargo no estarían dispuestos a pagar de acuerdo a los valores sondeados. De todas formas reconocen que finalmente deberán hacer uso de ella por el alto grado de consanguinidad existente en los rebaños y porque la situación comercial contractual del rubro se espera que mejore con la apertura de mercados.

Adicionalmente en la última fase de desarrollo del proyecto se procedió a completar la construcción del SCAR DnG9 de emú derivado del marcador RAPD OPG-9 que amplifica sólo en las hembras. Una vez diseñados los respectivos partidores se estableció que este marcador SCAR DnG9 muestra 100% de eficiencia en identificar el sexo en emú. Se realizó el sexaje de dos familias de emú con el SCAR DnG9 validando el patrón de herencia madre-hija del marcador.

Se verificó la factibilidad de utilizar la información de la diversidad alélica de loci microsatélites en el análisis de parentesco entre individuos en un plantel de producción de avestruces. Los seis loci microsatélites utilizados presentaron una diversidad alélica adecuada para el análisis de parentesco. La información genética analizada nos permite establecer que esta metodología es aplicable en plantales productivos de avestruces.

Finalmente se procedió a efectuar un análisis técnico económico de la estrategia comercial a seguir con los resultados técnicos obtenidos, los pasos faltantes para la consolidación de un paquete tecnológico y la forma de abordar la oportunidad que se presenta.

III. TEXTO PRINCIPAL

III 1 Breve resumen de la propuesta original y modificaciones sufridas en el plan operacional.

La propuesta original contemplaba la búsqueda de herramientas moleculares para la determinación del sexo en ratites comerciales (avestruces, emúes y ñandúes) mediante el desarrollo de marcadores moleculares específicos, la elaboración de una metodología de muestreo de fácil aplicación, la validación técnica en terreno y la evaluación de un canal comercial para la prestación de servicios de diagnóstico a productores.

En general la propuesta cumplió todos los aspectos antes mencionados de acuerdo a los plazos originales comprometidos. Adicionalmente y debido al importante avance del proyecto alcanzado y al ahorro de recursos generados se procedió a evaluar una nueva actividad para el proyecto, la cual surgió como una necesidad en el estudio de mercado realizado, la cual se refería a la implementación de un sistema de determinación de parentesco de avestruces a través del uso de marcadores microsatélites polimórficos. La iniciativa fue desarrollada con éxito y permitió implementar un sistema aplicable a criaderos de avestruz.

III 2 Cumplimiento de los objetivos del Proyecto

Objetivos Originales:

- Desarrollar, evaluar e implementar a nivel productivo un sistema de sexaje de las ratites comerciales mediante el uso de una técnica molecular que permita identificar marcadores de ADN polimórficos asociados a los cromosomas sexuales.
- Evaluar y desarrollar una técnica de sexaje de ratites basada en el descubrimiento de al menos un marcador polimórfico (SCAR) ligado al

sexo específico para cada una de las especies con las cuales se desea trabajar, esto es, avestruces, emús y ñandúes.

- Definir y evaluar en terreno las técnicas de muestreo y de sexaje desarrolladas.
- Realizar una evaluación económica y un escalamiento precomercial de la técnica de sexaje y su aplicación productiva

En general se puede señalar que los objetivos planteados originalmente en la propuesta se han cumplido a cabalidad. El nivel de profundidad con que se han tratado ha variado y fluctuado a lo largo del desarrollo del proyecto, sin embargo se han corregido los errores y se han resuelto los problemas iniciales. En el punto III – 5 se explican en detalle los resultados obtenidos. Adicionalmente se agregó un nuevo objetivo al proyecto en el marco de la reitemización del mismo:

- Desarrollar un programa base de cruzamiento de individuos que permita establecer lazos de consanguinidad mediante marcadores moleculares, de manera de mejorar la selección de reproductores en plantales que no cuenten con información de calidad del origen de sus animales.

Este último objetivo se ha alcanzado con éxito ya que se probaron 6 partidores de loci microsatélites que permiten determinar el grado de consanguinidad con éxito.

III 3 Aspectos Metodológicos del Proyecto

III 3.1 Descripción de la metodología efectivamente utilizada

La ejecución del proyecto ha seguido la metodología planteada originalmente la cual se explica in extenso a continuación

III.3.1.1 Montaje del laboratorio

Se realizó la adquisición de los equipos solicitados en el Proyecto: Cámara de electroforesis BioRad con accesorios y Termociclador MJ Research.

III.3.1.2 Toma de muestras para la extracción de DNA en ratites.

Avestruz .- Se realizó un viaje a terreno a Los Andes, V Región al Criadero Aguas Claras, Agrícola AASA, San Esteban donde se procedió a tomar muestras de 6 machos y 6 hembras con el siguiente procedimiento:

- Se utilizó un capuchón para cubrir la cabeza de cada ejemplar y poder manejar los animales para tomar muestras de sangre y de plumas.
- En el plantel, los animales adultos se mantienen en tríos de un macho y dos hembras, debidamente sexados e identificados. Se eligió un macho y una hembra hasta completar 6 parejas que originaron las familias que fueron estudiadas en este proyecto.
- La sangre se extrajo desde la vena basilica utilizando un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante. Los volúmenes obtenidos fueron entre 0.5 y 3 ml de sangre total. Las muestras fueron debidamente rotuladas, almacenadas y refrigeradas para su transporte al laboratorio.
- Se obtuvo muestras de plumas, extraídas manualmente desde el cuello, pecho y lomo de cada uno de los ejemplares. Cada muestra de plumas fue almacenada en forma individual en bolsas de polietileno debidamente rotuladas y mantenidas en refrigeración para su transporte al laboratorio.

Emúes.- Se realizó un viaje a terreno a Puerto Montt, X Región. Las muestras de sangre y plumas fueron obtenidas de ejemplares adultos del plantel de reproductores de la Asociación de Productores SOCOEMU, con el siguiente procedimiento:

- Los animales son mantenidos en corrales, formando parejas. Se escogieron 6 parejas, tres de las cuales tienen fertilidad comprobada. Estos animales

formaron las familias que fueron estudiadas en este proyecto. Todos los animales estaban marcados electrónicamente.

- Se procedió a inmovilizar al animal manualmente para proceder a la obtención de sangre y de las respectivas muestras de plumas.
- Las muestras de sangre y de plumas fueron obtenidas según el procedimiento descrito anteriormente, siendo rotuladas y almacenadas de la misma manera para su traslado al laboratorio.

III.3.1.3 Extracción de DNA de glóbulos rojos nucleados de ratites con el método fenol-cloroformo.

1. Los datos de procedencia, número y sexo de todas las muestras obtenidas, tanto de avestruz como emú, fueron ingresadas en un cuaderno así como en un una planilla Excel par su registro y seguimiento durante la realización del proyecto.
2. Cada muestra de sangre fue alicuotada en tubos eppendorf de 1.5 ml debidamente rotulados para proceder a su almacenamiento a -20°C .
3. Las muestras de plumas fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.
4. Se prepararon todas las soluciones necesarias para la extracción de DNA con el método fenólico.
5. Se realizó la extracción fenólica del DNA de cada muestra de sangre de los 24 animales de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. 25 μl sangre se mezcló con 700 μl de buffer STE , 20 μl Proteinasa K (20 mg/ml) y 35 μl SDS 20% en un tubo eppendorf.
2. Se dejó en agitación a 42°C durante toda la noche.
3. Se agregó 700 μl fenol equilibrado con Tris pH 8.0.
4. Se centrifugó a 2500 rpm por 10 min .
5. La fase acuosa se traspasó con una pipeta de polipropileno a un tubo eppendorf.
6. Se repitió dos veces los pasos 3, 4 y 5.

7. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf y se agregó el volumen equivalente de cloroformo : fenol 1 : 1. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.
8. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf y se agregó con una pipeta de polipropileno igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.
9. La fase acuosa se traspasó a un tubo eppendorf. Se agregó dos volúmenes de ETOH absoluto frío para precipitar el DNA.
10. En una pipeta de vidrio con punta sellada se enrolló la nube de DNA precipitado y se lavó con etanol 70%. El DNA se secó al vacío y se transfirió a un tubo eppendorf con 600 μ l de buffer TE pH 8.0. La solución de DNA se incubó a 45 °C durante 2 h en baño termorregulado.
11. El DNA extraído se almacenó a 4 °C.

III.3.1.4 Evaluación de la obtención de DNA,

Una vez obtenido el DNA de cada una de las muestras se procedió a evaluar la calidad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1) Se preparó el gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 0.5X. El gel contiene bromuro de etidio (10 μ g/ μ l) para teñir el DNA.
- 2) El DNA obtenido fue sometido a electroforesis utilizando la siguiente mezcla: 3 μ l de DNA se mezclaron con 5 μ l de agua destilada y 2 μ l de buffer de carga (xileno: cianol y 30% de ficol) y se dispusieron en los pocillos del gel.

La electroforesis se realizó a 7,5 V/cm en buffer TBE 0.5 X durante 45 minutos. El DNA fue visualizado con luz UV en un transiluminador y el gel fue fotografiado con una cámara polaroid.

Búsqueda de información a nivel internacional

- Comparación de información con la obtenida a través de experiencias anteriores.
- Procedimientos de trabajo básicos y actualización de técnicas de laboratorio.
- Capacitación del personal técnico.

- Medición y descripción de las labores efectuadas
- Obtención de muestras en terreno.
- Comparación de resultados

De esta forma la metodología del proyecto se basó en efectuar una investigación de laboratorio exhaustiva tendiente a identificar marcadores moleculares que amplificaran en un sexo y no en otro para cada una de las especies investigadas. El trabajo se efectuó en paralelo con ADN obtenido desde sangre y otros materiales (plumas, piel) de manera de obtener resultados replicables posteriormente a escala comercial del sistema de producción de ratites.

III.3.1.5 Toma de muestras para la extracción de DNA en ñandú.

En este período se realizó una salida a terreno a Punta Arenas para la toma de muestras de Ñandú, procedentes de la Estación Experimental del Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, KAMPENAIKE, Punta Arenas.

Fecha muestreo: 13 de mayo de 2002

- Se procedió a inmovilizar al animal manualmente para proceder a la obtención de sangre y de las respectivas muestras de plumas
- La extracción de sangre y la obtención de muestras de plumas se realizó según lo descrito en III.3.1.2.
- Se obtuvo muestras desde 6 machos y 6 hembras, las cuales fueron
- marcadas y registradas para su seguimiento posterior. El criterio de selección fue el de mantener parejas de manera de poder efectuar el seguimiento posterior de los hijos

III.3.1.6 Obtención de DNA de Ñandú mediante el método fenol-cloroformo

Se obtuvo DNA de 12 individuos (seis machos adultos y seis hembras) siguiendo el protocolo descrito en la sección III.3.1.3.

III.3.1.7 Extracción de DNA de plumas de ratites con resina Chelex

Se utilizaron plumas de avestruces y emúes de ambos sexos obtenidas de cuello, lomo y pecho de cada uno de los animales. Se observó en todos los casos, dos tipos de pluma en cada una de estas zonas del animal, independientemente de su sexo, a las que se denominó "gruesa" y "delgada". En el caso del avestruz, el cálamo de las plumas "gruesas" es negruzco y mide más de dos centímetros de largo por tres milímetros de diámetro. Las plumas "delgadas" tienen un cálamo blanquecino que mide la mitad del de las plumas "gruesas". Las plumas de emúes presentan características similares, pero tienen dimensiones menores (cálamo de un centímetro de largo en las plumas "gruesas" y de cinco milímetros en las "delgadas"). Teniendo en cuenta estas diferencias morfológicas se procedió a extraer DNA a partir de los distintos tipos de plumas siguiendo el siguiente protocolo:

- Se cortaron uno o más cálamos en trozos más pequeños. Cada muestra se lavó en agua estéril en un tubo eppendorf . Se eliminó el agua y se agregó 200 uL de resina chelex al 5% y 2uL de proteinasa K (20mg/mL) a cada muestra. Los tubos se incubaron a 55°C por 2 horas.
- Los tubos se agitaron 15 seg en vortex, y se incubaron a 95°C por quince minutos.
- Los tubos se agitaron nuevamente y se centrifugaron a 14000rpm.
- Se realizaron diluciones 1/5 en buffer TE 0,1X y se almacenaron todas las muestras a -20°C.
- Las cantidades relativas de DNA fueron visualizadas por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0,7% corridos a 7,5 V/cm en buffer TBE al 0,5% teñidos con bromuro de etidio

Se hicieron dos extracciones consecutivas en cada una de las especies para ver la reproducibilidad del procedimiento. Se usó distinto número de plumas "gruesas" y

“delgadas” provenientes de distintas partes de los animales, tanto machos como hembras. Además se extrajo DNA de plumas de tres polluelos de emú, las cuales son extremadamente pequeñas (cálamo de 2 mm de largo por 0,5 mm de diámetro en el caso de las plumas "delgadas").

III.3.1.8 Amplificación por PCR de muestras extraídas con Chelex

Se utilizó la técnica RAPD-PCR en muestras de DNA obtenidas de varios tipos de plumas de emú y avestruz para establecer si la cantidad y la calidad de DNA extraído era adecuada para realizar amplificación por PCR, tanto en plumas obtenidas de individuos adultos de emú y avestruz, así como en plumas obtenidas a partir de polluelos de emú.

Se probaron muestras con distintas cantidades de DNA: sin diluir (inmediatamente después de centrifugar), y diluidas a 1/5. En emú se probaron dos partidores (21 y 25) en individuos adultos y uno en polluelos (70). En avestruz se probó el partidador 17. Los partidores se seleccionaron porque, previamente habían producido una buena amplificación en muestras extraídas con fenol en machos y hembras de ambas especies. Se usaron como controles muestras de DNA extraídas con fenol.

III.3.1.9 Búsqueda (“screening”) de marcadores RAPDs asociados al sexo en avestruz, emú y ñandú.

Los marcadores RAPDs son fragmentos de DNA de diversos tamaños que se producen mediante amplificación de DNA genómico (DNA total de un organismo) utilizando la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta reacción enzimática permite obtener grandes cantidades de DNA (de interés) utilizando pequeños fragmentos de DNA (partidores) que se unen al segmento de DNA blanco (el que se desea amplificar) y permiten que la polimerasa inicie una ronda de replications (copias repetidas del fragmento blanco). La principal diferencia de la técnica RAPD-PCR con respecto a un PCR convencional es que para obtener

estos marcadores se utiliza solo un partidor de pequeño tamaño (10 bases nucleotídicas de largo) que se une aleatoriamente en cualquier parte del genoma con el que es complementario, produciendo cierto número de fragmentos de distinto tamaño que se separan y visualizan por electroforesis en un gel de agarosa. Cada partidor produce distintos patrones de fragmentos visualizados como bandas en el gel, algunas de las cuales pueden estar presentes o ausentes en determinados individuos (lo que se llama polimorfismo). Lo que se busca es un fragmento o banda que esté presente sólo en los individuos hembra y que pueda servir como marcador para distinguir los sexos.

La búsqueda (“screening”) de marcadores se realizó aplicando la técnica RAPD-PCR a muestras de DNA de machos y hembras (“pooles”) extraídas con fenol. Los pooles de DNA para las tres especies se confeccionaron mezclando DNA de seis ejemplares de cada sexo en iguales proporciones. Se prepararon diluciones de trabajo de cada pool a 6 ng/μL las cuales fueron chequeadas en geles de agarosa para determinar su concentración relativa. Estas diluciones fueron utilizadas para realizar el screening por PCR utilizando un set de partidores UBC (University of British Columbia; 300 partidores) y otro set de Operon Technologies (100 partidores).

La mezcla de PCR para obtener los fragmentos RAPDs fue la siguiente (15μL de volumen total):

Reactivo	μL
H ₂ O	3,55
Buffer 10X	1,5
MgCl ₂ 50 mM	0,6
dNTPs 10uM	0,15
Partidor (1,2uM)	5,0
Taq polimerasa 5U/ul	0,2
DNA	4,0

Las condiciones de reacción son las siguientes:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	94	2
2	94	1
3	35	1
4	72	2
5	ir al paso 2 dos veces	
6	94	10 segundos
7	35	30 segundos
8	72	1
9	ir al paso 6 treinta y un veces	
10	72	5
11	15	Indefinido

Se cargaron los 15 μ L de reacción en un gel al 1,5% de agarosa y se separaron los fragmentos de DNA por electroforesis a 90V por 2:30h. Junto a las muestras se cargó 1 μ L de marcador de peso molecular (mezcla de fragmentos de DNA de tamaño conocido) para estimar el tamaño de las bandas RAPDs. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar las bandas con luz UV y fotografiados con una cámara polaroid.

III.3.1.10 Construcción de SCAR Sc66 y Dn230 a partir de los fragmentos encontrados con los partidores UBC-66 en Avestruz y UBC-230 en Emú.

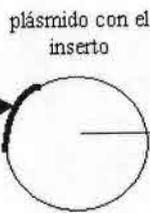
Un SCAR es un marcador (un segmento de DNA) amplificado por PCR que se obtiene a partir de una banda RAPD polimórfica asociada a algún rasgo de interés, por lo que el primer paso es encontrar un polimorfismo asociado a ese rasgo en un conjunto de individuos (screening). En el caso de este proyecto, en que el interés es determinar el sexo de aves ratites, el polimorfismo es una banda que sólo aparece en los ejemplares hembra al realizar un ensayo RAPD-PCR utilizando un determinado partidior.

El procedimiento para obtener este tipo de marcadores (Figura 1) es relativamente complejo pero puede resumirse como sigue:

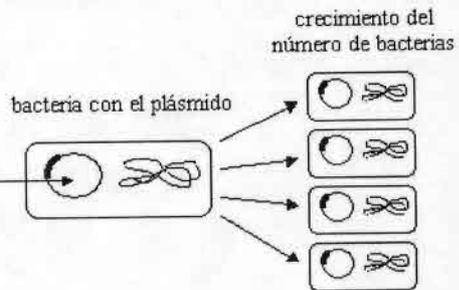
- El primer paso consiste en **aislar y purificar** desde un gel de agarosa, el fragmento de DNA amplificado por RAPD-PCR.
- El segundo paso consiste en **clonar**, es decir, aprovechar la capacidad replicativa de las bacterias para obtener muchas copias del fragmento RAPD clonado. Para ello se utiliza un vector (en este caso un plásmido) que es una molécula de DNA en la cual se inserta el fragmento de DNA de interés (ligación) y es ingresado dentro de las bacterias (transformación).
- Luego de hacer crecer las colonias bacterianas (clones) en un medio de cultivo adecuado, es necesario seleccionar aquellas que poseen el fragmento de interés, después de lo cual, se extrae el DNA plasmidial con el inserto (minipreps).
- Varios métodos pueden ser aplicados posteriormente para verificar el tamaño e identidad del fragmento clonado.
- El siguiente paso es **secuenciar** el fragmento que ha sido clonado, a partir de los plásmidos purificados obtenidos de las minipreps (secuenciar es conocer la secuencia de nucleótidos : adenina, timina, guanina, citosina que constituyen el DNA del fragmento que se ha clonado). Se debe obtener las secuencias de ambos extremos del fragmento (extremos 5' y 3' de la molécula de DNA: 5'-----> 3') de modo de analizar la zona del DNA donde el partidador RAPD se alinea y donde teóricamente existe un polimorfismo en las secuencias de bases nucleotídicas, que provoca la amplificación del marcador RAPD sólo en las hembras.
- El análisis de estos segmentos de la secuencia permite fabricar partidores específicos que abarcan las zonas polimórficas del fragmento.
- El marcador SCAR se obtiene cuando hay amplificación por PCR convencional con estos partidores, de un fragmento o banda, que

permite su asociación en forma inequívoca con el sexo respectivo, en este caso, hembra.

A. Electroforesis de los productos de RAPD-PCR



B. Clonamiento de la banda: inserción de la banda en un plásmido y amplificación en bacterias.



C. Extracción de los plásmidos desde las bacterias, secuenciación del inserto y diseño de nuevos partidores.

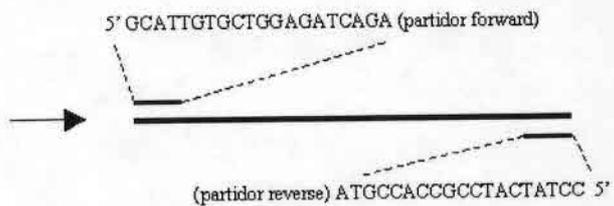


Figura 1.- Esquema de construcción de un SCAR

El protocolo utilizado para obtener marcadores SCAR (Figura 1) en avestruz y emú se detalla a continuación:

- PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO

Para aislar y purificar el fragmento RAPD presente sólo en las hembras de avestruz y emú se procedió de la siguiente manera: Para ambas especies se amplificó por PCR varias muestras (réplicas) de un ejemplar hembra, usando un macho como control negativo. Se corrieron los productos de

PCR en un gel de agarosa al 1,7%, desde el cual se cortó la franja que contenía el fragmento polimórfico de 350 pb para avestruz y de 1000 pb en emú. Este trozo se agregó a un tubo eppendorf de 1,5 mL para realizar la purificación con el kit QIAquick siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó en un volumen de 30uL de agua estéril y fue colectado en otro tubo eppendorf.

- LIGACIÓN

Para ligar estos fragmentos purificados con el vector de clonamiento se usó el kit de clonamiento TOPO TA (Invitrogen). Se mezclaron 5uL del fragmento purificado, 1uL de solución salina y 1uL de vector (plásmido pCR2.1TOPO) y se dejó esta mezcla incubando por 25 minutos a temperatura ambiente antes de congelar.

- TRANSFORMACIÓN

Los productos de ligación se mezclaron con 40uL de células DH5 α (cepa de *Escherichia coli* competente) en un tubo de 15mL y se mantuvieron en hielo durante 30 minutos. Paralelamente se precalentaron a 37°C dos placas de Petri (agar más medio LB) por especie a las cuales se agregaron 20uL de ampicilina (100mg/mL), 60uL de X-Gal (20ng/mL) y 20uL de IPTG. A la mezcla de células más el plásmido se le dio un pulso de calor a 42°C por dos minutos después de lo cual se le agregó 3 mL de medio LB precalentado a 37°C. Se dejaron crecer las células con agitación a 37°C por una hora. Se agregaron 200uL del cultivo a cada placa de Petri y se incubaron a 37°C por toda la noche.

- CRECIMIENTO DE LOS CLONES

Varias colonias bacterianas blancas (clones) fueron seleccionadas desde las placas para ambas especies, las cuales se hicieron crecer en tubos de 15mL con 3mL de medio TB y 25uL de ampicilina. Estos cultivos se

incubaron toda la noche a 37°C con agitación hasta que el medio se volvió turbio indicando crecimiento de las bacterias.

- MINIPREPs (extracción de ADN plasmidial por el método de lisis alcalina)

3mL de los cultivos de los clones fueron centrifugados a 14.000 rpm por dos minutos en tubos eppendorf de 1,5mL para sedimentar las células. A cada una de estas muestras se agregó 100uL una mezcla de glucosa (50mM), Tris (25mM) y EDTA (10mM) y se vorteoó (uso de equipo Vortex) hasta resuspender las células. Se agregaron 200uL de NaOH 0,2N (con SDS al 1%), se mezcló y se dejó incubar en hielo por 5 minutos. Se agregaron luego 200uL de KAc 5M y se repitió el procedimiento. Se centrifugó a velocidad máxima y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos eppendorf. Para precipitar el ADN plasmidial, se agregaron 300uL de isopropanol (100%), se mezcló y se centrifugó nuevamente, después de lo cual se descartó el isopropanol. Se dejaron secar los pellets y luego se agregó 300uL de LiCl 0,3M en TE 0,1X y 750 uL de etanol (100%) frío. Se mezcló y se centrifugo a velocidad máxima por 5 minutos descartándose el sobrenadante. Las muestras finalmente fueron resuspendidas en 40uL de TE 1X, a las que se le agregaron 10uL de RNAasa I (10ug/uL) para eliminar el ARN. Esta mezcla se dejó por una hora a 4°C antes de congelar.

- DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO

Para verificar si el inserto fue clonado, se digirieron cada uno de los productos de las minipreps con la enzima de restricción EcoRI, la cual tiene un sitio de reconocimiento en el polilinker del plásmido y es capaz de liberar el inserto en una sola etapa.

- AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO INSERTADO

Se realizó otro experimento para corroborar la presencia del fragmento deseado (inserto) en los clones obtenidos. Para esto se amplificó por PCR

un fragmento del plásmido que incluye el inserto usando partidores internos del plásmido. Los partidores (β Gal F y R) forman parte del kit de clonamiento TOPO TA. Esta amplificación se realizó en diluciones 1/50 de la miniprep respectiva.

- PREPARACIÓN DE STOCKS PERMANENTES

Se escogieron 5 clones para preservar las bacterias por tiempo indefinido, las cuales contienen el fragmento de interés. Para ello se tomaron los restos de cultivo que quedaron después de realizar las minipreps y se les agregaron 3mL de medio TB más 25 uL de kanamicina (100mg/uL). Se dejaron incubar con agitación por 4 horas a 37° C para aumentar la cantidad de células. De este cultivo se tomaron 850 uL y se mezclaron con 150 uL de glicerol, después de lo cual fueron congeladas y mantenidas en un freezer a -70° C.

- SECUENCIACION

Los productos de las minipreps fueron purificados con el kit QIAquick (QUIAGEN 28104) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron secuenciados en forma automática en un secuenciador ABI 770. Fragmentos de dos hembras de cada especie fueron secuenciados en ambos sentidos.

- DISEÑO Y SÍNTESIS DE PARTIDORES (OLIGONUCLÉOTIDOS) DEL SCAR

Las secuencias de cada especie fueron comparadas entre sí para detectar posibles diferencias entre ellas utilizando el programa BLAST disponible en la red. Después de verificar que las dos secuencias fueran idénticas se analizaron los extremos para detectar las zonas donde se alinea el partididor RAPD. Los partidores del SCAR fueron diseñados en estas zonas utilizando el programa Primer3 el cual permite verificar si los partidores forman estructuras secundarias o dímeros lo cual impediría la amplificación por

PCR. De este modo, se seleccionaron los mejores partidores y se envió a sintetizar un par (50ng de cada uno) por especie.

- AMPLIFICACIÓN CON LOS PARTIDORES DISEÑADOS DEL SCAR EN MUESTRAS DE DNA GENÓMICO DE AVESTRUZ.

Los partidores diseñados para avestruz fueron probados por PCR en DNA de individuos machos y hembras (extracciones con fenol). La mezcla de PCR para obtener el SCAR fue la siguiente (15µL de volumen total):

Reactivo	µL
H ₂ O	8,25
Buffer 10X	1,5
MgCl ₂ 50mM	0,6
DNTPs 10uM	0,15
partidorSc66F (10uM)	0,4
partidorSc66R (10uM)	0,4
Taqpolimerasa 5U/uL	0,2
DNA	3,5

Las condiciones de reacción son las siguientes (programa "touch down"):

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	3 minutos
2	94	1 minuto
3	45 más 1°C por ciclo	50 segundos
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, quince veces	
6	92	1 minuto
7	55	50 segundos
8	72	1 minuto
9	ir al paso 6, veinte veces	
10	72	5 minutos
11	10	indefinido

III.3.1.11 **Ámbito Estudio de Mercado**

OBJETIVO

Se realizó un análisis precomercial para identificar el potencial que tiene la metodología diseñada (sexaje mediante marcadores moleculares en ratites) para ser ofrecida como un servicio regular a los planteles productores de ratites.

AMBITO

Se realizó una evaluación del mercado potencial existente en nuestro país al cual podría ser ofrecido el servicio, esto es:

- Cantidad de planteles de ratites
 - o Estimación del número total de planteles con más de una unidad reproductiva (macho y hembra) para avestruz, emú y ñandú.
 - o Ubicación geográfica regional
- Número de aves
 - o Censar y clasificar la población de los entrevistados de acuerdo a etapas de crianza: inicial (0-3 meses), crianza engorda (4 a 1 año), animales a venta y reproductores.
 - o Indicar porcentajes de animales destinados a reposición y/o crecimiento.
- Tasa de crecimiento
 - o Indicar el incremento anual de animales reproductores y animales a venta que espera tener en el criadero.
 - o Indicar el incremento real obtenido el último año de animales reproductores y animales a venta.
- Nacimientos potenciales al año
 - o Indicar el número de huevos estimados a poner por hembra
 - o Indicar el número estimado de polluelos nacidos por criadero
 - o Indicar el número de huevos puestos por hembra la temporada anterior.

- Indicar el número de polluelos nacidos la temporada anterior
- Criaderos orientados a genética
 - Consultar si ha vendido animales como reproductores y cuántos
 - Consultar si espera vender animales reproductores y cuántos
 - Consultar si ha vendido asesoría (Know How) junto con la venta de animales como reproductores o si lo espera hacer.
- Certificación de sexo
 - Consultar a criaderos orientados a venta de genética con o sin asesoría si ha vendido animales sexados
 - Consultar acerca del método utilizado para sexar
 - Consultar acerca de la eficiencia en la determinación (%)
 - Consultar acerca de la devolución o reposición de animales mal sexados. Incluir comentarios.
 - Consultar a quiénes no han vendido genética pero si esperan vender si los venderá sexados o no
 - Consultar a quiénes no han vendido genética pero si esperan vender qué método ocuparía para sexar
- Sexaje mediante marcadores
 - Consultar a todos los productores si conoce o ha oído hablar respecto a la técnica de sexaje mediante marcadores moleculares
 - Consultar a todos comentarios al respecto
 - Consultar a todos si estaría dispuesto a aplicar la técnica de sexaje si necesitara asegurar el sexo de sus aves
 - Consultar a los que venden genética o estarían dispuestos a vender genética si sus compradores exigirían sexaje con este método para asegurar el diagnóstico
 - Consultar a todos el precio dispuesto a pagar por sexar mediante este método las aves.
 - Consultar a los que venden o desearían vender genética el precio dispuesto a pagar por sexar mediante este método las aves

- Consultar a los que venden o desearían vender genética el precio o costo involucrado en sexar las aves
- Consultar a precio dado a todos los productores si estarían dispuestos a sexar sus animales. .

También se determinó el interés real de los productores por acceder a este servicio de sexaje y la disposición de los mismos a pagar por él. El estudio exploró además las posibilidades de prestar servicios más avanzados de:

- Certificación de familias
 - Consultar respecto al interés de obtener una asesoría que certifique la existencia de consanguinidad en el plantel. Explicar concepto.
 - Consultar respecto al valor que le atribuye a ésta certificación si es que está interesado
 - Consultar respecto a la disposición a contratar el servicio a precio dado.
- Determinación de razas
 - Consultar respecto al interés de certificar raza de animales
 - Consultar respecto al valor que le atribuye a ésta certificación si es que está interesado
 - Consultar respecto a la disposición a contratar el servicio a precio dado.
- Planes de cruzamiento y selección
 - Consultar respecto al interés de implementar un plan de cruzamientos dentro del criadero
 - Consultar si considera importante este servicio y porqué (comentarios)
 - Consultar interés a precio dado.
- Servicios de investigación diversos en el área

- Consultar (abierto) respecto a otros temas que sean de su interés investigar o que considere necesario explorar.
- Consultar si está dispuesto a invertir en el desarrollo de los temas acotados.

OTRAS IMPLICANCIAS

El desarrollo del estudio se orientó a otras áreas de búsqueda tales como

- Sistema de producción
 - Tipo de crianza (confinamiento, pastoreo o mixto)
 - Incubación propia o contratada
 - Incluye en su sistema otros rubros.
 - Incluye en su criadero las tecnologías que se van incorporando
- Participación en cooperativas o asociaciones
 - Participa o ha participado en algún tipo de cooperativa o asociación. Indicar cuál, desde cuando y en caso que corresponda hasta cuándo.
 - Para los que participan, consultar respecto a cuál es el grado de participación
 - Para los que participan, consultar respecto a que beneficios le ha reportado participar. Ejemplificar
 - Para los que han participado preguntar causas de retiro
 - Para los que han participado preguntar si volverían a participar
 - Para los que no participan indicar si estarían interesados o no en participar y porqué.
- Nivel profesional y técnico del plantel
 - Consultar el nivel profesional del encargado del plantel
 - Consultar respecto a quién es el encargado de las siguientes labores e el plantel:

- Formulación de dietas
 - Manejo veterinario preventivo
 - Manejo veterinario curativo
 - Fabricación de alimentos
 - Venta de animales
 - Selección de reproductores
- Consultar cuántos profesionales, técnicos, operarios especializados y sin especialización trabajan directa e indirectamente en el plantel.
- Asesoría veterinaria
 - Consultar respecto a la participación de profesionales especializados en el manejo de los animales dentro del plantel
 - Consultar respecto a la calidad del personal que efectúa esta labor (si lo hay)
 - Consultar si estaría dispuesto a probar otras alternativas.
 - Le asigna valor a esta actividad. Cuál (comentarios)
- Asesoría nutricional
 - Consultar respecto a la participación de profesionales especializados en la formulación y fabricación de dietas dentro del plantel.
 - Consultar respecto a la calidad del personal que efectúa esta labor (si lo hay)
 - Consultar si estaría dispuesto a probar otras alternativas.
 - Reasigna importancia a esta labor. Cuál (comentar)
- Sistema de abastecimiento de alimentos e insumos.
 - Fabrica, compra o utiliza un sistema mixto para el abastecimiento de sus alimentos
 - En caso que fabrique sus propios alimentos que porcentaje de los mismos los produce en el predio
 - En caso que compre alimentos, dónde lo hace y porqué
 - En caso que utilice un sistema mixto indicar por qué.

- Aplica la información que se genera en el medio o mantiene constantemente la misma fórmula
- En caso que aplique la información, efectúa algún control productivo en el plantel. Indicar cuál.
- Parámetros productivos básicos en la última temporada de producción.
 - Indicar postura promedio por hembra año
 - Indicar tasa de fertilidad
 - Indicar tasa de eclosión
 - Indicar tasa de mortalidad por etapas
 - Indicar índice de conversión
 - Indicar tiempo requerido en alcanzar 100 Kg de peso vivo.
 - Respecto a la temporada anterior mejoró, mantuvo o disminuyó sus parámetros productivos
 - Para la próxima temporada productiva espera aumentar, mantener o disminuir sus parámetros productivos
- Forma de venta
 - Comercializa solo o asociado
 - Vende animales en pie o carne.
 - Qué hace con los cueros
 - Qué hace con los huevos infértiles
 - Qué hace con las plumas
 - Está conforme con los precios de venta alcanzados
- Visión subjetiva del productor y como se enmarca la iniciativa dentro de su plan actual de negocios
 - Consultar acerca de la visión particular del negocio de su rubro
 - Consultar acerca de la incorporación de tecnología y asesoría en los planteles.
 - Consultar acerca de la importancia que le da a lo que hacen los otros productores y si ha aplicado algún concepto o manejo visto a otro productor.

- Consultar acerca de la calidad de la investigación a la que accede, tanto nacional como internacional.

III.3.1.12 Determinación de costos técnica de sexaje

Se procedió a desarrollar la ficha técnica del proceso de sexaje mediante marcadores moleculares y a estimar el uso de insumos y su costo asociado, de acuerdo a los parámetros medidos hasta el momento. El objetivo de este estudio preliminar fue obtener un valor confiable para la aplicación del estudio de mercado.

La ficha técnica del proceso se explica en la siguiente tabla

TOMA DE MUESTRA

- Bolsa plástica
- Silica Gel

CAMARA ALMACENAMIENTO

PREPARACIÓN DE MUESTRA

- Aplicación proteinaza K
- Aplicación Quelex
- Puntas (3)
- Tubo Eppendorf

CENTRIFUGACIÓN

DILUCIÓN

- Tubo Eppendorf
- Buffer TE
- Puntas (2)

AMPLIFICACIÓN

- Tubo Placa

- Agua estéril bidestilada
- TAQ
- Primer (partidores)
- DNTPs
- Aceite mineral
- Puntas (8)
- Alusa

ELECTROFORESIS

- Buffer TBE
- Agarosa
- Buffer de Carga
- Bromuro de Etidio
- Parafilm
- Puntas (3)

De acuerdo a este esquema los costos asociados al servicio de análisis tienen involucrado los siguientes servicios de laboratorio

- Técnico de laboratorio (0,32 HH)
- Profesional responsable (0,4 HH)
- Uso de equipos
- Gastos Generales

El proceso tiene una duración de 8 horas entre el inicio y la obtención del resultado. Los costos asociados se detallan para una muestra y para una batería de 100.

III.3.1.13 Extracción de DNA de plumas de ñandú con resina chelex

Se utilizaron plumas de individuos adultos de ñandú de ambos sexos (6 machos y 6 hembras) obtenidas de cuello, alas y pecho de cada uno de los animales. Al igual que lo observado en las otras dos especies se encontró dos tipos de pluma, independientemente de su sexo, a las que se denominó "gruesa" y "delgada". Las plumas de ñandú tienen dimensiones menores que las de avestruz, siendo en tamaño muy similares a las de emú (cálamo de un centímetro de largo en las plumas "gruesas" y de cinco milímetros en las "delgadas"). Teniendo en cuenta estas diferencias morfológicas se procedió a extraer DNA a partir de los distintos tipos de plumas siguiendo el protocolo descrito en II.3.1.7

III.3.1.14 Amplificación por PCR de muestras extraídas con chelex.

Se utilizó la técnica RAPD-PCR en muestras de DNA obtenidas de plumas de ñandú para establecer si la cantidad y la calidad de DNA extraído era adecuada para realizar amplificación por PCR.

III.3.1.15 Constitución de Familias

La construcción de un marcador molecular que permita realizar la asignación correcta y confiable del sexo, debe contar con el estudio de su modo de herencia. En nuestro caso, se espera que el marcador presente en las madres (hembras) sea transmitido solamente a las hijas y nunca a los hijos. Debido a la similitud morfológica y genética de los cromosomas Z y W, pudiera ser que con cierta frecuencia se produjera recombinación entre estos cromosomas en el proceso de maduración de los gametos (meiosis). Como consecuencia de este fenómeno, se puede esperar que el marcador sea transferido desde el cromosoma W al cromosoma Z, pudiendo entonces estar presente el marcador también en los machos. Para descartar que este fenómeno esté ocurriendo con los marcadores construidos, se estudió la segregación de éstos en familias, en que se tomó muestras de los padres e hijos recién nacidos y se realizó el seguimiento en los hijos para corroborar el modo de herencia y la cosegregación del sexo del

individuo para corroborar el modo de herencia del marcador. Conjuntamente, se podrá establecer la edad o tamaño mínimo de las plumas que deben extraerse a los polluelos para realizar las pruebas moleculares en forma correcta y confiable.

III.3.1.16 Ensayo de "gen candidato" EE0.6

Un "gen candidato" se define, en general, como un gen o secuencia de DNA localizado en una región cromosómica que se sospecha pudiera estar involucrado en la expresión de un rasgo bajo estudio o asociado a una característica en estudio, en este caso, el sexo.

Interesa, entonces buscar un gen o marcador que estando presente en los cromosomas sexuales de algún animal, en este caso, un ave, pudiera ser estudiado para verificar si en las especies de ratites estudiadas en este proyecto, también se comporta como un marcador asociado al sexo.

Esta estrategia ("candidate gene/association approach"), está siendo ampliamente utilizada en estudios genéticos con animales "modelos" y mamíferos domésticos. Tiene su base teórica en el paradigma de la genómica comparada.

Se eligió para su estudio en ratites un marcador aislado a partir del cromosoma W de pollo (*Gallus gallus*) denominado EE0.6 (0.6 kb EcoRI fragment), que corresponde a una secuencia de DNA no repetida. Se estudió la secuencia publicada y se diseñaron los partidores adecuados para amplificar por PCR esta secuencia en las tres especies de ratites. La secuencia de estos partidores es la siguiente:

EE0.6F 5' AGA GTC ATT GTG GCC TTG AAC 3'

EE0.6R 5' GAA TCA AGC CAA TGC TCC TT 3'

Las condiciones experimentales de PCR fueron las siguientes:

A) Mezcla de reacción:

Reactivo	μL
H ₂ O	10,8
Buffer (10X)	2,0
MgCl ₂ (50mM)	0,8
dNTPs (10mM)	0,35
partidores EE06 (10 μM)	0,35 c/u
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,35
DNA (6ng/ μL)	4,6

B) Programa de amplificación:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	64	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 30 veces	
6	72	10 minutos
7	10	infinito

En dos hembras y dos machos de emú se procedió a aislar y purificar desde el gel el producto amplificado para su posterior secuenciación.

III.3.1.17 Estudio de Mercado

Objetivo: Realizar un diagnóstico del mercado potencial para la metodología "sexaje mediante marcadores moleculares", conociendo el manejo productivo y reproductivo que realizan los planteles de RATITES y la aceptación potencial de este nuevo Método de sexaje.

Objetivos Específicos

- I. Tamaño de los planteles
- II. Parámetros productivos y reproductivos

- III. Sistema de producción
- IV. Nivel profesional y técnico del plantel
- V. Manejo de la certificación de sexaje
- VI. Aceptación potencial técnica sexaje mediante marcadores moleculares

Metodología

TIPO DE ESTUDIO

Entrevistas dirigidas a dueños de planteles de Avestruz y Emú.

METODO

Entrevistas telefónicas utilizando un cuestionario estándar de alrededor de 20 minutos de duración.

PUBLICO OBJETIVO

Dueños o encargados del manejo de planteles de Avestruz y Emú.

MUESTRA

Se realizaron 22 entrevistas con la siguiente distribución por tamaño del plantel.

TOTAL	HASTA 60 ANIMALES	MAS DE 60 ANIMALES
22	12	10

En el **anexo N°1** se entrega el informe completo del Estudio de Mercado.

III.3.1.18 Amplificación con los partidores diseñados para el SCAR Dn230 en muestras de DNA genómico de emú.

Los partidores diseñados para emú fueron probados por PCR en DNA de individuos machos y hembras (muestras de DNA extraídas con fenol). Se probaron

2 protocolos diferentes cuyas mezclas y condiciones fueron las siguientes (15 μ L de volumen total):

A) PCR convencional:

Reactivo	μ L
H ₂ O	7,75
Buffer 10X	1,5
MgCl ₂ 50mM	0,6
dNTPs 10 μ M	0,15
partidorDn230F (10 μ M)	0,4
partidorDn230R (10 μ M)	0,4
Taqpolimerasa 5U/uL	0,2
DNA	4,0

Programa de amplificación (se probaron distintas temperaturas de alineamiento, paso 3):

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	62-66	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 29 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

B) Touch down.

Reactivo	μ L
H ₂ O	8,25
Buffer 10X	1,5
MgCl ₂ 50mM	0,6
dNTPs 10 μ M	0,15
partidorDn230F (10 μ M)	0,4
partidorDn230R (10 μ M)	0,4

Taqpolimerasa 5U/uL	0,2
DNA	3,5

Programa del termociclador:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	3 minutos
2	92	1 minuto
3	55 más 1°C por ciclo	50 segundos
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, quince veces	
6	92	1 minuto
7	64	50 segundos
8	72	1 minuto
9	ir al paso 6, veinte veces	
10	72	5 minutos
11	10	infinito

III.3.1.19 Construcción de SCAR Ptp187 en ñandú y nuevo SCAR Dn70 en emú

Se procedió a construir el marcador SCAR Ptp187 a partir del marcador RAPD obtenido con el partidor UBC187, que fue uno de los tres que mostró asociación con el sexo femenino en ñandú. En emú se construyó el SCAR Dn70 a partir del marcador polimórfico ligado al sexo femenino obtenido con el partidor RAPD UCB70. El protocolo de construcción estos marcadores SCARs se realizó de acuerdo al procedimiento detallado en III.3.1.10

III.3.1.20 Amplificación con los partidores diseñados del SCAR Ptp187 en muestras de DNA genómico de ñandú.

Se probó un PCR convencional en muestras de DNA extraídas con fenol de 6 machos y 6 hembras de ñandú. Se probaron distintas temperaturas de alineamiento (paso 3).

Reactivo	μL
H ₂ O	8,25
Buffer 10X	1,5
MgCl ₂ 50mM	0,6
dNTPs 10 μM	0,15
partidorPtp187F (10 μM)	0,4
partidorPtp187R (10 μM)	0,4
Taqpolimerasa 5U/uL	0,2
DNA	3,5

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	65-70	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 29 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

III.3.1.21 Formación de familias adicionales de emúes

Se agregaron 3 familias de emúes provenientes del Criadero Suizo de Puerto Montt.

III.3.1.22 Formación de familias de ñandúes.

Se obtuvieron muestras de 3 familias de ñandú. Cada familia estuvo formada por un macho y varias hembras y sus respectivos polluelos. De estos individuos se recibieron muestras de plumas (de los padres) y de sangre (de los hijos).

III.3.1.23 Metodología de toma de muestra en animales juveniles (polluelos) y adultos para las tres especies de ratites

Con objeto de mejorar la eficiencia y el tiempo de extracción de DNA, tanto en individuos adultos como en polluelos de las tres especies analizadas, se evaluaron distintos protocolos de extracción de DNA con plumas.

Los protocolos utilizados fueron los siguientes:

Protocolo 1:

Se cortaron con tijeras limpias uno o más cálamos en trozos de aproximadamente 3 mm. Cada muestra se lavó en agua estéril en un tubo eppendorf. Se eliminó el agua y se agregó 200 uL de resina chelex al 5% y 2uL de proteinasa K (20mg/mL) a cada muestra. Los tubos se incubaron a 55°C por 2 horas.

Los tubos se agitaron 15 segundos en vortex y se incubaron a 95°C por quince minutos.

Los tubos se agitaron nuevamente y se centrifugaron a 14000 rpm.

Se realizaron diluciones 1/5 en buffer TE 0,1X y se almacenaron todas las muestras a -20°C.

Protocolo 2:

Corte un trozo de cálamos de 3 mm con tijeras limpias, colocar en un tubo eppendorf y agregar 150 uL de resina chelex al 5% a cada muestra. Colocar los tubos en agua en ebullición por 10 minutos, agitar los tubos en un vortex por 15 segundos y centrifugar a 14000 rpm. por 10 minutos. Inmediatamente realizar la reacción de PCR.

Protocolo 3:

Corte un trozo de cálamo de 3 mm con tijeras limpias, colocar en un tubo eppendorf y agregar a cada muestra 40 uL. de NaOH (0.2 N) y dejar a 75° C por 20 minutos, posteriormente agregar 180 uL de tris-HCl (0.04 M). Centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Inmediatamente realizar la reacción de PCR.

Protocolo 4:

Corte un trozo de cálamo de 3 mm con tijeras limpias colocar en un tubo eppendorf. Agregar 200 uL de resina chelex al 5% a cada muestra. Dejar los incubando a 56°C durante toda la noche. Agitar los tubos por 15 segundos en vortex e incubar en agua en ebullición por 8 minutos y posteriormente centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm.

III.3.1.24 Evaluación de toma de muestras en polluelos de emú y ñandú.

Además de la extracción de DNA a partir de plumas, se evaluó la toma de muestra de sangre en polluelos. Se diseñó un sistema que consistió en realizar una pequeña punción en el antebrazo en emú y brazo y muslo en ñandú, con ayuda de una lanceta estéril (Blood lancet) de extracción de sangre, absorbiéndose una o dos gotas de sangre con una tira de papel filtro de 2 mm por 30mm, la cual se deposita dentro de un tubo eppendorff de 1.5 mL estéril, el cual se transporta hasta el laboratorio.

Estas muestras se sometieron a los mismos métodos de extracción detallados en III.3.1.3 y III.3.1.7, con la diferencia de que para la extracción se utilizó un trozo de papel filtro 2 mm por 2 mm embebido con sangre.

III.3.1.25 Sexaje de familias de avestruz, emú y ñandú.

Se extrajo DNA de tres familias de avestruz (15 animales), 2 familias de emúes (28 animales) y tres familias de ñandúes (19 animales) siguiendo los protocolos de extracción descritos en III.3.1.3, y III.3.1.7. En las familias de avestruz se utilizó el marcador SCAR Sc66, en las familias de emú el partidor RAPD 230 y en las familias de ñandú fue utilizado el SCAR Ptp187. Los protocolos de amplificación por PCR de cada marcador están descritos en III.3.1.10 (avestruz), III.3.1.9 (emú) y III.3.1.20 (ñandú).

III.3.1.26 Amplificación con los partidores diseñados para el SCAR Dn70 en muestras de DNA genómico de emú.

Los partidores diseñados para emú fueron probados por PCR en DNA de individuos machos y hembras (muestras de DNA extraídas con fenol). Se probaron 2 protocolos diferentes cuyas mezclas y condiciones fueron las siguientes (15µL de volumen total):

A) PCR convencional:

Reactivo	µL
H ₂ O	7,75
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,6
dNTPs (10mM)	0,15
partidorDn700F(10µM)	0,4
partidorDn70R (10µM)	0,4
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
DNA	4,0

Programa de amplificación (se probaron distintas temperaturas de alineamiento, paso 3):

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	65-68-70	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 29 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

B) Touch down.

Reactivo	μL
H ₂ O	8,25
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,6
dNTPs (10mM)	0,15
partidorDn70F (10 μM)	0,4
partidorDn70R (10 μM)	0,4
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,2
DNA	3,5

Programa del termociclador:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	3 minutos
2	92	1 minuto
3	55 más 1°C por ciclo	50 segundos
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, quince veces	

6	92	1 minuto
7	64	50 segundos
8	72	1 minuto
9	ir al paso 6, veinte veces	
10	72	5 minutos
11	10	infinito

III.3.1.27 Construcción de nuevo SCAR DnG9 en emú (tercero).

Se procedió a construir el marcador SCAR DnG9 a partir del marcador RAPD obtenido con el partidor OPG-9 (Operon Technologies), que es uno de los 3 hallados que muestra asociación con el sexo femenino en emú. La metodología es la descrita en III.3.1.10.

III.3.1.28 Búsqueda de microsatélites en avestruces para determinar consanguinidad

Se realizó una búsqueda de microsatélites de aves Ratites en GenBank y bases de datos de publicaciones científicas.

Sólo se encontraron microsatélites descritos para avestruz en las dos publicaciones que se señalan a continuación:

1. Kumari, P. & Kemp, S. J. (1998) Polymorphic microsatellite markers in the ostrich (*Struthio camelus*). *Molecular Ecology*, 7(1): 133-134.
2. Kimwele, C.N., Graves, J., Burke, T. & Hanotte, T. (1998). Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks using hatched eggs in the ostrich *Struthio camelus*. *Molecular Ecology*, 7(2): 249-251.

En la primera publicación se describen 14 microsatélites que fueron útiles para distinguir entre subespecies de avestruz. En la segunda referencia se describen otros siete microsatélites.

Algunos de los microsatélites descritos en estas dos publicaciones fueron utilizados exitosamente para estudios de parentesco en nidos de avestruces silvestres:

3. Kimwele, C.N., Graves, J. (2003) A molecular genetic analysis of the communal nesting of the ostrich (*Struthio camelus*). *Molecular Ecology*, 12: 229-236.

En este trabajo se concluye que siete microsatélites fueron suficientes para establecer las relaciones de parentesco entre varias familias de estas aves.

Síntesis de partidores para microsatélites.

Se escogieron siete microsatélites de las publicaciones anteriores tomando en cuenta la variabilidad observada en estos estudios y las diferencias de tamaño de los alelos en cada locus.

Se enviaron a sintetizar partidores para siete microsatélites, OSM4, OSM5, OSM6 y OSM7 (referencia 1) y LI05, LI09 y LI014 (referencia 2):

OSM4F: 5'-ATC ACT TTG CTG AAG TCA AAG G-3'

OSM4R: 5'-CTA ACA GAG ATC TGG GCG GA-3'

OSM5F: 5'-GTG GAT CAG TTC AAT CCT TGC-3'

OSM5R: 5'-GCC CAA GAA AAT GAT GGA GA-3'

OSM6F: 5'-TTT GAC CAT TCA GCA TGC AT-3'

OSM6R: 5'-AGA ACT GCT GCC TTT CCT CA-3'

OSM7F: 5'-AGC ATA CAC ATG CAG ACC CC-3'

OSM7R: 5'-TGT TTC CTG CCA TTC TGT CA-3'

LI05F: 5'-ATG GTG CTT TCC AGT GGT GTG C-3'

LI05R: 5'-CAT TGA CCC AGG CAA GAA ATC C-3'

LI09F: 5'-CAT TGC AAA CAC TCT GCT GC-3'

LI09R: 5'-TGA ACG ACA GGG TTA TTG GC-3'

LI014F: 5'-ATC ATC CCA GTC AGG AGC ACC-3'

LI014R: 5'-TCT GTG GAA GCA GGT CTT GG-3'

III.3.1.29 Protocolos para amplificación de microsatélites

Se probaron los siete microsatélites en 4 muestras de DNA de avestruces adultos sexados (los mismos ejemplares utilizados para el screening de marcadores polimórficos asociados al sexo). Los protocolos probados hasta la fecha se basan en los descritos en la referencia 3. La mezcla de PCR utilizada para amplificar los siete microsatélites fue la siguiente:

Reactivo	μL
H ₂ O	11,65
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,45
dNTPs (10mM)	0,3
partidor F (10 μM)	0,5
partidor R (10 μM)	0,5
Taqpolimerasa (5U/ μL)	0,1

DNA (6ng/ μ L) 1,0

El programa de amplificación fue:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4 minutos
2	94	10 segundos
3	56-59	30 segundos
4	72	30 segundos
5	ir al paso 2, 27-30 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

La temperatura de annealing (paso 3) varía de un microsatélite a otro. Se ha variado el número de ciclos (paso 5) para optimizar la cantidad y la calidad de los fragmentos amplificados.

III.3.1.30 Toma de muestras de sangre de familias de avestruces

El 3 de mayo de 2004 se tomaron muestras de sangre de varias familias de avestruces del plantel Aguas Claras ubicado en la comuna de San Esteban, V región del país. Para coleccionar las muestras se utilizaron tiras de papel filtro para absorber una gota de sangre de cada animal que se guardaron en tubos eppendorf. Se tomaron tres de estas muestras por cada animal.

Se tomaron muestras por triplicado de 54 polluelos y 14 adultos pertenecientes a 9 familias del plantel. Se coleccionaron como mínimo 5 polluelos por familia. Todos los polluelos tenían padres identificados. A continuación se indican los números de identificación de todos los individuos muestreados:

Familia 1	Familia 2	Familia 3
-----------	-----------	-----------

Polluelo	Hembra	Macho	Polluelo	Hembra	Macho	Polluelo	Hembra	Macho
114	133	7	312	134	7	51	131	6
69	133	7	103	134	7	8	131	6
300	133	7	388	134	7	86	131	6
273	133	7	317	134	7	120	131	6
297	133	7	406	134	7	106	131	6
288	133	7	277	134	7			
436	133	7						

Familia 4			Familia 5			Familia 6		
Polluelo	Hembra	Macho	Polluelo	Hembra	Macho	Polluelo	Hembra	Macho
84	122	58	105	128	58	306	20	43
323	122	58	275	128	58	320	20	43
232	122	58	281	128	58	367	20	43
353	122	58	54	128	58	360	20	43
241	122	58	97	128	58	268	20	43
455	122	58	99	128	58	315	20	43
447	122	58						

Familia 7			Familia 8			Familia 9		
Polluelo	Hembra	Macho	Polluelo	Hembra	Macho	Polluelo	Hembra	Macho
272	125	43	370	18	47	387	132	47
363	125	43	342	18	47	398	132	47
298	125	43	354	18	47	411	132	47
94	125	43	87	18	47	417	132	47
203	125	43	221	18	47	453	132	47

352	18	47	48	132	47
-----	----	----	----	-----	----

III.3.1.31 Extracción de DNA y amplificación de microsatélites de muestras de sangre.

Se probaron dos métodos de extracción de DNA a partir de fragmentos de papel filtro embebido en sangre para evaluar el mejor método de extracción para amplificar microsatélites. Estos protocolos fueron probados anteriormente para extraer DNA de sangre y plumas en Ratites.

- A. Fenol: Se cortó un trozo de aproximadamente 5x3mm de papel filtro embebido en sangre y se realizó una extracción con fenol-cloroformo idéntica a la utilizada para extraer DNA de sangre de Ratites (Informe 1).
- B. Chelex: Se cortó un trozo de aproximadamente 1mm² de papel filtro embebido en sangre y se calentó a ebullición por 10 minutos en 100μL de resina chelex al 5%.

Se amplificaron 4 muestras extraídas con cada método con el microsatélite OSM5. En el caso del DNA extraído con chelex, se utilizó una dilución del sobrenadante para realizar el PCR. Como controles se usaron muestras de DNA de 6ng/μL.

III.3.1.32 Amplificación con los partidores diseñados del SCAR DnG9 en muestras de DNA genómico de emú

Los partidores diseñados para emú fueron probados en DNA de seis machos y de seis hembras (muestras de DNA extraídas con fenol.) Se probó diferentes protocolos de PCR para finalmente optimizar la mezcla de reacción y condiciones según se indica a continuación (15μL de volumen total):

PCR convencional:

Reactivo	μL
H ₂ O	8,25
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,6
dNTPs (10mM)	0,15
partidorDnG9F (10 μM)	0,4
partidorDnG9R (10 μM)	0,4
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,2
DNA	3,5

Programa de amplificación :

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	60	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2,	29 veces
6	72	5 minutos
7	10	infinito

III.3.1.33 Sexaje de Familias de emú con el marcador DnG9

Se procedió a amplificar el marcador SCAR DnG9 en las familias de emú provenientes del Criadero Suizo, Puerto Montt, para sexaje. Debido a problemas metodológicos con la extracción de DNA de la familia n° 1, ésta no se consideró para la validación del marcador SCAR DnG9.

III.3.1.34 Análisis de Parentesco Genético

Introducción

Desde el punto de vista genético se considera que dos individuos son parientes cuando tienen uno o más ancestros comunes o uno de ellos es un antecesor del

otro. En términos matemáticos el cálculo del parentesco desde un pedigrí es relativamente simple, dado que el parentesco mide la cantidad de genes en común que comparten dos individuos, este valor decrece en un factor de $\frac{1}{2}$ por cada generación que separa a los individuos analizados de su antecesor común, siempre que no existan individuos consanguíneos en la genealogía (ver mas adelante).

De este modo se puede estimar matemáticamente el parentesco genético entre dos hermanos (separado sólo de una generación de sus ancestro comunes, el padre y madre) es $\frac{1}{2}$, al igual que el parentesco padre-hijo, para dos medios hermanos es $\frac{1}{4}$, para dos primos (primer grado) es de $\frac{1}{8}$ y así sucesivamente. Cuando existen individuos consanguíneos el cálculo del parentesco desde una genealogía conocida puede realizarse por medio de la formula propuesta por Sewall Wright (1922):

$$R_{XY} = \frac{\sum (\frac{1}{2})^{n1+n2} (1 + F_A)}{[(1 + F_X)(1 + F_Y)]^{1/2}}$$

Donde:

- 1. $n1$ = número de generaciones que separan al ancestro común del individuo
- 2. $n2$ = número de generaciones que separan al mismo ancestro común del individuo
- F_A = Coeficiente de consanguinidad del ancestro común
- F_X y F_Y = Coeficientes de consanguinidad de los padres los individuos X e Y a los que se les estima el parentesco.

Todo esto sumado a través del número de ancestros comunes, como lo indica la sumatoria en la fórmula.

Si bien es sencillo estimar el parentesco entre dos individuos a partir de una genealogía conocida, esto puede realizarse cuando se llevan registros detallados de los nacimientos de los individuos en un plantel productivo de animales. Este

análisis simple se complica cuando estos registros no existen y se requiere conocer el parentesco de los individuos. El uso de marcadores moleculares codominantes, tales como proteínas (alozimas) o microsatélites, permite estimar el parentesco genético de dos individuos cuyo genotipo es conocido para varios loci, cuando también se conocen las frecuencias alélicas poblacionales. En este caso el coeficiente de parentesco r_{xy} definido para marcadores moleculares corresponde a dos veces la probabilidad de que un gen tomado al azar de un "individuo x" sea idéntico por descendencia con un gen tomado al azar de un "individuo y" en un locus cualquiera, ponderando la contribución de varios loci para obtener una estimación multilocus (Lynch y Ritland 1999).

Estimación de Consanguinidad

La consanguinidad se produce por el apareamiento de individuos emparentados y se estima por medio del coeficiente de consanguinidad **F**, que mide la probabilidad de que dos individuos posean genes idénticos por descendencia, y que se puede calcular de acuerdo a la fórmula de Wright (1922):

$$F = \sum \left(\frac{1}{2} \right)^{n_1 + n_2 + 1} (1 + F_A), \text{ donde:}$$

n1 = número de generaciones que separan al ancestro común del padre 1.

n2 = número de generaciones que separan al mismo ancestro común del padre 2.

F_A = Coeficiente de consanguinidad del ancestro común.

Para estimar la consanguinidad debe necesariamente asignarse correctamente la paternidad (o maternidad) de todos los individuos involucrados en el cálculo.

Asignación de paternidad (o maternidad)

En un análisis clásico de paternidad se estima la probabilidad de excluir a un determinado individuo como padre de la progenie analizada sobre la base de conocer su propio genotipo, el genotipo de la progenie y el genotipo de la madre para una serie de loci microsatélites. Este proceso idealmente debe llegar a producir un único individuo no excluido como padre. Esta es la base del algoritmo utilizado para la exclusión de paternidad realizada con humanos. Sin embargo, este método de exclusión puede ser insuficiente para asignar correctamente la paternidad cuando hay muchos posibles padres candidatos que no son excluidos como padres por medio de este método, como puede ocurrir en poblaciones de animales, y donde también es probable que no todos los padres candidatos estén presentes entre los individuos analizados. Para resolver la asignación de paternidad cuando varios padres no son excluidos *a priori* se utiliza una razón de verosimilitud (ΔL), que corresponde a la probabilidad de paternidad (likelihood) de un padre particular en relación con la probabilidad de paternidad de un padre arbitrario seleccionado al azar de la población (Marshall y col. 1998).

Como resultado de los análisis de asignación de paternidad o maternidad, hay que considerar dos probables escenarios de fracaso en la asignación. Un primer escenario es que el verdadero padre (o madre) no se encuentre entre los individuos analizados como posibles padres. Segundo, que dos individuos compartan el mismo genotipo y la paternidad (o maternidad) no puede ser asignada en forma no ambigua. El primer caso el problema se resuelve conociendo el genotipo de todos los individuos parentales posibles, estrategia fácil de implementar en un plantel productivo de avestruces. En el segundo caso se debe incorporar una mayor cantidad de marcadores genéticos (loci microsatélites) al análisis, que permitan resolver inequívocamente la asignación de parentesco. Ambas estrategias involucran un mayor esfuerzo de tipificación para conocer el genotipo de los individuos que incrementa los costos del análisis de parentesco, de modo que el productor debe evaluar el costo-beneficio de asignar parentesco a los individuos que en un primer análisis no fue posible de asignar con certeza a una pareja de padres, en relación con el manejo que desee hacer en su plantel de

avestruces. En este contexto una alternativa razonable es no utilizar en cruzamientos individuos en los que no se conoce con “certeza genética” su genealogía.

III.3.1.35 Elección de Microsatélites en Avestruces para Determinar Parentesco y Paternidad.

De los siete microsatélites seleccionados por la búsqueda bibliográfica se seleccionaron seis para el estudio de parentesco. Se eliminó del estudio el marcador LI014 ya que, a pesar de realizar distintos protocolos de PCR, no se logró obtener fragmentos discretos, es decir individualizar los alelos esperados. Se envió a sintetizar un partidor de cada locus con una modificación química en su extremo 5' con los fluorocromos: FAM azul, VIC verde y NED amarillo (Applied Biosystems CA, USA). En la **Tabla 1** se muestran los loci microsatélites seleccionados, la referencia y el fluorocromo con que se marcó el partidor Forward de cada marcador.

IV. Locus	V. Secuencia partidor F (forward) (5' > 3')	VI. Referencia	Fluorocromo
OSM4	ATC ACT TTG CTG AAG TCA AAG G	Kimwele et al., 1998	VIC
OSM5	GTG GAT CAG TTC AAT CCT TGC	Kimwele et al., 1998	VIC
OSM6	TTT GAC CAT TCA GCA TGC AT	Kimwele et al., 1998	NED
OSM7	AGC ATA CAC ATG CAG ACC CC	Kimwele et al., 1998	NED
LI05	ATG GTG CTT TCC AGT GGT GTG C	Kumari y Kemp, 1998	FAM
LI09	CAT TGC AAA CAC TCT GCT GC	Kumari y Kemp, 1998	FAM

Tabla 1. Loci microsatélites seleccionados para su estudio con técnicas de fluorescencia en avestruz

Una vez recibidos los partidores, se diluyeron según las instrucciones del fabricante, almacenándose a 4°C. Se preparó una solución de 10µM como solución de trabajo de cada partidor fluorescente.

Como primer paso se procedió a amplificar por PCR los 6 loci microsatélites en 2 individuos de cada población con el objeto de verificar que el protocolo de amplificación daba los resultados esperados de acuerdo con los experimentos previamente realizados con partidores no fluorescentes. Los productos amplificados fueron resueltos en un equipo de Secuenciación ABI 377 provisto de los programas necesarios para el análisis de fragmentos (Figura 2). Todos los partidores produjeron amplificación adecuada, sin embargo, prácticamente para todos ellos se procedió a realizar pequeñas modificaciones en el protocolo con el objeto de optimizar la cantidad de producto de amplificación. En este caso, las amplificaciones se resolvieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se repitieron los ensayos hasta optimizar cada protocolo para comenzar el estudio en las familias de avestruz.

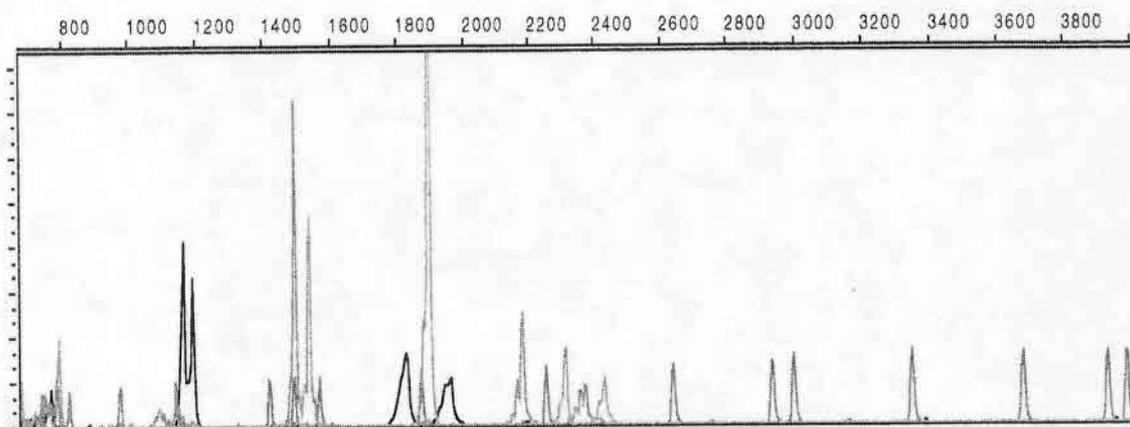


Figura 2. Perfil de fluorescencia de los alelos de distintos microsatélites con distintos fluorocromos. Los alelos de cada microsatélite corresponden a las

señales más intensas (mayor altura) de distintos colores. Las señales de color rojo corresponden al estándar de tamaño (Rox). La escala horizontal indica el tamaño de los alelos.

III.3.1.36 Formación de familias de avestruz para el estudio con microsatélites

En la Figura 3 se indica la composición de las familias escogidas para el estudio con microsatélites identificando cada individuo con el número de plantel. En este esquema se sintetizan las relaciones de parentesco entre los progenitores de las familias.

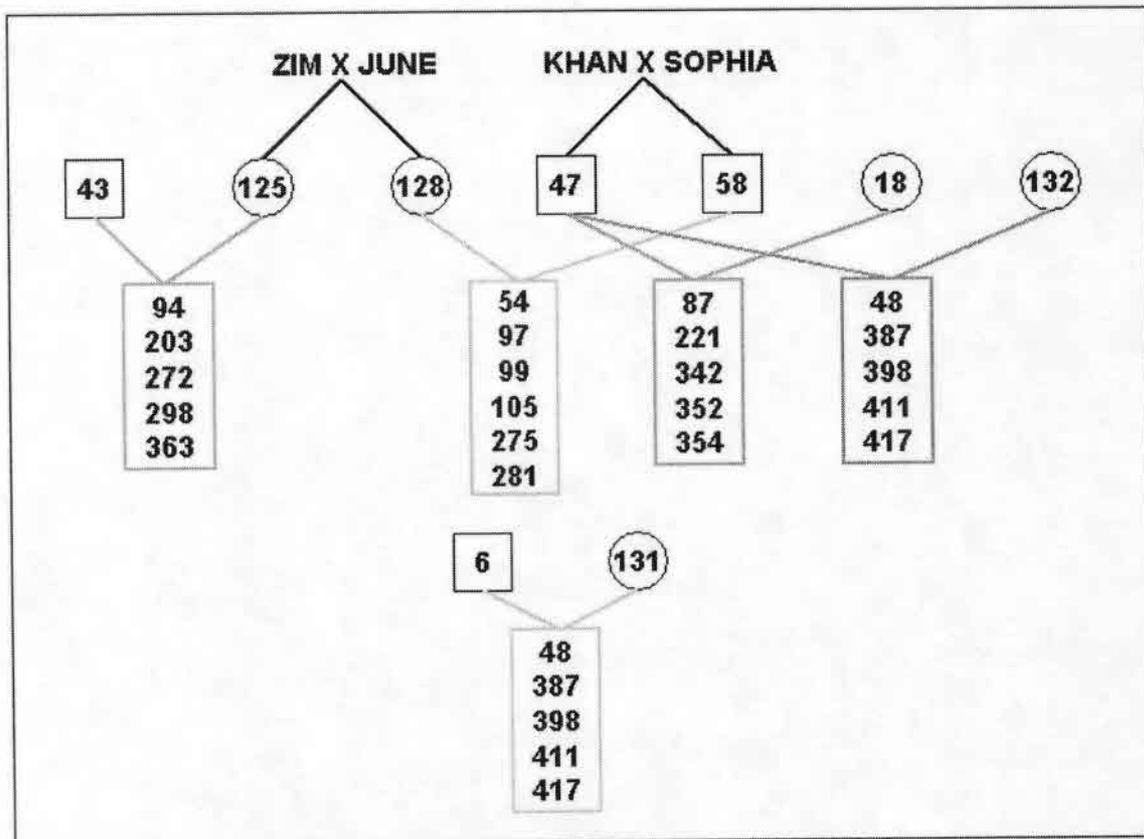


Figura 3. Relaciones de parentesco entre los individuos incluidos en el estudio con microsatélites. Los progenitores machos se indican con un cuadrado y las

hembras con un círculo. Los polluelos de cada familia se indican dentro los rectángulos. Las familias se diferencian por colores.

III.3.1.37 Protocolos para amplificación por PCR de microsatélites fluorescentes

La mezcla de PCR y el perfil térmico (programa) utilizado para amplificar cada microsatélite se especifican a continuación. Las diferencias entre las mezclas fueron la cantidad de $MgCl_2$ y en los programas, el número de ciclos y la temperatura de annealing (paso 3).

OSM4 (verde):

Reactivo	μL
H ₂ O	11,05
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,45
dNTPs (10mM)	0,3
partidor OSM4F (10 μ M)	0,3
partidor OSM4R (10 μ M)	0,3
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0,1
DNA	1,0

Programa de amplificación :

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	55	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 31 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

OSM5 (verde):

Reactivo	μL
H ₂ O	11,05
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,45
dNTPs (10mM)	0,3
partidor OSM5F (10 μM)	0,3
partidor OSM5R (10 μM)	0,3
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,1
DNA	1,0

Programa de amplificación :

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	59	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 27 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

OSM6 (amarillo):

Reactivo	μL
H ₂ O	11,05
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,45
dNTPs (10mM)	0,3
partidor OSM6F (10 μM)	0,3
partidor OSM6R (10 μM)	0,3
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,1
DNA	1,0

Programa de amplificación :

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	56	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 29 veces	
6	72	5 minutos

4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 27 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

LI09 (azul):

Reactivo	μL
H ₂ O	11,1
Buffer (10X)	1,5
MgCl ₂ (50mM)	0,4
dNTPs (10mM)	0,3
partidor LI09F (10 μM)	0,3
partidor LI09R (10 μM)	0,3
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,1
DNA	1,0

Programa de amplificación :

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	55	1 minuto
4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 27 veces	
6	72	5 minutos
7	10	infinito

Para el análisis en el secuenciador se preparó una mezcla en un tubo eppendorf estéril de los seis productos amplificados, los cuales aun cuando presentan el mismo tamaño, son identificados por sus diferentes colores mediante láser. Esta mezcla incluye un marcador fluorescente que sirve como estándar de tamaño (Rox).

Mezcla para cargar el gel de secuenciación:

Reactivo	μL
Formamida	8,0
Buffer de carga	2,0
Marcador Rox	1,1
Producto amplificado	1,5 a 3,0

III.3.1.38 Análisis de Parentesco Genético

Se estimó el parentesco genético (r_{xy}) utilizando marcadores moleculares microsatélites usando la formula modificada de Queller y Goodnight (1989) por medio del programa IDENTIX (disponible en <ftp://162.38.181.25/pub/identix.zip>). En este caso el parentesco es calculado como:

$$r_{xy} = \frac{0.5(S_{ab} + S_{ad} + S_{bc} + S_{bd}) - p_a - p_b}{1 + S_{ab} - p_a - p_b}$$

Donde:

S_{ab} = 1 si el individuo x es homocigoto, 0 si no lo es

S_{ad} = 1 si el alelo del individuo x es igual al del individuos y, 0 si no lo es

S_{bc} = 1 si el individuo y es homocigoto, 0 si no lo es

S_{bd} = 1 si el alelo del individuo y es igual al del individuo x, 0 si no lo

P_a y P_b = frecuencias de los alelos a y b en la muestra.

Finalmente se promedian los términos S_{ap} , S_{ad} , S_{bc} , S_{bd} a través de todos los loci para obtener una estimación multilocus.

El coeficiente de parentesco r_{xy} usando marcadores moleculares entre pares de individuos tiene similar interpretación que el coeficiente de R_{XY} calculado desde una genealogía, es decir, valores cercanos a 0,5 indica que los individuos son hermanos entre sí o son padres e hijos, etc. El algoritmo utilizado no requiere conocimiento a priori del pedigrí de la población, por lo que el resultado de este análisis permite tener una referencia del parentesco entre dos individuos de la población que puede ser comparado con los valores de parentesco genético estimados a partir de una genealogía conocida por el método de Wright (1922).

ESTIMACION DE CONSANGUINIDAD

La estimación de consanguinidad se puede hacer manualmente en pedigríes que involucran pequeñas familias o utilizando programas especialmente diseñados para este fin. Uno de estos programas es PEDIGREE VIEWER Version 5.1 desarrollado por Brian y Sandy Kinghorn y disponible en <http://metz.une.edu.au/~bkinghor>.

III.3.1.39 Formato para Asignación de Paternidad (o maternidad)

En este estudio se utilizó para la asignación de paternidad (y maternidad) la razón de verosimilitud calculada como logaritmo o "LOD score", estimando el estadígrafo Δ como la diferencia entre los valores de LOD score de los dos individuos con mayor probabilidad de ser los padres (Marshall y col. 1998).. Para obtener un criterio de asignación de paternidad para cada valor de Δ , se realiza la simulación de un análisis de inferencia de paternidad utilizando las frecuencias génicas obtenidas desde la población bajo estudio. En este análisis de asignación de paternidad se utilizó el programa CERVUS Versión 2.0 desarrollado por Tristan Marshall (Marshall y col., 1998) disponible en <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen>, junto con los genotipos obtenidos para seis loci microsatélites polimórficos (L105, L109, OSM4, OSM5, OSM6 y OSM7) en cinco familias de aves compuestas por ambos padres y un promedio de cinco a seis hijos cada una (Tabla 2). Este programa computacional ha sido exitosamente utilizado para asignar paternidad en poblaciones naturales de avestruces (Kimwele y Graves, 2003).

Familia	Macho	Hembra	Polluelos				
1	M6	H131	8	51	86	106	120
2	M58	H128	54	97	99	105	275 281
3	M43	H125	94	203	272	298	363

4	M47	H18	87	221	342	352	354
5	M47	H132	48	387	398	411	417

Tabla 2. Códigos de animales y familias analizadas para asignación de paternidad, obtenida desde los registros genealógicos del plantel de avestruces “Aguas Claras”, San Esteban, V Región.

Alternativamente al uso del programa CERVUS se utilizó el programa PROBMAX (Parentage Assignment Program) Versión 1.2 desarrollado por Roy Danzman y disponible en <http://www.uoguelph.ca/~rdanzman/software/PROBMAX/> junto con la documentación respectiva. Este programa estima la probabilidad máxima de asignación de un grupo de progenie a los posibles padres en una población, cuando se conocen los genotipos de los posibles padres y la progenie para marcadores moleculares codominantes (alozimas y microsatélites) y dominantes (RAPD y AFLP, Danzmann, 1997). Ambos programas presentan la misma información de exclusión (CERVUS) o asignación (PROBMAX) de paternidad.

En el análisis de los datos obtenidos del plantel de avestruces el algoritmo usado para corroborar el pedigrí obtenido desde los registros del plantel fue:

- 1) Utilizar los programas CERVUS y PROBMAX para reconstruir el pedigrí de las cinco familias evaluadas para parentesco, sobre la base de seis marcadores microsatélites polimórficos (L105, L109, OSM4, OSM5, OSM6 y OSM7).
- 2) Realizar un análisis de parentesco para inferir los progenitores más probables entre los animales en los que no se pudo asignar paternidad o maternidad.
- 3) Comparar los resultados del análisis de paternidad con los registros de pedigrí que manejaba el plantel de avestruces evaluado.

Nota: El análisis de Consanguinidad no se realizó dado que a partir de los datos genealógicos obtenidos desde el plantel no se observó cruzamientos entre individuos emparentados.

III.3.2 Principales problemas metodológicos enfrentados

Como ya se mencionó la metodología empleada consistió en desarrollar y probar partidores específicos para la determinación del sexo en ratites, además de probar la utilización de marcadores microsatélites para la estimación de paternidad y parentesco en un plantel de avestruces. Sin embargo, el riesgo inherente al desarrollo de estos ensayos se tradujo en que en varias oportunidades se debió introducir modificaciones en los protocolos experimentales. A continuación se enumeran los principales problemas:

- La obtención de DNA a partir de plumas de los polluelos de algunas familias de emú y ñandú no fue exitosa. Las plumas eran de pequeño tamaño y posiblemente además hubo problemas en el muestreo ya que varias de ellas no mostraban suficiente tejido en los cálamos como para obtener una cantidad adecuada de DNA. Esto llevó a no poder identificar el sexo en los polluelos utilizando el marcador DnG9. Cabe destacar que se diseñó, durante la ejecución del proyecto, un sistema de obtención de pequeñas muestras de sangre absorbidas con papel filtro para evitar este problema.
- La construcción de los marcadores SCAR Dn230 y Dn70 para emú, no permitió la identificación del sexo en forma confiable en esta especie, situación que derivó en la construcción de un nuevo marcador.
- No se aplicó la encuesta internacional a productores de ratites (actividad adicional propuesta en el informe N°3) debido a problemas con la base de soporte informático.
- El estudio de parentesco en avestruz con marcadores microsatélites contemplaba inicialmente la utilización de siete *loci* de estos

marcadores. Sin embargo, se eliminó del estudio, el marcador LI014 ya que, a pesar de realizar distintos protocolos de PCR, no se logró obtener fragmentos discretos, es decir individualizar los alelos esperados.

III.3.3 Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto

En general no se efectuaron modificaciones salvo las que se propusieron en la metodología original y que debieron tuvieron dificultades para su correcta aplicación (marcadores en emú) pero que finalmente se lograron implementar.

La única modificación sufrida por el proyecto fue la inclusión de un nuevo objetivo con el fin de responder a los requerimientos de los productores (consanguinidad en avestruces) y de manera de reasignar recursos disponibles en la investigación planteada.

III 4. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas

A continuación se presentan las actividades y tareas más relevantes ejecutadas por el proyecto

- Formación equipo de trabajo del proyecto
- Recolección de antecedentes relacionados con el uso de marcadores polimórficos en Ratites
- Montaje de laboratorio y prueba de equipos
- Adquisición de materiales y reactivos laboratorio

- Contacto y visita a predios partícipes en el proyecto
- Formación de familias en Avestruz
- Formación de familias en Emú
- Toma de muestra de sangre y plumas en Avestruz
- Toma de muestra de sangre y plumas en Emú
- Inicio trabajo de elaboración estudio de mercado para servicios del proyecto
- Inicio de la técnica de extracción y purificación de ADN para las muestras ya tomadas
- Toma de muestras de ñandú
- Medición de la concentración de ADN, para cada una de las muestras y especies (avestruz, emú y ñandú)
- Dilución de las muestras para obtener soluciones de trabajo
- Construcción de pool de ADN por sexo para cada una de las especies
- Inicio del screening de marcadores RAPD polimórficos
- Primera prueba marcadores RAPD para avestruz
- Primera prueba marcadores RAPD para emú
- Primera prueba marcadores RAPD para ñandú
- Apertura de pooles. Examen por separado (cada individuo por especie) de marcadores polimórficos con diferencias entre ambos sexos.
- Obtención de un marcador asociado al sexo en avestruz
- Obtención de dos marcadores asociados al sexo en emú
- Inicio de clonación de marcador polimórfico asociado al sexo en avestruz
- Definición del ámbito del estudio de mercado
- Estudio de costos de técnica de sexaje mediante marcadores moleculares
- Continuación y término del screening de marcadores RAPD polimórficos en las tres especies de ratites
- Segunda prueba de marcadores RAPD para avestruz
- Segunda prueba de marcadores RAPD para emú

- Segunda prueba de marcadores RAPD para ñandú
- Apertura de pooles. Examen por separado (cada individuo por especie) de marcadores RAPD que presentaron diferencias entre los sexos (presencia en hembras).
- Obtención de dos marcadores asociados al sexo en emú
- Obtención de tres marcadores asociados al sexo en ñandú
- Obtención de un marcador asociado al sexo en avestruz: Construcción de un SCAR:

I Clonación de fragmento de DNA polimórfico en un vector de clonación (plásmido).

ii. Secuenciación de los extremos 5' y 3' utilizando los partidores del plásmido.

iii. Diseño y síntesis de partidores (oligonucleótidos) específicos del SCAR

iv. Amplificación con los partidores diseñados del SCAR en muestras de DNA genómico de avestruz y emú

- Inicio de la construcción de un SCAR asociado al sexo en emú
- Constitución de familias de Avestruz y Emú.
- Extracción de DNA de las familias a partir de plumas.
- Ensayo de "genes candidatos" en avestruz , ñandú y emú.
- Aplicación Estudio de Mercado
- Amplificación con los partidores diseñados para el SCAR Dn230 en muestras de DNA genómico de emú. Este finalmente no funcionó.
- Construcción de SCAR Ptp187 en ñandú.
- Construcción de nuevo SCAR Dn70 en emú.
- Amplificación con los partidores diseñados del SCAR Ptp187 en muestras de DNA genómico de ñandú.
- Formación de nuevas familias de emúes.
- Formación de familias de ñandúes.
- Validación de la metodología de toma de muestras en animales juveniles (polluelos) y adultos para las tres especies.

- Evaluación de toma de muestras en polluelos de emú y ñandú.
- Sexaje de familias de avestruz, emú y ñandú.
- Se terminó la construcción de un nuevo marcador SCAR en Emú
- Se evaluó nuevo marcador en emú el cual no mostró polimorfismo asociado al sexo
- Se comenzó el desarrollo de un nuevo marcador SCAR para Emú
- Se validó la técnica de muestreo en terreno (avestruces)
- Se preparó al personal del laboratorio de análisis precomercial
- Se comenzó con la búsqueda de microsatélites en avestruz para determinar parentesco
- Término de la construcción de nuevo marcador SCAR para la identificación del sexo en emú (tercero): evaluación de los partidores confeccionados del SCAR DnG9 en muestras de DNA de machos y hembras de emú.
- Optimización de un protocolo para la amplificación por PCR del SCAR DnG9.
- Verificación de la herencia del marcador DnG9 en familias de emú.
- Optimización de protocolos de PCR utilizando partidores fluorescentes para la obtención de microsatélites en avestruces.
- Identificación de alelos de 6 loci microsatélites en 35 ejemplares de avestruces.
- Determinación del grado de parentesco genético de los ejemplares estudiados.
- Análisis estratégico y plan de marketing de la iniciativa.

A continuación se presentan los impactos obtenidos por el proyecto

- Transferencia de Resultados
 - o Programa de Trabajo Laboratorio Bytech
 - o Evaluación Económica y de costos

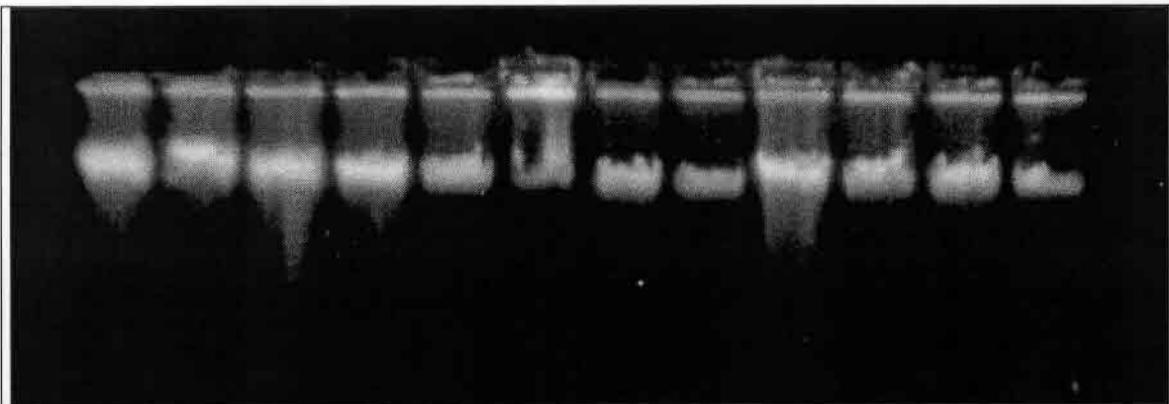
- Información ingresada a banco de datos internacional
- Elaboración de papers científicos (en revisión)
- Tesis de grado
- Publicación en internet (www.elsectoragricola/sexajeratites.cl)

III 5 Resultados del Proyecto.

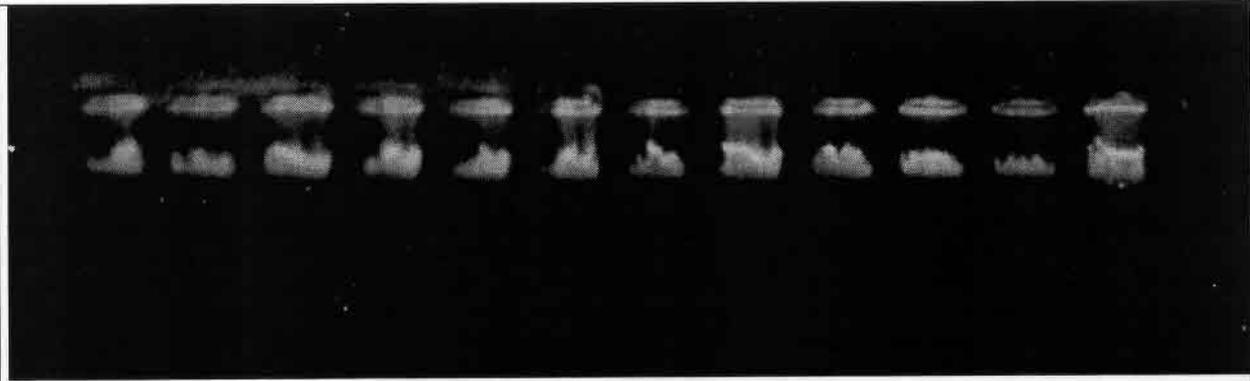
III.5.1 Extracción de DNA de ratites (avestruz, emú y ñandú) con el método fenol-cloroformo

Período de ejecución: 21 – 1 – 02 al 12 – 04 – 05

En la figura 4 se puede observar que se obtuvo DNA de los 12 ejemplares de emú y en la figura 5, de los 12 ejemplares de avestruz. El DNA obtenido es de buena calidad ya que no muestra indicios de degradación, lo cual nos indica que el procedimiento de obtención, almacenamiento y procesamiento de las muestras es adecuado (ver metodología en secciones III.3.1.2 y III.3.1.3). El chequeo se realizó siguiendo el protocolo de la sección III.3.1.4.



VII. **Figura 4.-** DNA genómico obtenido de una muestra de sangre de 12 ejemplares de emú



VIII. **Figura 5.- DNA genómico obtenido de una muestra de sangre de 12 ejemplares de avestruz**

En la **figura 6** se puede observar DNA de 10 ejemplares de ñandú. El DNA obtenido es de buena calidad ya que no muestra indicios de degradación, lo cual nos indica que el procedimiento de obtención, almacenamiento y procesamiento de las muestras es adecuado.

C1 C2 201 202 203 204 205 206 207 208



FIGURA 6: Extracción de DNA con fenol-cloroformo de muestras de sangre de ñandú. C1 y C2 son muestras de DNA de concentración conocida (10 y 6ng/uL, respectivamente). 201-208, muestras de ñandú.

III.5.2 Extracción de DNA de plumas de ratites utilizando resina Chelex

Período de ejecución: 21 – 1 – 02 al 12 – 04 – 05

Se obtuvieron cantidades variables de DNA en todas las muestras probadas de avestruz y emú. Para ilustrar los resultados se muestran algunas extracciones realizadas con plumas de emú de adultos y polluelos. La cantidad de DNA fue mayor en aquellas muestras de plumas "gruesas" y en las que se usó un mayor número de plumas (Figura 7). Estos resultados fueron reproducibles al repetir las extracciones. También se obtuvo cantidades apreciables de DNA de plumas de los polluelos (de 2 plumas "gruesas" o de 4 plumas "delgadas") (Figura 8).

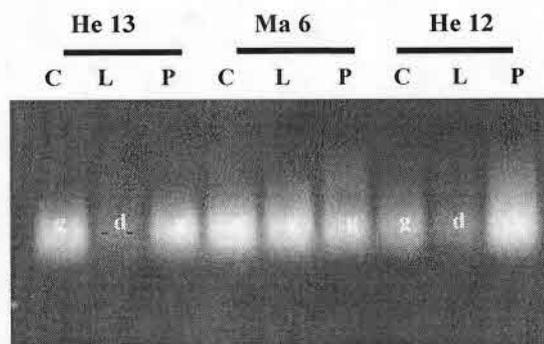


FIGURA 7: Extracción de DNA con chelex de distintos tipos de plumas de emú. He: hembra; Ma: macho; C: cuello; L: lomo; P: pecho; d: pluma "delgada"; g: pluma "gruesa".

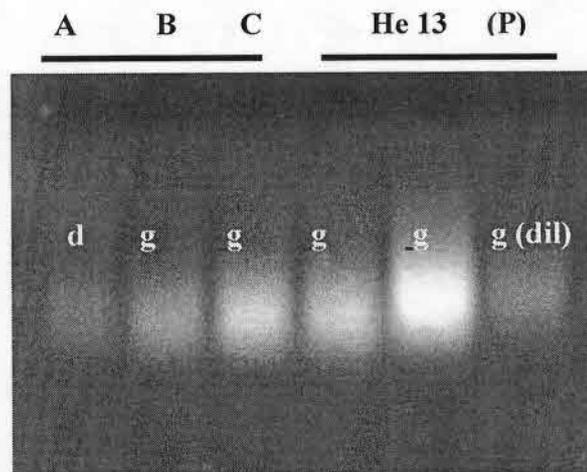


FIGURA 8: Extracción de DNA con chelex de plumas de polluelos de emú. Para determinar la cantidad relativa extraída de los polluelos, se usaron como controles

muestras extraídas de un individuo adulto (He 13). A, B y C: polluelos; He: hembra; P: pecho; d: pluma “delgada”; g: pluma “gruesa”; dil: muestra diluida.

III.5.3 Amplificación por PCR en muestras de DNA extraído con Chelex

Se observó amplificación con los distintos partidores utilizados, tanto en individuos adultos de emú y avestruz (Figura 9), así como en polluelos de emú (Figura 10). Además se obtuvo amplificación tanto en muestras sin diluir como en diluciones, independientemente de la concentración de DNA de las distintas muestras.

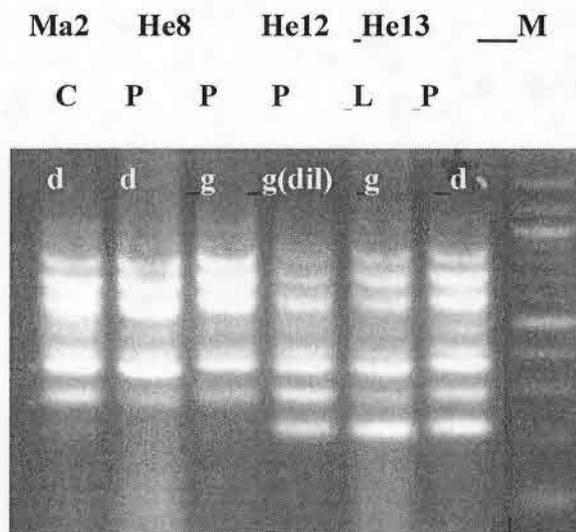


FIGURA 9: RAPD de muestras extraídas con chelex de distintas plumas de emú, partidore UBC-25. He: hembra; Ma: macho; C: cuello; L: lomo; P: pecho; d: pluma “delgada”; g: pluma “gruesa”; dil: muestra diluida; M: marcador de peso molecular de 100pb.

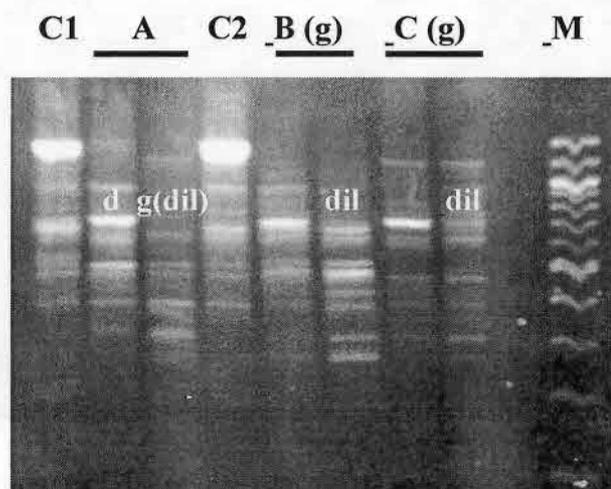


FIGURA 10: RAPD de muestras extraídas con chelex de plumas de polluelos de emú, partidador UBC-70. C1: pool machos (fenol); C2: hembra 9 (fenol); A, B y C: polluelos; d: pluma "delgada"; g: pluma "gruesa"; dil: muestra diluida; M: marcador de peso molecular de 100pb.

III.5.4 Búsqueda de Marcadores RAPDs asociados al sexo en avestruz, emú y ñandú

Período de ejecución: 2 – 5 – 02 al 25 – 01 – 03

Se probaron 300 partidores RAPDs, en emú y avestruz de los cuales en 38 (12,7%) no se obtuvo amplificación. En 34 (11,3%) de ellos en avestruz y 51 (17%) en emú no se obtuvieron patrones electroforéticos claros por lo que fueron repetidos. En ñandú se probaron 149 partidores RAPDs de los cuales 9 (6%) no amplificaron y en 15 (10%) de ellos el patrón electroforético fue poco claro por lo que se repitieron.

Con los restantes se obtuvo buenas amplificaciones y se encontraron siete posibles polimorfismos asociados al sexo, tres en emú (partidores 66, 131 y 167) y cuatro en avestruz (70, 80, 212 y 230).

En emú el partidador 70 presentó consistencia al repetirlo en los pools y al realizar la amplificación en machos y hembras en forma individual. El fragmento polimórfico amplificado con este partidador correspondió a una banda de 750 pb (pares de base) que se encuentra presente en todas las hembras, mientras que está ausente en machos (Figura 11). Otro partidador que presentó consistencia al

repetirlo fue el 230, el cual amplificó una banda polimórfica de aproximadamente 1000 pb y que también está presente sólo en hembras (Figura 12). La probabilidad estadística de que esta asociación sea al azar de ambos partidores es de 4.02×10^{-15} . Los partidores 80 y 212 fueron descartados por no presentar consistencia en su asociación al sexo.

En avestruz se descartaron los partidores 131 y 167. El partidor UBC66 presentó consistencia al repetirlo en los pools y en machos y hembras por separado. El fragmento polimórfico que amplifica este partidor corresponde a una banda de aproximadamente 350 pb, que está presente sólo en hembras y ausente en machos (Figura 13). La probabilidad estadística de que esta asociación entre banda y sexo sea al azar es de 1.2×10^{-27} . Además con este partidor se amplificó muestras de DNA extraídas con Chuelex, las cuales también presentaron el mismo patrón electroforético en machos y hembras (Figura 14)

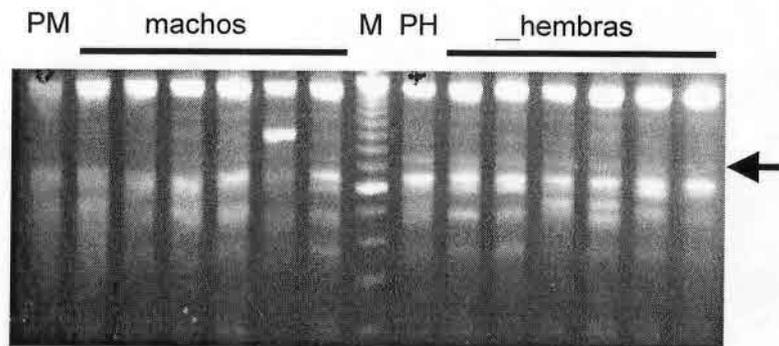


FIGURA 11: RAPD de machos y hembras de emú, partidor UBC-70. La flecha indica el polimorfismo (banda de aproximadamente 750pb) asociado a los ejemplares hembra. PM: pool machos; PH: pool hembras; M: marcador de peso molecular de 100pb.

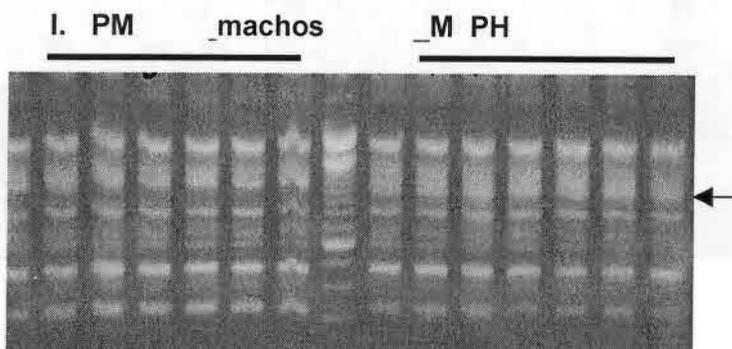


FIGURA 12: RAPD de machos y hembras de emú, partidur UBC-230. La flecha indica el polimorfismo (banda de aproximadamente 1000pb) asociado a los ejemplares hembra. PM: pool machos; PH: pool hembras; M: marcador de peso molecular de 100pb.

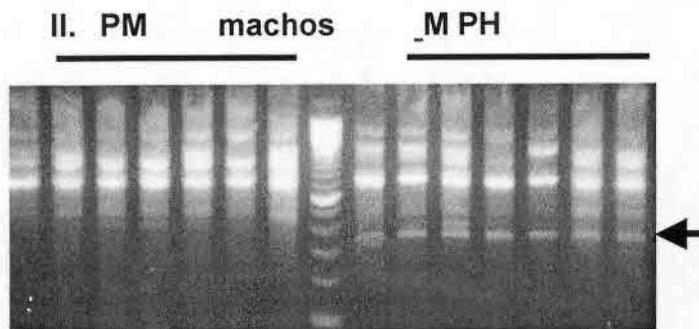


FIGURA 13: RAPD de machos y hembras de avestruz, partidur UBC-66. La flecha indica el polimorfismo (banda de aproximadamente 350pb) asociado a los ejemplares hembra. PM: pool machos; PH: pool hembras; M: marcador de peso molecular de 100pb.

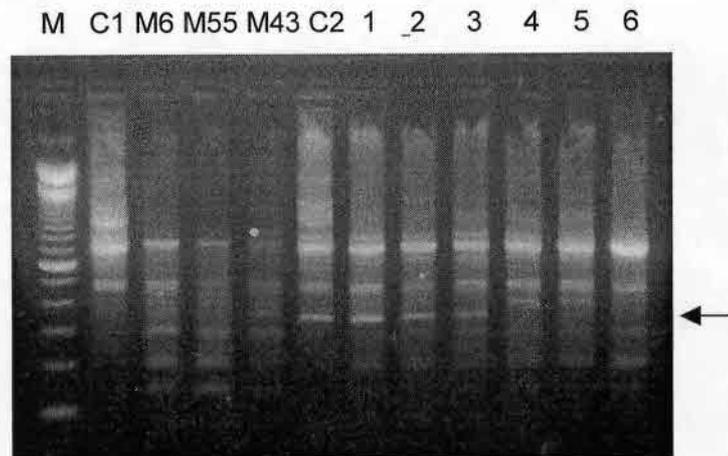


FIGURA 14: RAPD de machos y hembras de avestruz con muestras extraídas con fenol (C1, macho y C2, hembra) y chelex, partidador UBC-66. M6, M55 y M43 corresponden a muestras de machos extraídas recientemente con chelex. Los carriles 1-6 corresponden a muestras extraídas con chelex anteriormente. La flecha indica la banda polimórfica identificada con este partidador, la cual permite distinguir el sexo de los ejemplares 1 al seis. M: marcador de peso molecular de 100pb.

III.5.5 Obtención de los marcadores SCAR SC66 de avestruz y Dn230 de emú

Período de ejecución: 04 – 07 – 02 al 25 – 09 – 02

PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS

El resultado de esta purificación fue chequeado en un gel de agarosa al 1% donde se observó el fragmento del tamaño esperado para cada uno de los marcadores RAPDs.

CLONACIÓN (LIGACIÓN, TRANSFORMACION, CRECIMIENTO DE CLONES, DIGESTION DEL PLASMIDO):

En general los distintos pasos para la clonación de los fragmentos DNA de interés en emú y avestruz se llevaron a cabo sin dificultades y en forma exitosa. La transformación de las células dio como resultado el crecimiento de colonias de bacterias transformadas, que se identifican por su color blanco. Una vez sometido el fragmento a la acción de las enzimas de restricción se verificó en gel de agarosa si la digestión fue exitosa y en ambas especies no hubo problemas en este paso.

Los resultados de la clonación en avestruz pueden verse en la FIGURA 15. Los clones aislados tienen un fragmento del tamaño esperado (aproximadamente 350pb) lo que corresponde a la banda inferior del gel.

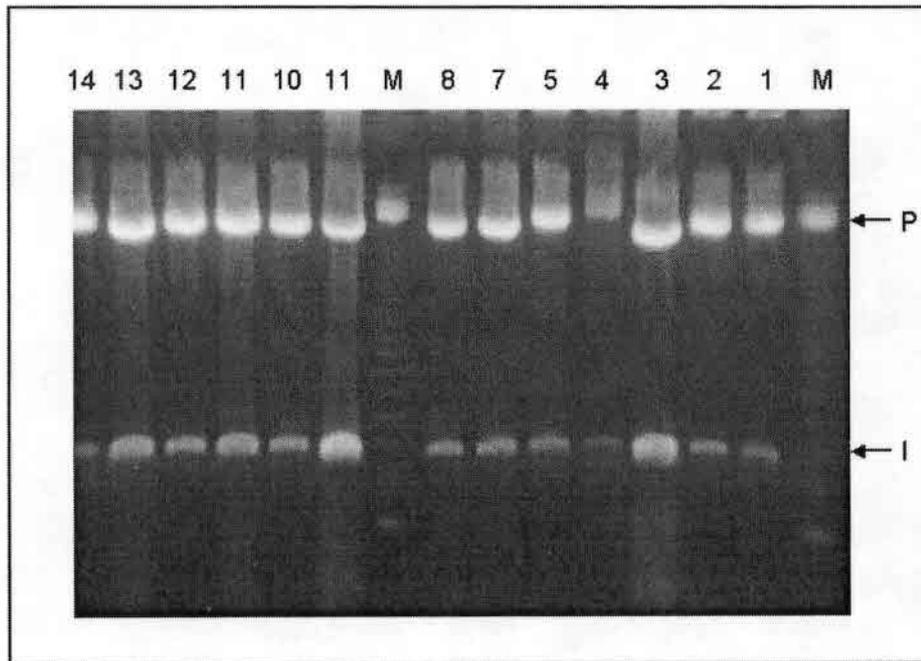


FIGURA 15: Digestión de los productos de miniprep con la enzima EcoRI en los 13 clones obtenidos. La banda señalada como P corresponde al plásmido linealizado. La banda inferior rotulada como I corresponde al fragmento clonado. Los carriles numerados son los 13 clones obtenidos. M: marcador de peso molecular de 123pb.

AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO INSERTADO

Se realizó otro experimento para corroborar la presencia del fragmento deseado en los clones obtenidos. Para esto se amplificó un fragmento del plásmido que incluye el inserto usando partidores internos del plásmido. Los partidores (β GalF y R) forman parte del kit de clonamiento TOPO TA. Como resultado se obtuvo en todos los clones una banda que corresponde al fragmento insertado más un segmento del plásmido. Como resultado se obtuvo en todos los clones una banda que corresponde al fragmento insertado más un segmento del plásmido, totalizando un tamaño de

aproximadamente 500pb para avestruz y 1100 pb para emú. En la **Figura 16** se muestra el resultado de esta etapa en avestruz.

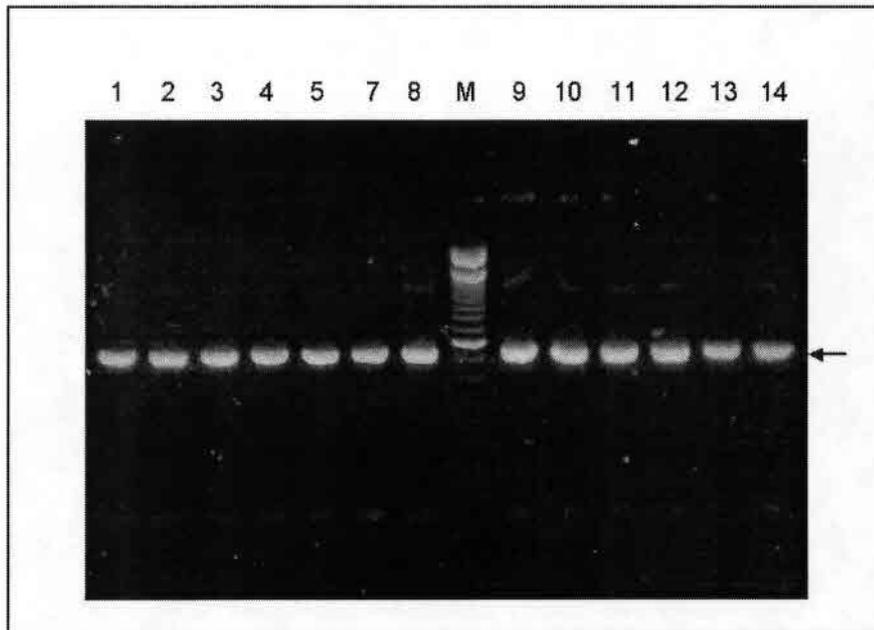


FIGURA 16: Amplificación de parte del plásmido más el inserto usando los partidores β GalF y β Gal R en los 13 clones obtenidos. La banda indicada por la flecha corresponde al fragmento esperado de aproximadamente 500pb. M: marcador de peso molecular de 100pb.

SECUENCIACION:

Las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

Fragmento Sc66 de avestruz (342 bases):

gagggcgtgagagagtgtgcac gaaccctaactgtg gttgaattcatggac gacttgggcacgcat gctgcata
ctcccgcactctctcacacgtgcttgggattgacaccaacttaagtacctgctgaacccgtgcgtacgacgtat 75

tgtcctaagttctcacaataat aacattccaagaac ctaaccagatgtgg agttaatggaatttc cccttcct
acaggat tcaagagtgttatta ttgtaagggttcttg gattgggtctacacc tcaattacctaag gggagga 150

cccctcatgactcctcgtcctg ctgcatccccatgca tccaccatccaggaa aagatccacgacatt gtcctcta
ggggagtactgaggagcaggac gacggt agggtaacg taggtggtaggtcct tttctaggtgctgta acaggagat 225

aaaaaacccagttctgactca cagggagtagctcct cgcctgactgcagcc agaattgtcacttct tcttttt
tttttgggtcaagacgtgagt gtcctcatcgagga gcgctactgacgtcgg tcttaacagtgaaga aagaaaa 300

ttaatttatgttttctctaa tttcttagcatcacg ccctc
aattaaatacaaaaaggagatt aaagaatcgtagtgc gggag 342

Fragmento Dn230 de emú (975 bases):

cgctgcc catctacaggggaga gaaagcatactttt ctgaagcatacagct gaataaagcatatat gctggaga
gcagcgggtagatgtccctct ctttcgtatgaaaa gacttcgtatgtcg acttatttcgtatat acgacctct 75

attggccctgtgtgtcagtag cactcagaatccgt ctgtgagacaagaaa tctcacaggcagctt gtattttg
taaccgggacacacagtcac ggtgagcttaggca gacactctgttcttt agagtgtccgtcgaa cataaaac 150

ttctcagaaactgaaccatct cagtggtaaacctg ctgtcttgctattg tcaatgtaaacaga gacaaggg
aagagtc tttgaacttggtaga gtcaccattttggac gacagaaccgataac agttacattttgtct ctgttccc 225

tgtgtctgtgagcttatgcc agtgaaccgagcgc tcacttcagacagg catatgcagaaaact ttgtctta
acgacgacgactcgaatacggg tcacattggctcgcg agtagaagtctgtcc gtatacgtcttttga aacagaat 300

tcctgggttttctgtgttgg aatgactcgttatc tttctgaaggaact gactgtttaacaaat gagttgct
aggaccaaaaagaacacaacca ttaactgagcgaatag aaaagacttccttga ctgacaaattgttta ctcaacga 375

aaaggca tctcactttcataat cgtaagtgttatta gaatccttcgaaaa cttaagtgaattaca agaagctg
tttccgt agagtgaagtatta gcattcacgaataat cttaggaagccttt gaattcacttaatgt tcttcgac 450

aattgctactcttatttgaag ccaactgggatttt tgggtgtaaagtcca gcgtgtgggatttga tggctat
ttaacga tgagaataaacattc ggttgaccctaaaa accaccatttcaagt cgcacaccctaaact accagata 525

gtccagg tcttagttctgtct agaaacaggcagtc agataaggctaaagg cagtaccactgaaaa accctctt
caggctcaggatcaaggacaga tctttgtccgtcacg tctattccgatttcc gtcattggtgactttt tgggagaa 600

tgatccc tctgttcaccttga tccctctttctttg gtgtgtcttgagca agattgtcaacttcc ttaggtga
actagggagaacaagtgaact agggagaagaaaac cacacagaacctgt tctaacagtgaagg aatccact 675

aagggtgaagacctgaataagca aggaaacaaactac tcttctgtctgtagc tgtttccagatgag ggctgctc
ttccact tctggacttattcgt tcttttgtttgatg agaagacagacatcg acaaaaggctactc cgcgacgag 750

catgttaacaaggcaacatggg cgttttgtggtt tagcaagggtccagtaaa tgagccttttagtgca aaatggac
gtacaat tgttccgttgatccc gcaaacaccaaact gttccacggctattt actcggaaatcacgt tttacctg 825

ttaaatttacaacacatttcta aaatttgtgcttct tagcagagaacttgg tgttgactcccaggaaattgcta
aatttaaattgtgtgtaaagat ttaaacacgaacga atcgtctcttgaacc acaactgagggctct ttaacgat 900

acccaag tgcctgagaaact gtgaagaatgtcagt gtaggagctgatca ggcaaatacttacat gggcgacg
tgggttcacggactctttatga cacttcttacagca catccctcgactagt ccgtttatgaatgta cccgctgc 975

DISEÑO Y SÍNTESIS DE PARTIDORES (OLIGONUCLÉOTIDOS) DE LOS SCARs Sc66 Y Dn230.

Una vez analizadas las secuencias y con ayuda del programa Primer3, se diseñaron los siguientes partidores específicos:

Avestruz: Sc66 F: 5'-GAGGGCGTGATGCTAAGAAA
Sc66 R:5'-CGTGAGAGAGTGTGCACGAA

Emú: Dn230 F: 5'-CGTCGCCCATCTACAGGGGA
Dn230 R: 5'-CGTCGCCCATGTAAGTATTTC

Una vez diseñados los partidores, éstos se enviaron a sintetizar.

AMPLIFICACIÓN CON LOS PARTIDORES DISEÑADOS DEL SCAR EN MUESTRAS DE DNA GENÓMICO DE AVESTRUZ.

Se utilizó DNA genómico de seis machos y seis hembras. Se obtuvo una banda de aproximadamente 350pb en todas las hembras y que está ausente en los machos (Figura 17).

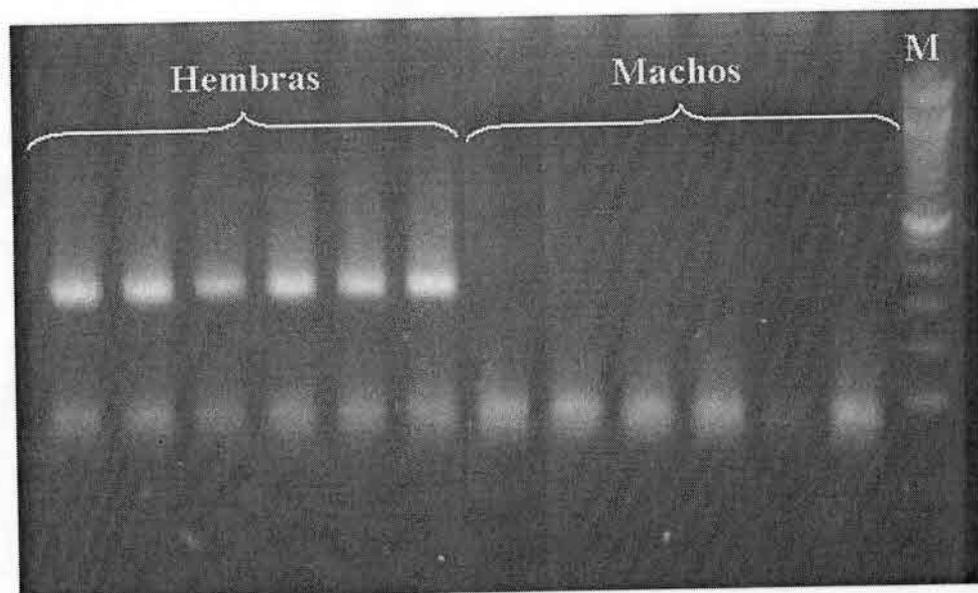


Figura 17.- Amplificación de DNA extraído con fenol de seis machos y seis hembras de avestruz con los partidores Sc66. Se observa una banda de aproximadamente 350pb en todas las hembras. M: marcador de peso molecular.

III.5.6 Constitución de familias de ratites (avestruz, emú y ñandú)

Período de ejecución: 17 – 1 – 02 al 25 – 04 – 03

En una primera etapa se constituyeron las siguientes familias emú y avestruz, de las cuales se recibieron muestras de plumas:

FAMILIAS DE EMÚ:

PADRES	HIJOS
Macho: 013650B8	408
Hembra: 013BAA43	411
Macho: 0121F6B8	413- 414

Hembra: 0136866C 409- 412

Macho: 01292F84 6157EC1

Hembra: 0133D75D

Macho: 05FE4ACF 418

Hembra: 05FE5571 403

FAMILIAS DE AVESTRUZ

PADRES

HIJOS

Macho: U

U02AB07-U02AB014

Hembra: AB

U02AB015

Macho: X

X02AE035-X02AE044

Hembra: AE

X02AE045

Macho: Q

Q02H029- Q02H033

Hembra: H

Q02H034

En esta sección se especifican también las familias de emú y ñandú que se formaron en una etapa posterior (ver secciones III.3.1.21 y III.3.1.22).

FAMILIA DE EMÚ:

PADRES

HIJOS

FAMILIA 1:

Macho: 3

D - E - F - G - H - J - K

Hembra: 4

FAMILIA 2:

Macho: A

1-2-3-4-5-6-7-8-9

Hembra: AA

FAMILIA 3:

Macho: B

10-11-12-13-14-15

Hembra: BB

FAMILIAS DE ÑANDÚ:

PADRES

HIJOS

FAMILIA 1:

Macho: 1 (3)

3 (45-2, 34-2, 38-2)

Hembras candidatas: 3 (G, O, 16)

FAMILIA 2:

Macho: 1 (28-9)

3 (31, 28, 26-2)

Hembras candidatas: 2 (10,4)

FAMILIA 3:

Macho: 1 (26-9)

3 (32-2, 3-2, 17)

Hembras candidatas: 2 (F, 23-9)

IX.

III.5.7 Amplificación de EE0.6 en ratites y secuenciación del fragmento en emú

Período de ejecución: 30 – 12 – 02 al 10 – 06 – 04

En todas las especies se obtuvo amplificación del fragmento EE0.6 en ambos sexos, no observándose diferencias de tamaño en los fragmentos amplificados

entre machos y hembras. Para establecer la posible existencia de polimorfismos en este fragmento se estudió las secuencias de fragmentos amplificados de alrededor de 433 pb en machos y hembras de emú. El análisis y comparación de estas secuencias indicó una gran similitud entre machos y hembras. Solamente se encontró diferencias en una base nitrogenada en el nucleótido 220, entre los sexos (los machos presentaron una adenina y las hembras, guanina).

Secuencia EE0.6 macho:

```

agagtcattgtggccttgaacaaatggaaatgcccttcttctggtatccgtcttgattcaaggagggtaccta
tctcagtaacaccggaactgtttaaacctttacgggaagaagaccataggcagaactaagttcctcccatggat 75

ccagttatgctcctatgactaccacctttcctttttgttacatgcctctgatgccaataacnaaaacaatacaga
ggtcaatacaggatactgatgggtggaaggaaaaacaatgtacggagactacggttattgnttttgttatgtct 150

atacaaggcagaagcactcacattaatattagagcagctgaattcaactcaatgtctcagtgcattgtgcAtttt
tatgttccgtcttcgtgagtgtaattataatctcgtcgacttaagttgagttacagagtcacgtacacgTaaaa 225

ttcctggatatttctgtacatccatcctggatgggacagactttttcattgacaatttgctgtctccacaggg
aaggacctataaaggacatgtaggtaggacctaccctgtctgaaaaagtaactgttaaacagacagaggtgtccc 300

aagatatattcaagcaaggaactaaatcaacctcaacaacaacaatgctttggaataatttcaagtgtttacc
ttctatataagttcgttccttgatttagttggagttgtgtgttttacgaaacctatttaaagttcacaaaatgg 375

aagtaaattgaatagttcctaaatgaaactaatccaaaggagcattggcttgattcaa
ttcatttaacttatcaaggatttactttgattagtttctcgtaacccaactaagtt 433

```

Si bien se detectó esta diferencia entre los sexos hemos descartado continuar con su estudio debido a que se deben realizar varios ensayos más para corroborar este hallazgo, estudios que son lentos y caros. La gran similitud observada entre las secuencias de machos y hembras no es sorprendente debido a la gran similitud genética entre los cromosomas sexuales de las ratites.

Debido a que hemos obtenidos resultados bastante positivos utilizando la metodología de RAPD, hemos decidido no continuar con esta estrategia de "genes candidatos" en el presente proyecto.

III.5.8 Amplificación con los partidores SCAR Dn230 de emú

Período de ejecución: 27 – 5 – 04 al 10 – 06 – 04

De los dos protocolos probados sólo se obtuvo amplificación con el programa touch down en todos los individuos, tanto machos como hembras. Fragmentos amplificados en los machos fueron secuenciados para comparación con las hembras. No se detectó ningún sitio polimórfico para endonucleasas de restricción al comparar las secuencias obtenidas de machos y de hembras. Con el PCR convencional no se logró amplificación a pesar de que se modificaron las condiciones de la reacción. Específicamente se disminuyó la temperatura de alineamiento hasta 60°C, temperatura muy inferior con respecto a la óptima de los partidores (72°C), pero en ningún caso se obtuvo amplificación. Debido a estos resultados se decidió descartar este marcador y utilizar la banda RAPD polimórfica encontrada con el partidor UBC70 para construir un nuevo SCAR para esta especie.

III.5.9 Construcción del nuevo SCAR Dn70 a partir del fragmento encontrado con el partidor UBC70 en emú

Período de ejecución: 06 – 06 – 02 al 27 – 05 – 04

PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO

La purificación del fragmento fue chequeada en un gel de agarosa al 1% donde se observó un solo fragmento del tamaño esperado para el marcador polimórfico RAPD (aproximadamente 750pb).

CLONACIÓN (LIGACIÓN, TRANSFORMACION, CRECIMIENTO DE CLONES, DIGESTION DEL PLASMIDO):

La transformación de las células dio como resultado el crecimiento de colonias de bacterias transformadas, que se identifican por su color blanco. El DNA plasmidial fue digerido con la enzima de restricción ECORI y se verificó en un gel de agarosa si la digestión fue exitosa.

AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO INSERTADO

Como resultado se obtuvo en todos los clones una banda que corresponde al fragmento insertado más un segmento del plásmido, totalizando un tamaño de aproximadamente 800pb.

SECUENCIACION

Se envió a secuenciar el DNA plasmidial de uno de los clones con los partidores del kit. Al analizar y comparar las secuencias entre sí, se descubrió que en los extremos de cada secuencia las lecturas del secuenciador no fueron de buena calidad. Esto impidió definir apropiadamente la región de la secuencia donde se debe diseñar el partidor SCAR, por lo menos en un extremo. Debido a esto fue necesario diseñar un partidor interno para secuenciar nuevamente la región con la lectura ambigua (E70F: 5'-TATTGGCGCTGTTGCTTTAC-3'). Este partidor produjo un fragmento de 318pb y otros fragmentos inespecíficos. Debido a esto se extrajo el fragmento de 318pb desde un gel y se purificó. Sin embargo, se observó cierta cantidad de producto inespecífico por lo que fue necesario reamplificar el fragmento de interés. Finalmente se envió a secuenciar el fragmento reamplificado el cual se comparó con la secuencia obtenida anteriormente y permitió descifrar las lecturas faltantes. Finalmente se editó la secuencia:

Fragmento Dn70 de emú (750 bases):

gggcacgcgagggaaaattgcagctagcagcacatcgc agtatcagtgtcatt cagtgcggcagcttt gcgaacag
cccgtgcgctccttttaacgtc gatcgtcgt gtagcgtcatagtcacagtaa gtcacgcccgcgaaa cgcttgtc 75

agtgtcagctcacatcccctt taatgcaccactcag ccagcgtgccaagt tggccaccatcccct ccaccctc
tcacgagtcgagtgtagggaaa attacgtggtgagtc ggtcgcgacggttca accggtgtagggga ggtgggag 150

ccaatcccgcagagaataacc agggggaagagtcca atgttaattatttaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaag
ggttagggacgtccttattgg tcccccttctcaggt tacaattaataaatt tttttttttttttt tttttttc 151

cgcaaacagctaagtgttacag gaccaaactgactct gtaatgtatttgag ctgtaggcaaacatg acaaacctg
ggtttgtcgattcacaatgtc ctggtttgactgag acattacataaacctc gacatccgtttgtac tgtttgac 300

gggtctcgcgctttacggaag tgtgtcccacaaggg aaccgccaagatcaa agatggggctcttg gacatccc
cccgagacgccgaaatgccttc acacaggggttccc ttggcggttctagtt tctaccccgagaacc ctgtaggg 375

agggtcgggtgctaagagcctg caggtgacagagccc tgagggcaccagctg accagtgccagggg gctgcaac
tcccagaccagattctcggac gtcactgtctcggg actcccgtggtcgac tggtcacgggtccca cgacgttg 450

cagtccccctcacccaagctcc ggcttggggagcctc acgcacgagacagca caagaggagaaagag gctttatt
gtcagggggagtggttcgagg ccgaacccctcggag tgcgtgctctgtcgt gttctctctttctc cgaaataa 525

ggcgtgttgctttacatttg ttttctactctgca aaagcacatccctgc agagctggatcagct gagctcct
ccgcgacaacgaaatgtaaac aaaaagtgagacgct tttctgtgtagggacg tctcgacctagtcga ctcgagga 600

caatgtcacaggtgtgaagccc agctgtgcctttgcc tccagatcgccatc tgtgacctgtgtga tttgtgct
gttacagtgtccacacttcggg tcgacacggaaacgg aggtctagcgggtag acactgggacacact aaacacga 675

tctgtgatttaataacaagcaca ttacgttctcagtc gtagtttgggggtc ccctacaaagccatc gcgtgccc
agacactaaattatgttcgtgt aatgcaagagtcagt cctacaaacccaag gggatgtttcggtagcgcacggg 750

DISEÑO Y SÍNTESIS DE PARTIDORES (OLIGONUCLÉOTIDOS) DEL SCAR Dn70

Se diseñaron los siguientes partidores con el programa Primer3 y fueron enviados a sintetizar:

Dn70 F: 5'-GGGCACGCGAGGAAAATTGCA-3'

Dn70 R: 5'-GGGCACGCGATGGCTTTGTA-3'

III.5.10 Construcción de SCAR Ptp187 a partir del fragmento encontrado con el partidor UBC187 en ñandú

Período de ejecución: 29 – 8 – 02 al 2 – 09 – 03

PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO

La purificación del fragmento fue chequeada en un gel de agarosa al 1% donde se observó un solo fragmento del tamaño esperado para el marcador polimórfico RAPD (aproximadamente 800pb).

CLONACIÓN (LIGACIÓN, TRANSFORMACION, CRECIMIENTO DE CLONES, DIGESTION DEL PLASMIDO):

La transformación de las células dio como resultado el crecimiento de colonias de bacterias transformadas, que se identifican por su color blanco. El fragmento fue digerido con la enzima de restricción ECORI y se verificó en un gel de agarosa si la digestión fue exitosa.

AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO INSERTADO

Como resultado se obtuvo en todos los clones una banda que corresponde al fragmento insertado más un segmento del plásmido, totalizando un tamaño de aproximadamente 850pb.

SECUENCIACION

Se envió a secuenciar el DNA plasmidial de uno de los clones con los partidores del kit. Al analizar y comparar las secuencias entre sí, se descubrió que en los extremos de cada secuencia las lecturas del secuenciador no fueron de buena calidad. Esto impidió definir

apropiadamente la región de la secuencia donde se debe diseñar el partidador SCAR, por lo menos en un extremo. Debido a esto, fue necesario diseñar un partidador interno para secuenciar nuevamente la región con la lectura ambigua (Ñ187C1 F: 5'-CAGGTTTGCTACATCCATA-3'). El partidador produjo un fragmento de 278pb que se comparó con la secuencia obtenida anteriormente y permitió descifrar las lecturas faltantes. Finalmente se editó la secuencia:

Fragmento Ptp187 de ñandú (789 bases):

```
aacgggggagggaggaatccccatgnnnnnnnntct gaaggagaagggaaa ttgaagcaagtaatc atttctgt
ttgccccctcctccttaaaag gtacnnnnnnnaga cttcctcttcccttt aacttcgttcattag taaagaca 75

tacagtgtcaagcattttatac cttgttaatgtatgt ggttacaagtttaa gtttcttttaatttc ctgaaggt
atgtcacagtttcgtaaatatg gaacaattacataaa ccaatgttcaaattt caaagaaaattaaag gacttcca 150

caacttttgttctaatttgga tagaataaaaaattg tcatctactttttgc atatcagaaatcctg ttttctgg
gttgaaaacaagat taaacctt atctttattttaac agtagatgaaaaacg tatagtctttaggac aaaagacc 225

ctatctcttgaacaataacaa atactgcactggaag gcatcaggctgaatt ttacaagagaggta tttttca
gatagagaacattgttattgtt tatgacgtgaccttc cgtagtcgacttaa aatgtttctctccat aaaaaagt 300

ttcagatagctgggtttgtctt gctgttaataat ttttctgtgttggtggag aagcatactccctct aaagcttt
aagtcta tcgacccaaacagaa cgacaattattaaaa agacacaaccacctc ttcgatgagggaga tttcgaaa 375

gtcaatgggcagttgttaggttt ggtttattgtcccat tccagctgtggtgat caagtacagggtgt ccaacag
cagttaccgtcaacatccaaa ccaataacagggtta aggtcgacaccacta gttcatgtcccgcac aggttgtcc 450

tacccttgacagccctgatta catgatttgcatacc ttattatccctttcc ctatttcttgacctt ccctttct
atgggaacctgtcgggactaatgtactaaacgtatggaataatagggaaggataaagaactggaagggaaaga 525

ctgtccaatccccctcccaata aactgcccttaatta ctttttcttattgg tcccagggttgctac atccatac
gacaggt taggggaggggttat ttgacggggattaat gtaaagagataacc aggggtccaaacgatg taggtatg 600

ccaaatttggtatttctgatac tggcccttaggact cttggccttagatta tgttattatgagatg ctattact
ggtttaaacataaagactat gaccagggatccgtg agaaccggaatctaa tacaataactctta cgataatga 675

gatatggttaccaggcactgc tggctttgcaatgtt cactccttagaagg tccccagtgtccat gtcaggtg
ctataccaatgggtccgtgacg accgaaacgttaciaa ggtgagggatcttcc aggggtcacagggtta cagtcac 750

tctgtgaagtttggtcatgtct cacatagctccccg tt
agacactcaaacca gtacagagtgtatcgagggggcaa 789
```

DISEÑO Y SÍNTESIS DE PARTIDORES (OLIGONUCLÉOTIDOS) DEL SCAR Ptp187..

Una vez analizada la secuencia y con ayuda del programa Primer3, se diseñaron los siguientes partidores específicos:

Ptp187 F: 5'-AACGGGGGAGGAGGAATTTTC-3'

Ptp187 R: 5'-AACGGGGGAGCTATGTGAGACATG-3'

AMPLIFICACIÓN CON LOS PARTIDORES DISEÑADOS DEL SCAR Ptp187 EN MUESTRAS DE DNA GENÓMICO DE ÑANDÚ.

Se utilizó DNA genómico de seis machos y seis hembras. Se obtuvo una banda de aproximadamente 800pb en todas las hembras y que está ausente en los machos (Figura 18).

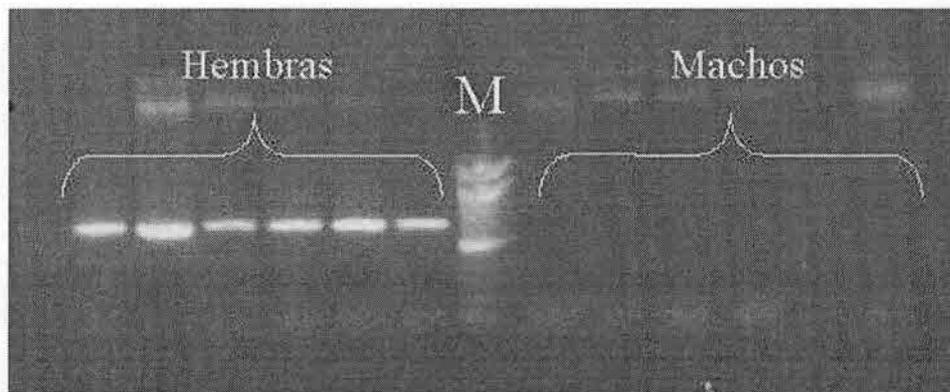


Figura 18: Amplificación de muestras de DNA extraídas con fenol utilizando el marcador SCAR Ptp187. M: marcador de peso molecular.

III.5.11 Validación de métodos de toma de muestras en juveniles (polluelos) y adultos de ratites

Período de ejecución: 15 – 12 – 03 al 16 – 01 – 04

Fue posible extraer DNA de muestras de sangre embebida en papel filtro y de plumas de adultos y de polluelos de emú y de ñandú con los cuatro protocolos utilizados, descritos en la sección III.3.1.23. Sin embargo, el Protocolo 2 presenta ventajas porque es sencillo, se tienen resultados en menor tiempo y muestra una mejor repetibilidad para amplificar por PCR. Con el objeto de evaluar los resultados de la calidad del DNA extraído de plumas de ñandú utilizando tres protocolos diferentes, se realizó una reacción de amplificación mediante RAPD-PCR para lo cual se utilizó el partidor UBC230. Se usó esta técnica, en vez del SCAR Ptp87 desarrollado para esta especie, porque el RAPD es muy sensible a la calidad del DNA que se utiliza. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 19.

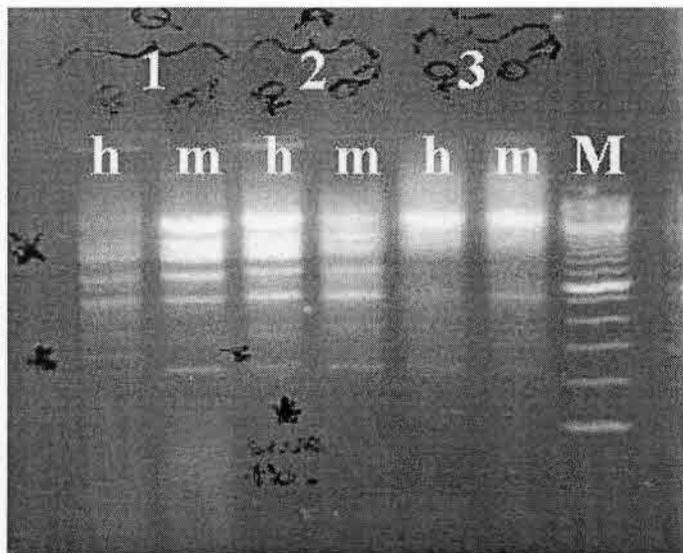


Figura 19: Amplificación con el partidor UBC230 de muestras de DNA extraídas de plumas de ñandú (h: hembra; m: macho). Los números corresponden a los distintos métodos descritos en el texto (sección III.3.1.23). M: marcador de peso molecular.

III.5.12 Verificación de la herencia de marcadores y sexaje de familias de avestruz, emú y ñandú

Período de ejecución: 30 – 12 – 02 al 10 – 06 – 04

A continuación se resumen los resultados del sexaje en las tres especies.

AVESTRUZ				
Individuo	PARENTESCO	TEJIDO MUESTRA	MARCADOR	GENOTIPO
Familia 1				
AB	MADRE	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
U	PADRE	PLUMA	SCP66 (PCR)	MACHO
U07	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
U14	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
U15	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
Familia 2				
AE	MADRE	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
X	PADRE	PLUMA	SCP66 (PCR)	MACHO
X35	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
X44	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
X45	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
Familia 3				
H	MADRE	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
Q	PADRE	PLUMA	SCP66 (PCR)	MACHO
Q29	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	HEMBRA
Q33	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	MACHO
Q34	HIJO	PLUMA	SCP66 (PCR)	MACHO

EMU				
Individuo	PARENTESCO	TEJIDO MUESTRA	MARCADOR	GENOTIPO
Familia 1				
3	PADRE	PLUMA	UBC230 (RAPD)	MACHO
4	MADRE	PLUMA	UBC230 (RAPD)	NO
D	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	MACHO
E	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	NO

F	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	MACHO
G	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	NO
H	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	NO
J	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
K	HIJO	PLUMA	UBC230 (RAPD)	NO

Familia 2

A	PADRE	PLUMA	UBC230 (RAPD)	MACHO
AA	MADRE	PLUMA	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
1	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
2	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
3	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
4	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
5	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
6	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
7	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
8	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
9	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA

Familia 3

B	PADRE	PLUMA	UBC230 (RAPD)	MACHO
BB	MADRE	PLUMA	UBC230 (RAPD)	NO
10	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
11	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
12	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
13	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	MACHO
14	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA
15	HIJO	SANGRE	UBC230 (RAPD)	HEMBRA

NANDU

Individuo	PARENTESCO	TEJIDO MUESTRA	MARCADOR	GENOTIPO
Familia 1				
3	PADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	MACHO
G	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
O	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
16	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
45-2	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
34-2	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
38-2	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	MACHO

Familia 2				
28-9	PADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	MACHO
10	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
4	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
31	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
28	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
26-2	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	MACHO
Familia 3				
26-9	PADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	MACHO
F	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
23-9	MADRE	PLUMA	Ptp187 (PCR)	NO
32-2	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	HEMBRA
3-2	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	MACHO
17	HIJO	SANGRE	Ptp187 (PCR)	MACHO

En la columna GENOTIPO, NO, significa que hubo dificultades en la extracción de DNA o en la amplificación del marcador en esos individuos.

III.5.13 Amplificación de siete *loci* microsatélites en avestruz

Período de ejecución: 26 – 5 – 03 al 15 – 08 – 03

Se obtuvo amplificación de los siete microsatélites (Figuras 20 y 21). Para todas estas pruebas se utilizaron 2 machos y 2 hembras de animales adultos. Para poder observar diferencias entre los fragmentos todas los productos de PCR se separaron en geles al 1,8%.

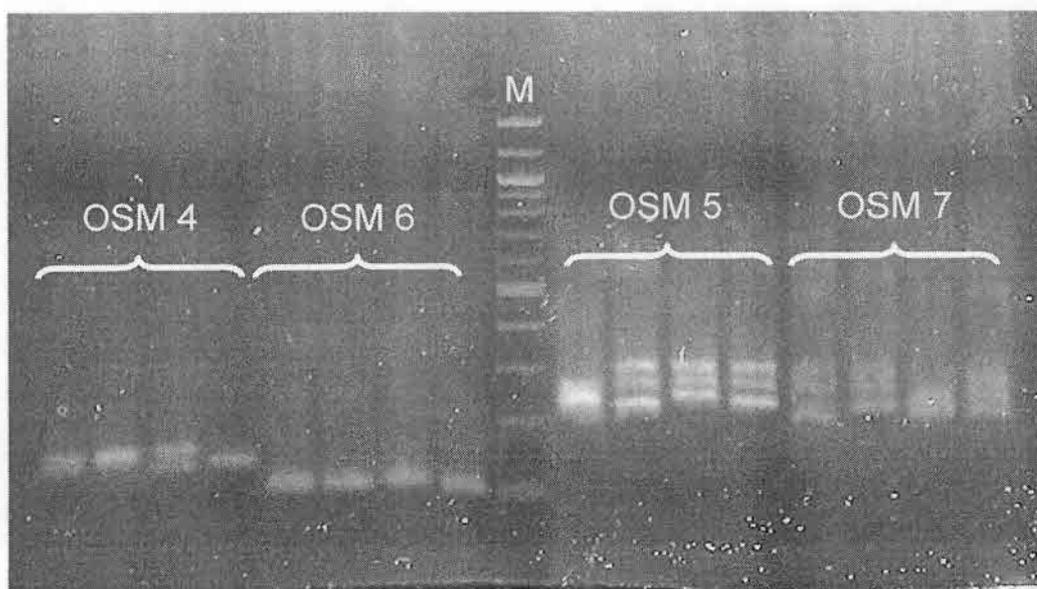
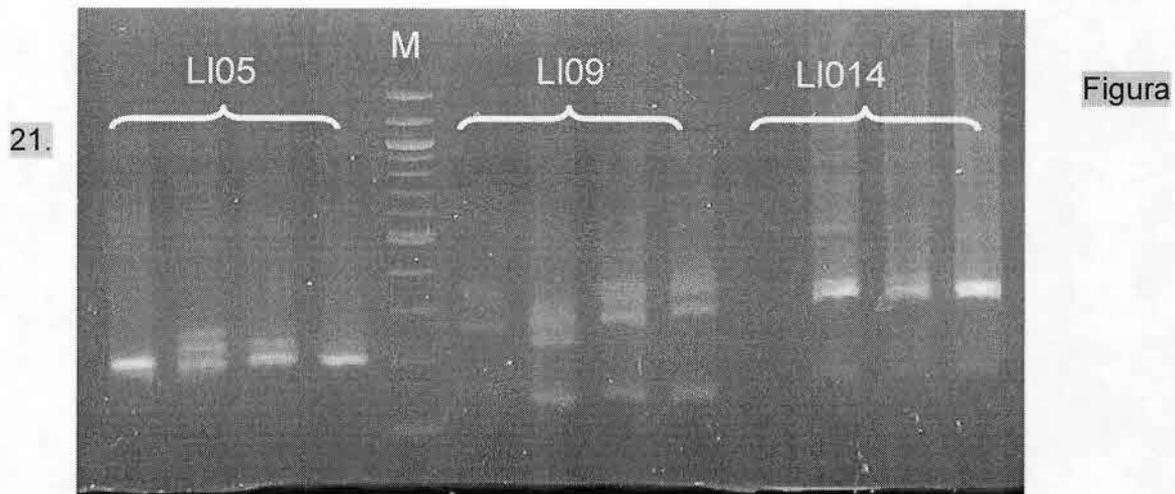


Fig
ura
20.
Am
plifi
cac
ión
de

microsatélites OSM4, OSM5, OSM6 y OSM7 en avestruz. En cada caso se amplificaron 2 machos y 2 hembras (cargados de izquierda a derecha). M: marcador de peso molecular de 100pb.



Amplificación de microsatélites LI05, LI09 y LI014 en avestruz. En cada caso se amplificaron 2 machos y 2 hembras (cargados de izquierda a derecha). M: marcador de peso molecular de 100pb.

En todos los casos se observó variación entre individuos. Las amplificaciones de algunos de estos microsatélites deberán ser optimizadas para eliminar bandas inespecíficas. Con excepción del microsatélite LI09, todos los fragmentos observados están dentro de los rangos de tamaño esperados.

III.5.14 Amplificación del microsatélite OSM5 en muestras de DNA extraídas con fenol-cloroformo y chelex

Período de ejecución: 26 – 5 – 03 al 15 – 08 – 03

Se observó amplificación de bandas del tamaño esperado en todas las muestras (Figura 22). En las muestras extraídas con fenol se observó exceso de DNA, mientras que las extraídas con chelex amplificaron más débilmente. Estos resultados indican que hay que optimizar las cantidades de DNA para las muestras extraídas a partir de sangre con ambos métodos.

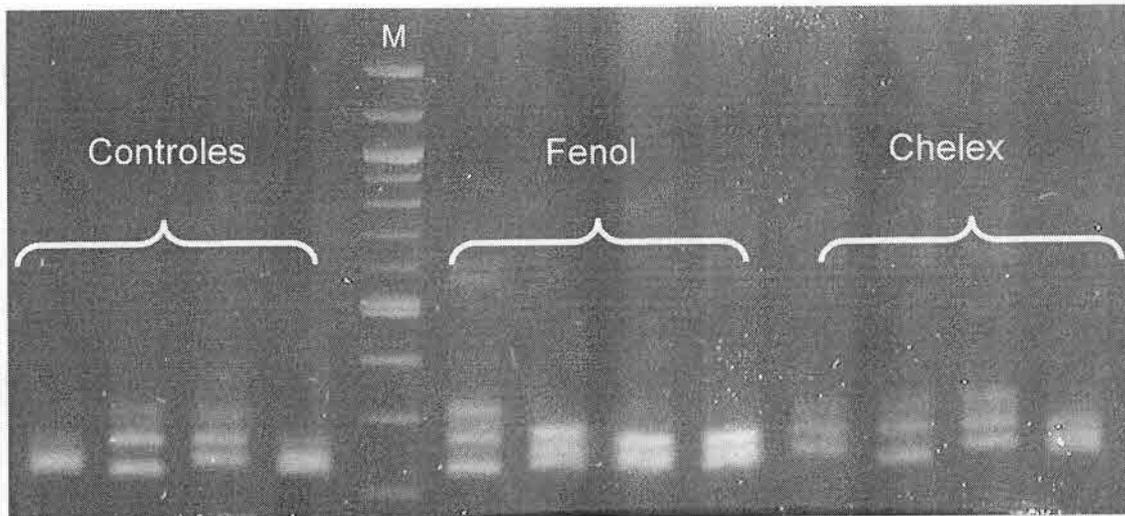


Figura 22. Amplificación del microsatélite OSM5 en muestras de DNA de avestruz extraídas de sangre con métodos de fenol y chelex. Los controles corresponden a DNA (6ng/ μ L) de animales adultos sexados. M: marcador de peso molecular de 100pb.

III.5.15 Amplificación con los partidores SCAR Dn70 de emú

Periodo de ejecución: 26 – 5 – 03 al 15 – 08 – 03

De los dos protocolos probados se obtuvo amplificación con ambos programas en todos los individuos, tanto machos como hembras (Figura 23). El fragmento amplificado en uno de los machos fue secuenciado para comparación con el fragmento de la hembra. No se detectó ningún sitio polimórfico para endonucleasas de restricción al comparar las secuencias obtenidas en el macho y la hembra. Debido a estos resultados se decidió descartar este marcador y utilizar la banda RAPD polimórfica encontrada con el partidor OPG-9 para construir un nuevo SCAR para esta especie.

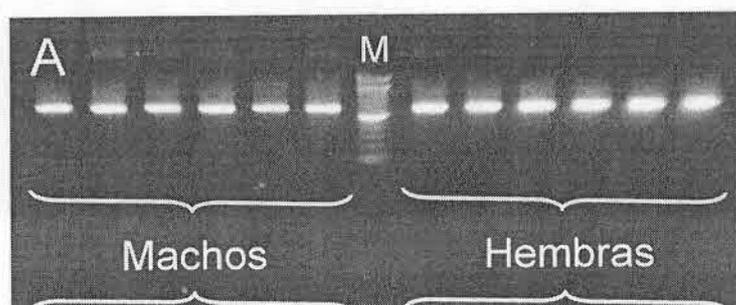


Figura 23. Amplificación del marcador SCAR Dn70 en machos y hembras de emú. Se muestran los dos protocolos probados: A) PCR convencional; B) "Touch Down". M: marcador de peso molecular de 100pb.

III.5.16 Construcción del nuevo SCAR DnG9 a partir del fragmento encontrado con el partidor OPG-9 en emú

Período de ejecución: 27 – 5 – 04 al 10 – 06 – 04

PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO

La purificación del fragmento fue chequeada en un gel de agarosa al 1% donde se observó un solo fragmento del tamaño esperado para el marcador polimórfico RAPD (aproximadamente 1100pb).

CLONACIÓN (LIGACIÓN, TRANSFORMACION, CRECIMIENTO DE CLONES):

La transformación de las células dio como resultado el crecimiento de colonias de bacterias transformadas, que se identifican por su color blanco. Se logró extraer DNA plasmidial de las cuatro colonias aisladas.

AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO INSERTADO

Como resultado se obtuvo en todos los clones una banda que corresponde al fragmento insertado más un segmento del plásmido, totalizando un tamaño de aproximadamente 1200pb.

SECUENCIACION:

Se envió a secuenciar el DNA plasmidial de uno de los clones con los partidores del kit. Al analizar y comparar las secuencias entre sí, se descubrió que en los extremos de cada secuencia las lecturas del secuenciador no fueron de buena calidad. Esto impidió definir apropiadamente la región de la secuencia donde se debe diseñar el partidor SCAR, por lo menos en un extremo. Debido a esto fue necesario diseñar un partidor interno para secuenciar nuevamente la región con la lectura ambigua (G9F: 5'-TATTG GCGCT GTTGC TTTAC-'3). Este partidor produjo un fragmento de 600pb que se purificó. Finalmente se envió a secuenciar este fragmento y se comparó con la secuencia obtenida anteriormente permitiendo descifrar las lecturas faltantes.

Fragmento DnG9 de emú (1039 bases):

```

1   CTGACGTCAC TGATAATGTT GTTGACCTGT TTGGGTACCT TGTGTCTGAT
51  ACGCTTTATT TCAGTTGGAC CAACAGAACT TTATAATTGT ATAGCAAAAG
101 CTTACGTTTT CTCAAATCCT TCAGGGCCAT CATTGTTTCA TCATAATTTA
151 AAAAATATTC ATAGTTTTTA AGGAGGCTTC CCCACTCTTA GCTGGAAAAA
201 AACCCTTGAA CAATCAGAAA ACCAATTTTC AGTCAACAAA ACCTTGAGGA
251 GGAAGGGTAG TGTCCAGTGC CAAATCTGGC TTCATCACTG TTTGTGTTGC
301 TAGAAAGAAG AGATACCAAG AAGGTAATAA AGAACAGGGA AGAATAAAGG
351 CCTCGAGGGC AGCGGAGGCG GGTCCAGGAG GGAAGGAGGA AGCGGGTGCA
401 GAGCTGTTCG AGAACAAACG CCCTTACGGA TGGGCAGCAT CAGCCTCTCA
451 CCAAACCAC ATGACTGTGA GGGAAAAGAT GAATGACAAC ATAGGAGGGA
501 TCAAAGTAAA AGATGAGATA GATCAGGACA GGGGGAGACT GTCGGTGTTT
551 CTTTGCAAAC TTTTAACTTG TGCAGCTGTT CTTGAAGACA CGCAAATTA
601 TACAGAAACT ATTTGTTGCT CTTACAATTT GTGCTGAGGG AGAGGAGCAG
651 TGCAGGATGC CACTTTTTGA GTTGAATTTG ATGCAGGATG ATGGGAGGCC
701 GCCTGCTCAG TCCCGGGCAC CAGCGCTGCA AAAGCCGAGG AGGGAGGCAG
751 GGAGAGGGGG GTCACTGTGA GAGCAGGCAC TTCTGTACCA CAGCACCAGG
801 CATTTATTTG TTTTTTTTTT CCTGCCACC TTTTCTTTTT TTTCTTTTAT
851 AGCCTCATTC AACTGAGGA AAGGACTGCA ATGCCTCAGC CCCCAGACTG
901 GCACCCCTG CGACAGTGAA CCAGTTTACT TTGACAAAGA AACCAAGTGA
951 AGGCTTCTTA AACCAGAAAA GCTCTTGCAA ATCAACTTCT GGCTCCTGTC
1001 TGCCTTGACC GGGAGACTTT GATAAGCGTG TGACGTCAG

```

DISEÑO Y SÍNTESIS DE PARTIDORES (OLIGONUCLÉOTIDOS) DEL SCAR DnG9.

Se diseñaron los siguientes partidores con el programa Primer3 y fueron enviados a sintetizar:

DnG9 F: 5'-CTGAC GTCAC ACGCT TATCA-3'

DnG9 R: 5'-CTGAC GTCAC TGATA ATGTT G-3'

AMPLIFICACIÓN CON LOS PARTIDORES DISEÑADOS DEL SCAR DnG9 EN MUESTRAS DE DNA GENÓMICO DE EMÚ.

Con los partidores diseñados DnG9F y DnG9R se obtuvo una banda única de aproximadamente 1050 pb en todas las hembras y que está ausente en los machos (Figura 24).

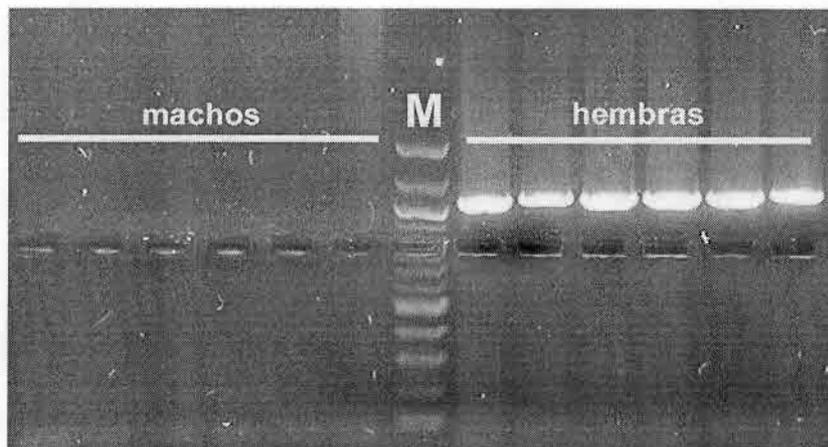


Figura 24. SCAR DnG9: Amplificación de muestras de DNA extraídas con fenol utilizando los partidores DnG9F y DnG9R. M: marcador de peso molecular.

III.5.17 Entrenamiento a técnicos de laboratorio de Bytech

Período de ejecución: 15 – 12 – 03 al 22 – 1 – 04

Se realizó una capacitación de personal de laboratorio de bytech para la aplicación precomercial de la técnica de sexaje de ratites.

Las personas capacitadas fueron la Bioquímica Mónica Santalices y la laboratorista Karen Arévalo.

III.5.18 Sexaje de familias de emú utilizando el SCAR DnG9

Período de ejecución: 27 – 5 – 04 al 10 – 06 – 04

En la **Tabla 3** se muestra el resultado del sexaje mediante el marcador DnG9 en las dos familias de emú analizadas. Cabe destacar que los resultados obtenidos con este marcador concuerdan exactamente con lo obtenido con el partidor RAPD UBC230, sin embargo, el procedimiento de PCR y la interpretación de los geles es mucho más sencilla cuando se utiliza el marcador SCAR.

EMU Individuo	PARENTESCO	TEJIDO MUESTRA	MARCADOR	GENOTIPO
Familia 2				
A	PADRE	PLUMA	DnG9	MACHO
AA	MADRE	PLUMA	DnG9	HEMBRA
1	HIJO	SANGRE	DnG9	HEMBRA
2	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
3	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
4	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
6	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
7	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
8	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
9	HIJO	SANGRE	DnG9	HEMBRA
Familia 3				
B	PADRE	PLUMA	DnG9	MACHO
BB	MADRE	PLUMA	DnG9	NO
10	HIJO	SANGRE	DnG9	HEMBRA
11	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO
12	HIJO	SANGRE	DnG9	HEMBRA
13	HIJO	SANGRE	DnG9	MACHO

Tabla 3. Sexaje de familias de emú con el marcador DnG9. NO = no se obtuvo DNA.

Los resultados obtenidos nos indican que el marcador SCAR DnG9 diseñado es eficiente en la identificación del sexo en los emúes. Tomando en cuenta todos los individuos sexados (27) la probabilidad de que la asociación entre la presencia del marcador y el sexo sea por azar es $p = 7,67 \times 10^{-8}$ ($1,55 \times 10^{-4}$ si se consideran solo 15 animales).

III.5.19 Diversidad alélica de los seis microsatélites estudiados en avestruz

Período de ejecución: 27 – 9 – 03 al 15 – 11 – 03

En la Tabla 4 se presenta la diversidad alélica obtenida para cada marcador microsatélite en todos lo animales analizados.

MARCADOR MICROSATELITE	ALELOS (pb)
LI05 (9 alelos)	187
	192
	196
	198
	201
	203
	209
	222
	226

<p style="text-align: center;">LI09 (14 alelos)</p>	<p>228 253 258 263 267 273 280 284 286 288 290 302 311 334</p>
<p style="text-align: center;">OSM6 (6 alelos)</p>	<p>98 100 102 104 106 108</p>
<p style="text-align: center;">OSM7 (11 alelos)</p>	<p>180 182 186 194 196 200 212 216 218 226 245</p>
<p style="text-align: center;">OSM4 (7 alelos)</p>	<p>130 135 137 139 150 156 158</p>
<p style="text-align: center;">OSM5 (6 alelos)</p>	<p>231 233 241 246 262 265</p>

Tabla 4. Número de alelos observados con cada microsatélite considerando los 35 ejemplares analizados.

El número de alelos y su respectivo tamaño corresponde con lo descrito en la literatura para cada loci microsatélite (Kimwele y Graves, 2003). El uso de partidores fluorescentes en el estudio de loci microsatélites demostró una alta eficiencia por la facilidad de identificación del tamaño de los alelos como por la reproducibilidad de los resultados.

DISTRIBUCIÓN DE ALELOS DE LOS 6 LOCI MICROSATÉLITES EN 5 FAMILIAS DE AVESTRUCES

En la **Figura 25** se muestran las señales obtenidas en el equipo de secuenciación con los microsatélites OSM4 y OSM5 (fluorocromo verde) para varios individuos.

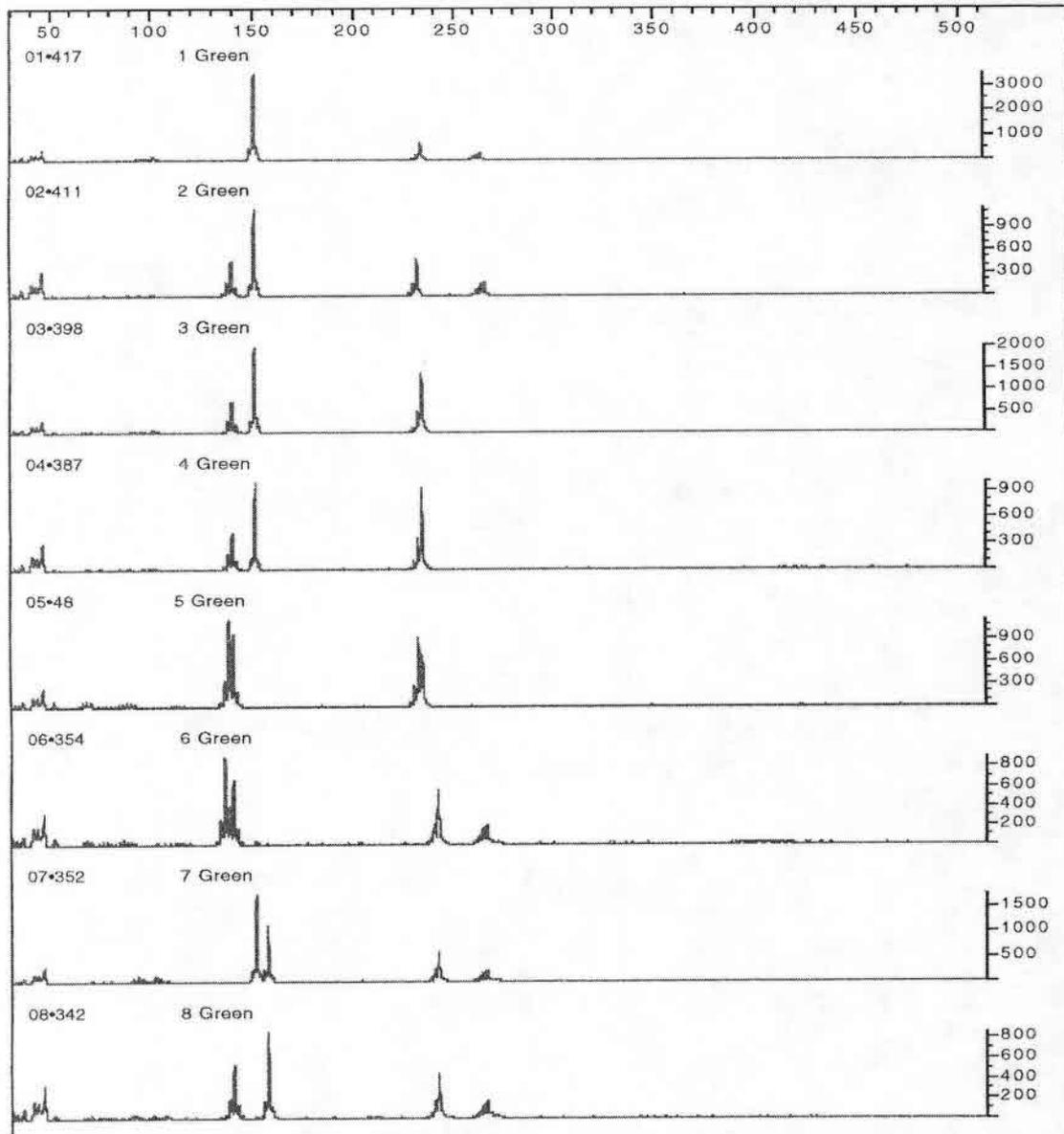


Figura 25. Perfiles de fluorescencia de los microsatélites OSM4 y OSM5 en ocho ejemplares de avestruz. Cada línea horizontal representa la lectura de un individuo. La escala horizontal indica el tamaño de los alelos observados y la vertical la intensidad de las señales.

En la **Tabla 5** se muestra la distribución de los alelos de cada microsatélite por familia. Se puede apreciar que algunas familias comparten alelos y que, en algunos caso, los polluelos no presentan los alelos esperados de acuerdo con el

genotipo de sus presuntos padres. Se confeccionó una planilla Excel que resume todos los datos que se incluyen en la **Tabla 5**, para el análisis de parentesco.

Microsatélites LI05 y LI09:

	LI05			LI09			
	203	209	222	258	273	290	311
M47	X		X	X		X	
H18	X	X			X		X
87	X	X				X	X
221	X		X	X	X		
342		X	X		X	X	
352	XX			X	X		
354	X		X	X			X

	LI05						LI09					
	187	201	203	209	222	226	258	271	280	284	290	334
M47			X		X		X				X	
H132	X	X								X		X
48		X	X							X	X	
387		X	X							X	X	
398		X			X						X	X
411		X			X		X					X
417				X		X		X	X			

	LI05					LI09			
	192	203	222	226	228	263	267	286	
M6	X	X				X	X		
H131			X	X	X			X	
8		X		X			X	X	
51		X		X			X	X	
86		X	X		X		X		
106		XX					X	X	
120		X	X				X	X	

	LI05				LI09			
	196	201	215	222	253	286	288	334
M58		XX					X	X
H128	X			X	X	X		
97		X	X			X	X	
99	X	X				X	X	
105		X		X	X		X	
275	X	X			X			X
281	X	X			X			X

54	X	X			X	X	
----	---	---	--	--	---	---	--

	LI05			LI09		
	198	203	209	273	286	302
M43	X		X		X	X
H125	X	X		XX		
203		X	X	X	X	
272		X	X	X	X	
298	XX			X	X	
363		X	X	X	X	
94		X	X	X		X

Microsatélites OSM6 y OSM7:

	OSM6			OSM7			
	104	106	108	194	200	212	245
M47	XX			X			X
H18		X	X		X	X	
87	X		X			X	X
221	X	X				X	X
342	X	X		X	X		
352	X		X	X		X	
354	X		X	X		X	

	OSM6			OSM7			
	102	104	106	194	200	216	245
M47		XX		X			X
H132	X		X		X	X	
48		X	X	X		X	
387		X	X			X	X
398	X	X		X	X		
411		X	X			X	X
417			XX			XX	

	OSM6			OSM7				
	98	100	102	182	186	200	216	245
M6	X	X					X	X
H131		X	X			X		X
8	X	X						XX
51	X	X						XX
86		X	X			X	X	
106		X	X	X	X			
120		X	X				X	X

	OSM6			OSM7				
	98	100	104	180	186	196	200	218
M58		X	X	X	X			
H128	X	X				XX		
97	X	X					X	X
99		XX		X		X		
105		XX		X		X		
275	X	X		X		X		
281		X	X		X	X		
54		X	X		X	X		

	OSM6			OSM7			
	98	100	102	182	200	226	245
M43	X	X		X			X
H125			XX		X	X	
203	X		X	X	X		
272	X		X	X		X	
298		X	X			X	X
363		X	X			X	X
94	X		X	X	X		

Microsatélites OSM4 y OSM5:

	OSM4				OSM5		
	135	139	150	156	233	241	265
M47		X	X		X		X
H18	X			X		X	X
87	X		X			X	X
221			X	X		X	X
342		X		X		X	X
352			X	X		X	X
354	X	X				X	X

	OSM4			OSM5			
	137	139	150	231	233	262	265
M47		X	X		X		X
H132	X		X	X	X		
48	X	X		X	X		
387		X	X		XX		
398		X	X		XX		
411		X	X	X			X
417			XX		X	X	

	OSM4	OSM5
--	------	------

	137	139	150	158	231	233	241	250	262
M6		X	X				X		X
H131	X			X		X		X	
8		X		X		X	X		
51		X		X				X	X
86		X		X		X			X
106	X			X	X	X			
120	X	X						X	X

	OSM4				OSM5			
	139	150	156	158	231	241	246	262
M58			XX		X		X	
H128	X			X	X	X		
97	X	X			X			X
99	X		X		XX			
105			X	X	X		X	
275	X		X			X	X	
281			X	X		X	X	
54			X	X	X		X	

	OSM4			OSM5			
	130	137	150	231	233	241	250
M43	X	X		X	X		
H125		X	X			X	X
203	X		X	X		X	
272		X	X		X	X	
298		X	X		X	X	
363	X		X		X	X	
94	X	X			X		X

Tabla 5. Distribución de alelos de seis loci microsatélites en 5 familias de avestruz.

III.5.20 Resultados finales de asignación de paternidad o maternidad

Período de ejecución: 30 – 12 – 02 al 10 – 06 – 04

En la Tabla 6 se observan las medidas de variabilidad genética, número de alelos y probabilidades de exclusión de paternidad en la población estudiada de cada uno de los loci microsatélites analizados.

Locus	Heterocigosidad (+)	Heterocigosidad (++)	Nº Alelos	Probabilidad de Exclusión
-------	---------------------	----------------------	-----------	---------------------------

L105	0,886	0,834	10	0,481
L109	0,971	0,911	15	0,659
OSM4	0,943	0,834	7	0,471
OSM5	0,886	0,892	11	0,609
OSM6	0,943	0,831	7	0,466
OSM7	0,914	0,836	7	0,476
Total	0,924	0,856	9,5	0,989

(+) Estimada por conteo directo de los heterocigotos.

(++) Estimada de acuerdo a lo esperado en un población en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 6. Variabilidad genética y probabilidad de exclusión de paternidad en 35 individuos de una población de cultivo avestruces.

La probabilidad de exclusión de paternidad utilizando estos 6 microsatélites esta en el rango de lo aceptado para humanos (99,9%) y permitió inicialmente excluir como progenitores a los siguientes individuos (Tabla 7):

Macho	Hembra	Loci no coincidentes (*)	Polluelo
M6		OSM4, OSM5 y OSM7	106
M58		OSM4 y OSM7	97
M47		L105, L109, OSM6 y OSM7	417
	H131	L105 y OSM7	106
	H128	L105 y OSM7	97
	H132	L105 y L109	417

(*) Loci que el genotipo del Padre o la madre no coincide con el de la progenie analizada.

Tabla 7. Animales excluidos como progenitores de los polluelos que se indican en del plantel de avestruces "Aguas Claras", San Esteban, V región.

De este modo en los siete progenitores excluidos como posibles padres (3 machos y 3 hembras, Tabla 7) cuatro progenitores fueron excluidos usando dos marcadores (66,8%), un padre fue excluido usando tres marcadores (16,7%) y otro padre fue excluido usando cuatro marcadores (16,7%).

Al analizar la Tabla 7, se desprende que no solo hubo polluelos mal asignados a los padres, sino que también los polluelos 97, 106 y 417 fueron incorrectamente asignados en los registros del plantel a familias a las que ellos no pertenecen, dado que tanto su padre como madre fueron excluidos como progenitores como resultado del análisis. Análisis posteriores indicaron que se trataba de huevos importados desde Canadá y que por ende no existía relación de ningún tipo con los individuos a los cuáles habían sido asignados.

Como consecuencia del análisis de asignación de paternidad o maternidad la estructura de las familias obtenidas se observa en la **Tabla 8**.

Familia	Macho	Hembra	Polluelos			
1	M6	H131	8	51	86	120
2	M58	H128	54	99	105	275 281
3	M43	H125	94	203	272	298 363
4	M47	H18	87	221	342	352 354
5	M47	H132	48	387	398	411

Tabla 8. Resultado de análisis de asignación de paternidad y maternidad utilizando 6 microsátélites polimórficos y los programas CERVUS y PROBMAX en cinco familias obtenidas desde el plantel de avestruces “Aguas Claras”, San Esteban, V Región.

Luego de la asignación de paternidad/maternidad el tamaño de tres familias se redujo ya que tenían al menos un individuo mal asignado correspondiendo al 60% de las familias. Considerando sólo los polluelos, tres de los 26 individuos analizados (11,5%) tenían mal asignado al menos un progenitor.

III.5.21 Análisis de parentesco genético

Período de ejecución: 6 – 8 – 04 al 10 – 12 – 04

Para todos los individuos de la población (padres y progenie) se realizó un análisis de parentesco, los valores promedios de r_{xy} para los distintos grados de parentescos presentes en la población se muestran en la **Tabla 9**.

Parejas analizadas	Número pares	$r_{xy} \pm DE$ (microsatélites)	R_{xy} (Genealogía)*
Padres-Progenie	40	0.4075 ± 0.0885	0,500
Hermanos	36	0.4394 ± 0.1699	0,500
Completos	27	0.1330 ± 0.2324	0,250
Medios Hermanos			

* Se asume que no hay individuos consanguíneos en la población.

Tabla 9. Comparación de algunos de los valores promedio de parentesco genético obtenido usando seis loci microsatélites y esperados desde la genealogía del plantel de avestruces "Aguas Claras", San Esteban, V región.

Los valores de parentesco obtenidos usando microsatélites se aproximan en general a los valores teóricos esperados por lo menos, entre los padres y progenie o entre hermanos completos. En relación con el parentesco entre medios hermanos la estimación muestra una desviación del valor teórico con gran varianza, resultado que podría mejorarse tipificando los animales para un mayor número de microsatélites.

En la **Tabla 10** se muestra el parentesco genético r_{xy} obtenido usando marcadores microsatélites entre los individuos que estaban mal asignados a algún progenitor y todos los padres y madres analizados.

Progenitores	106	97	417
M6	-0.02	0.15	0.13
H131	0.22	-0.08	-0.12
M58		0.14	-0.24
H128		0.14	-0.27
M43			-0.12

H125	-0.11
M47	-0.06
H18	-0.01
H132	0.32

Tabla 10. Relaciones de parentesco genético entre todos los progenitores tipificados para su genotipo y los polluelos mal asignados a al menos uno de los padres registrados en la genealogía del plantel de avestruces “Aguas Claras”, San Esteban, V región.

Como se observa en la Tabla 10, ninguno de los progenitores presentes en el plantel parece mostrar algún nivel de parentesco con los polluelos cuestionados. Por tal motivo, al parecer los progenitores “faltantes” de estos polluelos deben formar parte de la población del plantel de la que no se obtuvo su genotipo para los seis loci microsatélites analizados.

IV.- Fichas Técnicas

A continuación se presenta un resumen de la información relevante ordenada como fichas técnicas validada por el proyecto en cuanto a:

- Parámetros y rendimientos
- Inversiones Requeridas
- Costos relevantes
- Ingresos por venta

Esta información ha sido resumida en base a los datos entregados en el estudio de mercado desarrollado (Anexo N°2) y el análisis estratégico y plan de marketing (Anexo N°3). El proyecto real contempla los últimos valores obtenidos en el desarrollo de la unidad productiva Aguas Claras.

En base a los análisis desarrollados y el trabajo del equipo técnico se puede señalar que los costos unitarios de cada servicio están representados por el valor de aplicación de la técnica desarrollada, desglosada en costos variables unitarios los cuáles se presentan en el siguiente cuadro:

ESTRUCTURA DE COSTOS

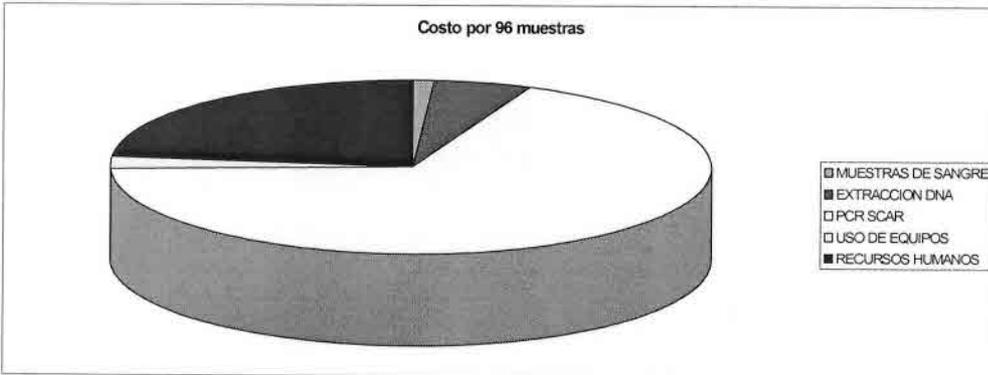
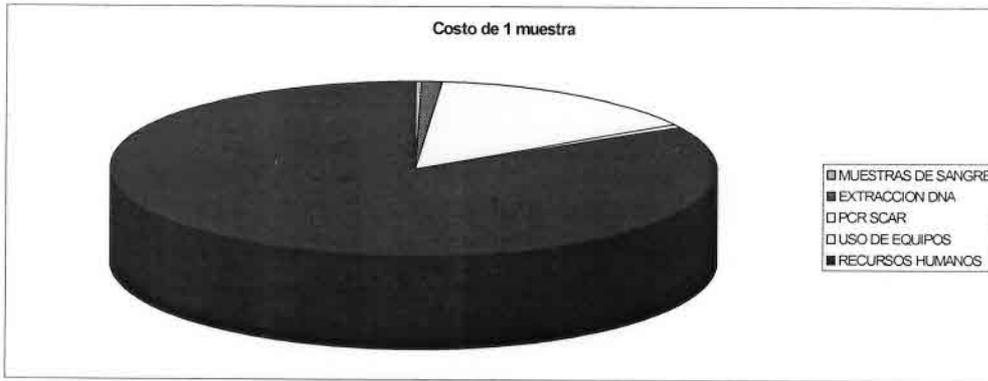
ITEM	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR UNITARIO (\$)	COSTO (\$)
MUESTRAS DE SANGRE				
TUBO EPPENDORF	unidad	1,00	\$ 12,98	\$ 12,98
TIRA PAPEL WATMAN	unidad	3,00	\$ 0,12	\$ 0,36
SUB-TOTAL				\$ 13,34
EXTRACCION DNA				
QUELEX	gramos	0,15	\$ 8,88	\$ 1,33
TUBO EPPENDORF	unidad	1,00	\$ 12,98	\$ 12,98
CAJA ALMACENAJE	costo de uso	1,00	\$ 11,00	\$ 11,00
PUNTAS	unidad	2,00	\$ 7,49	\$ 14,98
TBE	gramos	0,50	\$ 47,50	\$ 23,75
SUB-TOTAL				\$ 64,04
PCR SCAR				
SINTESIS PARTIDORES	servicio pb	2,00	\$ 0,98	\$ 1,96
TAQ	microlitro	1,00	\$ 136,40	\$ 136,40
DNTPS	microlitro	0,15	\$ 180,00	\$ 27,00
AGUA	microlitro	7,00	\$ 0,06	\$ 0,42
PUNTAS	unidad	10,00	\$ 7,49	\$ 74,90
MARKER	set	1,00	\$ 193,00	\$ 193,00
BUFFER DE CARGA	microlitro	2,50	\$ 2,00	\$ 5,00
AGAROSA	miligramo	0,04	\$ 980,00	\$ 39,20
TBE	mililitro	6,00	\$ 47,50	\$ 285,00
FOTO	unidad	1,00	\$ 20,00	\$ 20,00
BROMURO DE ETIDIO	mililitro	1,00	\$ 60,00	\$ 60,00
SUB-TOTAL				\$ 842,88
RECURSOS HUMANOS				
ESPECIALISTA	hora hombre	0,10	\$ 15.000,00	\$ 1.500,00
TECNICO DE LABORATORIO - EXTRACCION DNA	hora hombre	1,00	\$ 1.750,00	\$ 1.750,00
TECNICO DE LABORATORIO - PCR SCAR	hora hombre	0,50	\$ 1.750,00	\$ 875,00
TECNICO DE LABORATORIO - GEL	hora hombre	0,25	\$ 1.750,00	\$ 437,50
TECNICO DE LABORATORIO - CARGAR GEL	hora hombre	0,03	\$ 1.750,00	\$ 58,33
SUB-TOTAL				\$ 4.620,83

ITEM	Nº ANÁLISIS POR BATERIA	Nº bATERIAS VIDA ÚTIL	VALOR EQUIPO (\$)	COSTO (\$)
USO DE EQUIPOS				
BOTELLA	1	2.000	\$ 10.000	\$ 5,00
VASO PRECIPITADO	1	2.000	\$ 3.800	\$ 1,90
GRADILLA	1	2.000	\$ 6.900	\$ 3,45
MAQUINA FOTOGRAFICA	1	10.000	\$ 120.000	\$ 12,00
TERMOCICLADOR	96	10.000	\$ 4.200.000	\$ 4,38
CAMARA ELECTROFORESIS	96	10.000	\$ 460.000	\$ 0,48
SUB-TOTAL				\$ 27,21
COSTO UNITARIO				\$ 5.568,31

Para el ítem uso de equipos el método de cálculo empleado se basa en el valor de uso, el cual corresponde al cociente entre la inversión de cada equipo (valor unitario) y el número de análisis posibles de efectuar de acuerdo a la vida útil del equipo (cantidad)

De esta forma es posible tener costos unitarios competitivos (cerca de los 16 dólares) por cada marcador aplicado. Si se observa el desglose de costos se puede señalar que lo relevante de cada análisis son los costos de recursos humanos los cuales son muy altos para muestras individuales. Sin embargo debido a la capacidad de los equipos disponibles, es posible reducirlos desde los \$8.689 a \$1.213 para baterías de análisis de más de 48 o 96 unidades. Esto último es posible debido a que los tiempos muertos de los equipos influyen en el costo total del sistema.

USO DE EQUIPOS	VALOR EQUIPO \$	SERVICIOS VIDA UTIL unidad	ANALISIS POR BATERIA unidad	COSTO POR USO \$
BOTELLA	10.000	2.000	1	5,00
VASO PRECIPITADO	3.800	2.000	1	1,90
GRADILLA	6.900	2.000	1	3,45
MAQUINA FOTOGRAFICA	120.000	10.000	1	12,00
TERMOCICLADOR	4.200.000	10.000	96	4,38
CAMARA ELECTROFORESIS	460.000	10.000	96	0,48



A continuación se presenta el costeo por baterías de análisis para 1, 8, 16, 48 y 96 muestras:

COSTO VARIABLE POR ANÁLISIS (\$)

N° ANÁLISIS POR BATERIA	1	8	16	48	96
HORAS HOMBRE POR BATERIA	1,88	1,88	1,88	3,00	6,00
RECURSOS HUMANOS / ANÁLISIS	\$ 7.741,67	\$ 967,71	\$ 483,85	\$ 265,63	\$ 265,63
INSUMOS MUESTRAS DE SANGRE / ANÁLISIS	\$ 13,34	\$ 13,34	\$ 13,34	\$ 13,34	\$ 13,34
INSUMOSEXTRACCION DNA / ANÁLISIS	\$ 64,04	\$ 64,04	\$ 64,04	\$ 64,04	\$ 64,04
INSUMOS PCR SCAR / ANÁLISIS	\$ 842,88	\$ 842,88	\$ 842,88	\$ 842,88	\$ 842,88
USO DE EQUIPOS / ANÁLISIS	\$ 27,21	\$ 27,21	\$ 27,21	\$ 27,21	\$ 27,21
TOTAL / ANÁLISIS	\$ 8.689,14	\$ 1.915,18	\$ 1.431,33	\$ 1.213,10	\$ 1.213,10

En base al estudio de mercado nacional desarrollado y al análisis del mercado internacional a continuación se presenta el tamaño del mercado potencial

SUPUESTOS DEL MERCADO				
PARAMETROS ESTIMACION MERCADO OBJETIVO				
MERCADO POTENCIAL	ANALISIS		% DEL MERCADO	N° ANÁLISIS ESTIMADO
	NACIONAL	INTER-NACIONAL		
ANÁLISIS AVESTRUZ	5.040	0	30	1.512
ANÁLISIS EMU	240	0	30	72
ANÁLISIS ÑANDÚ	100	0	30	30
SERVICIOS CONSANGUINIDAD AVESTRUZ	100	10	36	640
SERVICIOS CONSANGUINIDAD EMU	100	10	36	640
Total	5.580	20		2.894

Se pretende abarcar el 30% al 36% del mercado potencial de acuerdo a los datos consultados. Si bien el número de muestras es bastante escaso, y el acceso al mercado internacional es casi despreciable, en base a estos datos es posible estructurar un análisis de costos como empresa base (sin considerar otros servicios, desarrollos, etc.).

El valor utilizado como precio de venta del servicio de sexaje para ratites es de \$7.500.- el cual se basa en el 60% del valor de los precios a los cuáles se transaron algunas muestras a productores del sur. Si bien el estudio de mercado indica valores inferiores, esto se debe a que la metodología de estudio para un producto nuevo siempre sondea un precio y obviamente el potencial usuario siempre baja el precio. De esta forma los especialistas concluyen (y esto es lo relevante) que existe interés en el servicio, ya que primero se sondea a que precio lo usaría y si no existiera interés la respuesta sería "a ningún precio"; por el contrario si manifiesta precio indica interés y si al consultar a un precio dado bajo (\$5.000) mantiene el interés implica que pueden seguir interesados a precios de mercado internacional y de servicios relacionados. No se hace referencia a pedidos por mayor por las innumerables aristas que ello implica.

ESTRUCTURA ANUAL DE COSTOS AÑO ESTABILIZADO
MODALIDAD EVALUACION: COSTO-BENEFICIO PURO

	Nº de Servicio	Nº Análisis /Servicio	UNIDAD	CANTIDAD	\$/Unid.	TOTAL (\$)
INGRESOS POR VENTAS						\$ 21.065.000
ANÁLISIS AVESTRUZ			análisis	1.512	\$ 7.500	\$ 11.340.000
ANÁLISIS EMU			análisis	72	\$ 7.500	\$ 540.000
ANÁLISIS NANDÚ			análisis	30	\$ 7.500	\$ 225.000
SERVICIOS CONSANGUINIDAD AVESTRUZ	40	16	análisis	640	\$ 7.000	\$ 4.480.000
SERVICIOS CONSANGUINIDAD EMU	40	16	análisis	640	\$ 7.000	\$ 4.480.000
NUMERO TOTAL DE ANALISIS VENDIDOS				2.894		

Nº ANALISIS POR BATERIA		1	8	16	48	96
ITEM		TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)
COSTOS VARIABLES EN PERSONAL		\$ 22.404.383	\$ 2.800.548	\$ 1.400.274	\$ 768.719	\$ 768.719
RECURSOS HUMANOS PROFESIONAL						
	Horas Hombre por bateria	0,10	0,10	0,10	0,15	0,30
	Total Jornadas Hombre para los análisis	36,18	4,52	2,26	1,13	1,13
	Precio por Hora	15.000,00	15.000,00	15.000,00	15.000,00	15.000,00
	Costo por análisis	\$ 1.600,00	\$ 107,50	\$ 93,75	\$ 46,66	\$ 46,66
TOTAL ESPECIALISTA	Nº análisis	2.894	\$ 4.341.000	\$ 542.625	\$ 271.313	\$ 135.656
RECURSOS HUMANOS TÉCNICO						
	Horas Hombre por bateria	1,78	1,78	1,78	3,00	6,00
	Total Jornadas Hombre para análisis	645,1	80,6	40,3	22,6	22,6
	Total Jornadas Hombre para muestreos	645,1	80,6	40,3	22,6	22,6
	Precio por Hora	1.750,00	1.750,00	1.750,00	1.750,00	1.750,00
	Costo por análisis	\$ 6.241,67	\$ 780,21	\$ 380,10	\$ 218,75	\$ 218,75
TOTAL TÉCNICO DE LABORATORIO	Nº análisis	2.894	\$ 18.063.383	\$ 2.257.923	\$ 1.128.961	\$ 633.063

COSTOS VARIABLES INSUMOS, EQUIPOS Y OTROS		UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)
INSUMOS MUESTRAS DE SANGRE				\$ 2.741.984	\$ 2.741.984	\$ 2.741.984	\$ 2.741.984	\$ 2.741.984
	TUBO EPPENDORF	unidad	2.894	\$ 37.564,1	\$ 37.564	\$ 37.564	\$ 37.564	\$ 37.564
	TIRA PAPEL WATMAN	unidad	8.682	\$ 1.041,8	\$ 1.042	\$ 1.042	\$ 1.042	\$ 1.042
INSUMOS EXTRACCION DNA								
	QUELEX	gramos	434	\$ 3.854,8	\$ 3.855	\$ 3.855	\$ 3.855	\$ 3.855
	TUBO EPPENDORF	unidad	2.894	\$ 37.564,1	\$ 37.564	\$ 37.564	\$ 37.564	\$ 37.564
	CAJA ALMACENAJE	costo uso	2.894	\$ 31.834,0	\$ 31.834	\$ 31.834	\$ 31.834	\$ 31.834
	PUNTAS	unidad	5.798	\$ 43.352,1	\$ 43.352	\$ 43.352	\$ 43.352	\$ 43.352
	TBE	gramos	1.447	\$ 68.732,5	\$ 68.733	\$ 68.733	\$ 68.733	\$ 68.733
INSUMOS PCR SCAR								
	SINTESIS PARTIDORES	servicio pb	5.798	\$ 5.672,2	\$ 5.672	\$ 5.672	\$ 5.672	\$ 5.672
	TAQ	microlitro	2.894	\$ 394.741,6	\$ 394.742	\$ 394.742	\$ 394.742	\$ 394.742
	DNTPS	microlitro	434,10	\$ 78.138,0	\$ 78.138	\$ 78.138	\$ 78.138	\$ 78.138
	AGUA	microlitro	20.268	\$ 1.215,48	\$ 1.215	\$ 1.215	\$ 1.215	\$ 1.215
	PUNTAS	unidad	28.940	\$ 216.760,60	\$ 216.761	\$ 216.761	\$ 216.761	\$ 216.761
	MARKER	set	2.894	\$ 558.542,0	\$ 558.542	\$ 558.542	\$ 558.542	\$ 558.542
	BUFFER DE CARGA	microlitro	7.235	\$ 14.470,0	\$ 14.470	\$ 14.470	\$ 14.470	\$ 14.470
	AGAROSA	miligramo	115,76	\$ 113.444,8	\$ 113.445	\$ 113.445	\$ 113.445	\$ 113.445
	TBE	mililitro	17.364	\$ 824.790,0	\$ 824.790	\$ 824.790	\$ 824.790	\$ 824.790
	FOTO	unidad	2.894	\$ 57.880,0	\$ 57.880	\$ 57.880	\$ 57.880	\$ 57.880
	BROMURO DE ETIDIO	mililitro	2.894	\$ 173.640,0	\$ 173.640	\$ 173.640	\$ 173.640	\$ 173.640
USO DE EQUIPOS								
	TERMOCLICADOR, ELECTROFORESIS, ETC	Nº análisis	2.894	\$ 78.745,74	\$ 78.746	\$ 78.746	\$ 78.746	\$ 78.746
OTROS GASTOS								
	COSTO DE VENTA	porcentaje	1%	\$ 210.650,00	\$ 210.650	\$ 210.650	\$ 210.650	\$ 210.650
	MARKETING	porcentaje	1%	\$ 210.650,00	\$ 210.650	\$ 210.650	\$ 210.650	\$ 210.650

COSTOS FIJOS		UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)
RECURSOS HUMANOS PROFESIONAL				\$ 17.400.000	\$ 2.920.000	\$ 2.200.000	\$ 1.720.000	\$ 1.720.000
	Meses de trabajo		3		1	1	1	1
	Sueldo mensual		\$ 1.000.000	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000,00	\$ 1.000.000,00	\$ 1.000.000,00	\$ 1.000.000,00
TOTAL ESPECIALISTA	Nº análisis	2.894	\$ 3.000.000	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000	\$ 1.000.000
RECURSOS HUMANOS TÉCNICO								
	Meses de trabajo		60		8	5	3	3
	Sueldo mensual		\$ 240.000	\$ 240.000	\$ 240.000	\$ 240.000	\$ 240.000	\$ 240.000
TOTAL TÉCNICO DE LABORATORIO	Nº análisis	2.894	\$ 14.400.000	\$ 1.920.000	\$ 1.200.000	\$ 720.000	\$ 720.000	\$ 720.000

OTROS COSTOS FIJOS		UNIDAD	CANTIDAD	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)	TOTAL (\$)
PERIODO DE GASTO EN MESES				\$ 37.320.636	\$ 4.976.084	\$ 3.110.053	\$ 1.866.032	\$ 1.866.032
	USO DE INFRAESTRUCTURA	mes	\$ 150.000	\$ 9.000.000	\$ 1.200.000	\$ 750.000	\$ 450.000	\$ 450.000
	MANTENCIÓN DE EQUIPOS	% equipos/mes	-0,67%	\$ 1.920.280	\$ 256.037	\$ 160.023	\$ 96.014	\$ 96.014
	ADMINISTRACIÓN	mes	\$ 400.000	\$ 24.000.000	\$ 3.200.000	\$ 2.000.000	\$ 1.200.000	\$ 1.200.000
	DEPRECIACIÓN	% equipos/mes	-0,83%	\$ 2.400.350	\$ 320.047	\$ 200.029	\$ 120.018	\$ 120.018

MARGEN OPERACIONAL				\$ 58.801.997	\$ 7.626.384	\$ 11.612.690	\$ 13.968.266	\$ 13.968.266
	Impuestos	tasa	17,0%		\$ 1.296.485	\$ 1.974.157	\$ 2.374.605	\$ 2.374.605
Margen D.I.				\$ 58.801.997	\$ 6.329.899	\$ 9.638.532	\$ 11.593.661	\$ 11.593.661
	Depreciación			\$ 2.400.350	\$ 320.047	\$ 200.029	\$ 120.018	\$ 120.018
FLUJO NETO				\$ 56.401.647	\$ 6.649.846	\$ 9.838.562	\$ 11.713.678	\$ 11.713.678

COSTO VARIABLE POR ANÁLISIS (\$)

Nº ANÁLISIS POR BATERIA	1	8	16	48	96
HORAS HOMBRE POR BATERIA	1,88	1,88	1,88	3,00	6,00
RECURSOS HUMANOS / ANÁLISIS	\$ 7.741,67	\$ 967,71	\$ 483,85	\$ 265,63	\$ 265,63
INSUMOS MUESTRAS DE SANGRE / ANÁLISIS	\$ 13,34	\$ 13,34	\$ 13,34	\$ 13,34	\$ 13,34
INSUMOSEXTRACCION DNA / ANÁLISIS	\$ 64,04	\$ 64,04	\$ 64,04	\$ 64,04	\$ 64,04
INSUMOS PCR SCAR / ANÁLISIS	\$ 842,88	\$ 842,88	\$ 842,88	\$ 842,88	\$ 842,88
USO DE EQUIPOS / ANÁLISIS	\$ 27,21	\$ 27,21	\$ 27,21	\$ 27,21	\$ 27,21
TOTAL / ANÁLISIS	\$ 8.689,14	\$ 1.915,18	\$ 1.431,33	\$ 1.213,10	\$ 1.213,10

El análisis genera un escenario bastante limitado, el cual genera un flujo anual de MM\$ 11,7 después de impuestos en año estabilizado, lo que se genera por el escaso volumen de análisis que se puede vender de acuerdo a los datos del estudio de mercado. Sin embargo y bajo un escenario de evaluación conservador se puede evaluar el proyecto a cinco años considerando la posibilidad de analizar el negocio como un laboratorio con personal realizando exclusivamente las labores de sexaje y determinación de consanguinidad durante un período equivalente a 5 meses al año, debiendo el resto del tiempo dedicarse a cumplir otras labores para garantizar el funcionamiento de la unidad de manera rentable. Considerando este escenario de personal trabajando part-time se obtiene la siguiente evaluación económica:

FLUJO ANUAL DEL PROYECTO - EVALUACIÓN ECONÓMICA-PARA BATERIAS PCR DE 16 ANÁLISIS

FLUJO ANUAL	0	1	2	3	4	5
INVERSIÓN INICIAL	- 4.800.700					
CAPITAL DE OPERACIÓN	- 5.310.053					
META DE VENTAS		60%	70%	85%	100%	100%
INGRESOS VENTAS		12.639.000	14.745.500	17.905.250	21.065.000	21.065.000
EGRESOS						
COSTOS VARIABLES	- 4.142.258	- 4.142.258	- 4.142.258	- 4.142.258	- 4.142.258	- 4.142.258
COSTOS FIJOS	- 5.310.053	- 5.310.053	- 5.310.053	- 5.310.053	- 5.310.053	- 5.310.053
VALOR RESIDUAL						1.200.175
UTILIDADES BRUTAS	- 19.563.063	3.186.690	5.293.190	8.452.940	11.612.690	12.812.865
IMPUESTOS		541.737	899.842	1.437.000	1.974.157	2.178.187
DEPRECIACIÓN		200.029	200.029	200.029	200.029	200.029
UTILIDADES NETAS	- 19.563.063	2.844.982	4.593.377	7.215.969	9.838.562	10.834.707
TIR						19%
VAN						3.728.198

El monto de inversión inicial se refiere a los equipos (ver estructura de costos) y el capital de trabajo u operación al funcionamiento de 1 año tres meses hasta comenzar la venta de análisis. Como ya se ha mencionado no considera la venta de otros servicios y está muy acotado a los datos arrojados por el estudio de mercado. El VAN del proyecto es de MM\$ 3,7 y la TIR de 19%, lo que lo hace un negocio atractivo de acuerdo a los parámetros normales pero con un tamaño muy pequeño. De esta forma el interés que pueda surgir por el desarrollo de esta iniciativa estará condicionado, a nuestro entender, a las siguientes situaciones:

- Universidades: acoplarse a alguna unidad de servicios de análisis similares existentes o generar una nueva unidad en pos de dar impulso a nuevas alternativas que se produzcan bajo el alero del proyecto. Se debe tener presente que es una unidad pequeña que se autosustenta y genera excedentes.
- Laboratorios: puede servir de base para el escalamiento hacia nuevos nichos de mercados. Sólo se constituye en alternativa para aquellos que cuentan con el personal idóneo o la capacidad de generarlo.
- Empresas agrícolas o de ratites: no presentan ninguna ventaja estratégica ni genera un volumen de negocio atractivo, por ende no califican dentro de las candidatas.
- Incubadoras de Negocio: debido al alto grado de innovación y desarrollo tecnológico involucrado, puede ser una excelente idea para desarrollar en alguna incubadora de negocios con apoyo de fondos de inversión de riesgos, en el sentido de usarla de plataforma para arremeter hacia nuevos servicios y desarrollos. En ambos casos y dada la pertenencia de los resultados en forma conjunta a las universidades y FIA, las cuales cuentan con este tipo de incubadoras podría ser un negocio interesante para estructurar, hacerlo crecer y posteriormente venderlo.

V.- Problemas enfrentados.

Problemas técnicos.

La obtención de DNA a partir de plumas de los polluelos de algunas familias de emú y ñandú no fue exitosa.

Los marcadores SCAR Dn230 y Dn70 para emú construídos no permitieron la identificación del sexo en forma confiable en esta especie, situación que derivó en la construcción de un nuevo marcador. que resultó exitoso.

No se aplicó la encuesta internacional a productores de ratites (actividad adicional propuesta en el informe N°3) debido a problemas con la base de soporte informático.

El estudio de parentesco en avestruz con marcadores microsatélites contemplaba inicialmente la utilización de siete *loci* de estos marcadores. Sin embargo, se eliminó del estudio, el marcador LI014 ya que, a pesar de realizar distintos protocolos de PCR, no se logró obtener fragmentos discretos, es decir individualizar los alelos esperados.

Problemas legales.

Los resultados de la técnica de marcadores moleculares para ratites permiten sugerir que es un proceso susceptible de ser patentado, ya que de acuerdo al análisis no existe una metodología similar que se encuentre disponible actualmente a nivel nacional e internacional, con los marcadores utilizados.

Esto sugiere la posibilidad de obtener patente para la metodología de trabajo desarrollada y no para el marcador en sí mismo, ya que los partidores de origen sólo pueden ser utilizados con fines de investigación.

De la misma forma el equipo técnico del proyecto no posee las capacidades ni el proyecto cuenta con los recursos para iniciar la tramitación de una patente al respecto, sin embargo queda abierta la posibilidad de que estos resultados puedan ser considerados para el trámite de una patente por parte de las instituciones ejecutoras.

VI. Calendario de Ejecución.

ID	TAREA	DURACION	PROYECTADO		REAL	
			FECHA INICIO	FECHA TERMINO	FECHA INICIO	FECHA TERMINO
2	Etapa 1: Desarrollo Técnica Sexaje	505 days	01-12-01	07-11-03	01-01-02	10-06-04
6	Organización Equipo de Trabajo	2 wks	03-12-01	14-12-01	03-01-02	14-01-02
7	Selección Personal	2 wks	17-12-01	28-12-01	17-01-02	28-01-02
8	Compra Equipos	2 wks	17-12-01	28-12-01	17-01-02	28-01-02
9	Recolección Antecedentes	2 wks	31-12-01	11-01-02	31-01-02	11-03-02
10	Estandarización Técnica Extracción ADN	40 days	21-01-02	15-03-02	21-01-02	12-04-02
18	Screening Marcadores RAPD Polimórficos	160 days	18-03-02	25-10-02	02-05-02	25-01-03
	Construcción de SCARs polimórficos	210 días	28-10-02	15-08-03	04-07-02	27-05-04
28	Construcción Marcadores SCAR Polimórfico Avestruz				04-07-02	25-09-02
	Construcción Marcadores SCAR Polimórfico Ñandu				29-08-02	02-09-03
	Construcción Marcadores SCAR Polimórficos Emú (3 SCARS)				06-06-02	27-05-04
45	Verificación Herencia Marcadores SCAR por Familia	60 days	18-08-03	07-11-03	30-12-02	10-06-04
	Verificación Herencia Marcadores SCAR por Familia Avestruz				30-12-02	25-02-03
	Verificación Herencia Marcadores SCAR por Familia Ñandu				25-09-03	29-10-03
	Verificación Herencia Marcadores SCAR por Familia Emu				27-05-04	10-06-04
51	Etapa 2: Evaluación y Desarrollo Técnica de sexaje en Terreno	770 days	03-12-01	12-11-04	03-12-01	10-06-04
57	Selección de Ejemplares y formación de familias por especie	355 days	17-12-01	25-04-03	17-01-02	25-04-03
70	Selección de individuos - Avestruz	3 wks	10-11-03	28-11-03	21-01-02	30-12-02
71	Selección de individuos - Ñandú	5 wks	10-11-03	12-12-03	21-01-02	25-09-03
72	Selección de individuos - Emú	5 wks	10-11-03	12-12-03	21-01-02	27-05-04
74	Sexaje por marcadores	6 wks	19-01-04	27-02-04	30-12-02	10-06-04
77	Etapa 3: Análisis de Utilización Precomercial	286 days	10-10-03	12-11-04	01-05-03	30-08-04
78	Obj.: Evaluación y escalamiento precomercial Técnica de Sexaje	0 days	23-10-03	23-10-03	01-05-03	01-05-03
79	Coordinación Etapa 3	286 days	10-10-03	12-11-04	01-05-03	30-08-04
80	Actividades Administrativas	10 days	10-10-03	23-10-03	01-05-03	30-08-04
81	Organización Equipo de Trabajo	2 wks	10-10-03	23-10-03	01-05-03	02-05-03
82	Selección Personal	2 wks	10-10-03	23-10-03	01-05-03	02-05-03
83	Medición Parámetros	10 wks	10-11-03	16-01-04	01-05-03	30-06-05
84	Determinación de Costos	8 wks	19-01-04	12-03-04	01-05-03	01-09-03
85	Análisis del Mercado Potencial	16 wks	15-03-04	02-07-04	01-03-04	01-07-04
86	Desarrollo programa de Certificación	48 wks	15-12-03	12-11-04	01-12-03	30-12-03
87	Escalamiento precomercial Laboratorio independiente	16 wks	26-07-04	12-11-04	20-01-04	28-01-04
88	Elaboración Plan Estratégico	16 wks	26-07-04	12-11-04	30-07-04	30-08-04
89	Evaluación económica	16 wks	26-07-04	12-11-04	30-07-04	30-08-04
90	Difusión de Resultados (Manual y Seminarios)	16 wks	26-07-04	12-11-04	30-07-04	30-08-04
91	R.V.: Escalamiento precomercial evaluado	0 days	12-11-04	12-11-04	30-08-04	30-08-04
92	Etapa 4: Desarrollo Programa de cruzamientos para establecer lazos	270 days			01-12-03	10-12-04
93	Análisis de Información en Birdtruz	20 wks			01-12-03	02-05-04
	Revisión bibliográfica y elección de loci microsatélites	16 wks			01-12-03	01-04-04
	Síntesis de partidores microsatélites	4 wks			02-04-04	02-05-04
94	Toma de muestras para extracción de DNA	4 días			03-05-04	06-05-04
96	Screening de loci microsatélites	12 wks			07-05-04	06-08-04
98	Análisis de Parentesco	16 wks			06-08-04	10-12-04

OBS. FECHAS APROXIMADAS SALVO ERROR U OMISION

VII. Difusión de Resultados.

Durante el desarrollo del presente proyecto se generaron variados temas de difusión con el objeto de difundir la información generada. Entre los más destacados podemos mencionar:

- Artículo de Difusión

Artículo de difusión periodística publicado originalmente en el diario Austral suplemento Campo Sureño el día 13 de enero del 2003, el cuál posteriormente fue extractado por la página web de emusur. Se adjunta en el Anexo N°5

- Encuesta de usuarios

Se desarrolló encuesta para aplicación internacional respecto del interés de la técnica a un valor dado y la explicación de cómo acceder a ella. Se adjunta en Anexo N°6

- Página Web

Con los resultados del proyecto y la aprobación previa del FIA se publicarán los resultados en la página web www.elsectoraagricola.com/ratites.html

VIII.- Impactos del Proyecto.

Con relación a este punto, se centrará la explicación en los impactos de tipo técnico, económico y de administración propuestos originalmente en el proyecto, respecto a los resultados globales obtenidos, tanto aquellos programados como

otros derivados del desarrollo del proyecto. Al respecto, se indicarán y explicarán también impactos laterales que pudiesen darse a futuro como consecuencia de observaciones, resultados, contactos y productos relacionados, surgidos del desarrollo de la presente iniciativa.

Para mayor claridad en el desarrollo de esta parte, se analizarán en forma separada aquellos impactos obtenidos en el proyecto y aquellos otros que pudiesen derivarse en el futuro, producto de la ejecución del proyecto.

No se han generado publicaciones científicas.

Obtenidos en el proyecto

- Marcadores moleculares desarrollados

Se logró construir un marcador SCAR para cada especie de ratite los cuales amplifican en las hembras y no en los machos, consiguiendo con esto determinar el sexo. De la misma forma se constató, a través del estudio de herencia de los marcadores en familias que dichos marcadores se heredan sólo de madre a hija . -

- Técnicas de muestreo

Se estableció una técnica de muestreo fácil y rápida para poder determinar el sexo sin estresar a los animales, la cual además permite obtener DNA en forma suficiente para los análisis.

- Aplicación práctica a productores

Se desarrolló la marcha blanca del proyecto con productores de avestruces y emú, los cuales quedaron conformes con los resultados obtenidos.

- Determinación de parentesco

Se desarrolló una metodología válida para establecer relaciones de parentesco y consanguinidad al interior de los planteles de avestruz, situación que permite seleccionar reproductores en forma segura y evitar depresiones endogámicas en la población.

Pueden obtenerse en el futuro

- Generación de patentes

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible sugerir la posibilidad de obtener patentes respecto del procedimiento utilizado para la determinación del sexo en las tres especies de ratites estudiadas.

- Unidad de negocios

Es posible el funcionamiento de un laboratorio de análisis molecular que comercialice los productos derivados del proyecto, así como nuevos desarrollos relacionados.

- Nuevos empleos

Si bien el proyecto no genera directamente nuevos empleos la materialización de una unidad de negocios permitiría dar trabajo directo a tres personas de nivel técnico avanzado.

- Capacidades científicas y técnicas

La realización del proyecto generó capacidades científicas y técnicas en los partícipes del mismo lo cual permite a estos investigadores y profesionales avanzar hacia otras áreas de desarrollo. En forma específica se puede señalar que se capacitó en forma directa o indirecta a 3 técnicos de laboratorio, 2 investigadores (optando en la actualidad al grado de doctor), 2 profesionales de áreas afines, 1 tesista y 1 operario de laboratorio.

- Usuarios

A nivel de información se señala que los usuarios que pidieron información por los servicios desarrollados en forma comercial y/o a modo de consulta son:

- Agrícola AASA, fono 34-481055, Los Andes
- Sr. Luis Gasmuri, avestruces Rupanco, fono 09-1113419, Rupanco
- Emusur, Sr. Juan Guillermo Valenzuela, sin fono. Valdivia
- Sra. Fanny Cossio, avestruces Ostrich Park, 08-973093, TilTil

IX.- Conclusiones y Recomendaciones

- Se obtuvo un marcador SCAR para la identificación molecular del sexo en cada especie de ratite, diseñándose métodos sencillos de obtención de muestras y procedimientos rápidos de laboratorio que están disponibles para el sector productivo.
- Los marcadores microsatélites LI05, LI09, OSM4, OSM5, OSM6, OSM7, fueron amplificados con éxito en muestras de DNA de 35 ejemplares genealogizados de avestruces.
- La técnica de microsatélites fluorescentes resulta de gran utilidad en la identificación precisa del tamaño de los alelos de cada loci. La estrategia de utilizar loci microsatélites cuyos alelos son de tamaños distintos permite combinar los colores de los fluorocromos (azul verde y amarillo) y de esta manera examinar de conjunto los seis loci microsatélites para cada individuo.
- La diversidad alélica encontrada en este estudio permitió establecer el parentesco genético entre los individuos y contrastar estos resultados con los datos genealógicos. El 11.5% de los polluelos analizados tenían mal asignado al menos un progenitor en los registros genealógicos manejados por el plantel cuando se utilizan estos seis loci microsatélites (probabilidad de exclusión conjunta de paternidad = 98,9%). Además, nuestros resultados indican que es altamente probable que los animales progenitores de los polluelos 97, 106 y 417 no estaban presentes entre los progenitores analizados.
- El parentesco genético parece tener buena correlación con el parentesco teórico estimado desde genealogías con estos seis loci microsatélites, al

menos hasta el nivel de parentesco entre hermanos. Parece ser necesario utilizar mayor número de loci microsatélites para resolver grados menores de parentesco, como medios hermanos o primos.

- Los análisis genéticos realizados en las familias de avestruces indica que para realizar estimaciones de parámetros que requieren conocer exactamente las parejas padre-progenie, tales como el cálculo de coeficientes de endogamia, si se quiere controlar la consanguinidad, estimar heredabilidad de caracteres de importancia productiva (vender genética), es necesario realizar este tipo de análisis de paternidad/maternidad para corroborar los registros genealógicos de un plantel.
- Los resultados obtenidos nos permiten establecer que el uso de microsatélites para los análisis genéticos de parentesco constituye un método confiable para ser aplicado en planteles productivos de avestruces que deseen corroborar sus registros genealógicos o bien que no cuenten con registros genealógicos confiables.

Respecto al estudio de mercado se puede concluir lo siguiente:

- La producción de RATITES, especialmente de AVESTRUZ es un sector productivo en crecimiento que genera expectativas y donde los productores están abiertos a la aplicación de tecnología para un desarrollo acelerado.
- En este contexto, se observa interés por técnicas que permitan desarrollar su negocio, entre ellos las referidas al manejo reproductivo y genético de sus animales.
- La VENTA de animales sexados, parece ser una necesidad del negocio, así una alta proporción lo hace y los que no, lo piensan implementar.
- Actualmente los productores que venden sus animales sexados lo hacen mediante los métodos VISUAL y MANUAL, y perciben en ellos una eficiencia de 76%.

- En relación al METODO DE MARCADORES MOLECULARES, la mitad de ellos lo conoce, pero, hay una gran falta de información, a pesar de ello genera una ALTA INTENCIÓN PARA SU APLICACIÓN, porque se percibe MÁS EFICIENTE Y SEGURA.
- El precio de \$5.300 para su aplicación, está por sobre las expectativas de precio para la aplicación de la técnica en una proporción relevante de los productores.
- Así el 86 % de intención positiva para su aplicación sin conocimiento de precio, cae a un 60% al evaluar un precio de \$5.300.
- La técnica al precio evaluado, aparece con mayor potencial de aceptación entre productores que actualmente venden sus animales sexados.
- Los servicios para el manejo genético, son de interés especialmente la SELECCIÓN por características productivas, sin embargo, 1 UF por contar con el servicio, también aparece como una barrera a su adopción.
- Los pequeños productores, son menos sensibles a los precios presentados, tanto para la Técnica de Sexaje mediante Marcadores Moleculares, como para los Servicios de Manejo Genéticos, lo que indica, que son un segmento de alta potencialidad para la implementación de estas herramientas, ellos están iniciando su negocio y tienen altas expectativas de crecimiento.
- La TECNICA de SEXAJE mediante marcadores moleculares, tiene una buena aceptación potencial, pero requiere de DIFUSION, para dar a conocer sus beneficios, especialmente aquellos que la diferencian de los métodos de uso ACTUAL, y un estudio más acabado en relación a su precio.

•

X.- Otros Aspectos de Interés

En el marco del proyecto se diseñó un sistema de detección del SCAR DnG9 en emú que permite simultáneamente utilizar un segundo marcador común para machos y hembras como control de la calidad del DNA.

Un método de sexaje basado en PCR aprovecha las ventajas de esta técnica, como su sensibilidad y reproducibilidad, junto con la conveniencia de trabajar con DNA, el cual se puede obtener de pequeñas cantidades de diversos tipos de tejido. Además, este tipo de técnica permite el análisis de una gran cantidad de muestras al mismo tiempo reduciendo los costos y el tiempo con respecto a análisis individuales. El PCR se utiliza usualmente para amplificar un marcador asociado a un rasgo de interés, por lo que se requiere más de una reacción cuando se desea obtener información de otros marcadores.

Una manera de mejorar este procedimiento es por medio de un PCR múltiple ("Multiplex PCR"), el cual consiste en la amplificación simultánea de dos o más marcadores en un mismo individuo. Un caso especial donde esta estrategia es particularmente útil, es cuando se trabaja con un marcador de presencia y ausencia (como un marcador SCAR) y se requiere verificar la calidad del DNA. En este caso se necesita un marcador que amplifique en todos los individuos de manera de descartar la ausencia del marcador de interés por una falla en la extracción de DNA. Considerando las ventajas de este método se desarrolló un protocolo de PCR múltiple para amplificar el marcador SCAR DnG9 junto a un marcador que amplifica tanto en machos como hembras. El protocolo se optimizó siguiendo las sugerencias de Henegariu et al. (1997), quienes estudiaron los principales factores y condiciones que afectan este tipo de reacciones.

Metodología

El PCR múltiple para el sexaje de emú se desarrolló a partir del protocolo utilizado para amplificar el SCAR DnG9. Se probaron varios partidores en

combinación con los del SCAR en muestras de DNA de machos y hembras de emú extraídas con fenol. Los partidores que se ensayaron fueron los Dn70 y Dn230, que se diseñaron en este proyecto como marcadores SCAR pero que amplifican tanto en machos como hembras, y los partidores EE06, que permiten amplificar una región de los cromosomas sexuales en aves (Itoh et al., 2001). La combinación con la cual se obtuvieron mejores resultados fue DnG9-EE06.

El siguiente paso fue la optimización del protocolo del PCR múltiple. Se realizaron varias modificaciones al protocolo del SCAR DnG9 incluyendo las cantidades de reactivos y el perfil térmico del PCR. Se probaron distintas concentraciones de MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa y partidores. También se probaron varias temperaturas de annealing y programas con distinto número de ciclos de reacción. Los cambios más significativos en la amplificación de ambos marcadores se produjeron al modificar las cantidades relativas de los partidores. Estas concentraciones se ajustaron hasta obtener bandas de la misma intensidad para ambos marcadores.

El protocolo optimizado del PCR múltiple es el siguiente:

A) Mezcla de reacción:

Reactivo	μL
H ₂ O	10,8
Buffer (10X)	2,0
MgCl ₂ (50mM)	0,8
dNTPs (10mM)	0,35
partidores DnG9 (10μM)	0,25 c/u
partidores EE06 (10μM)	0,35 c/u
Taq polimerasa (5U/μL)	0,35
DNA (6ng/μL)	4,6

B) Programa de amplificación:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 minutos
2	92	50 segundos
3	64	1 minuto

4	72	1 minuto
5	ir al paso 2, 30 veces	
6	72	10 minutos
7	10	infinito

Resultados

Se obtuvo una amplificación simultánea de los marcadores DnG9 y EE06 de modo que los machos de emú presentan solo la banda correspondiente al marcador EE06 y las hembras dos bandas que corresponden a ambos marcadores. Los tamaños de las bandas son aquellas observadas en la amplificación de cada marcador por separado.

En la Figura 5 se observa la amplificación del PCR múltiple en dos machos y dos hembras de emú (muestras de DNA extraídas con fenol con una concentración de 6ng/ μ L) bajo dos condiciones de reacción.

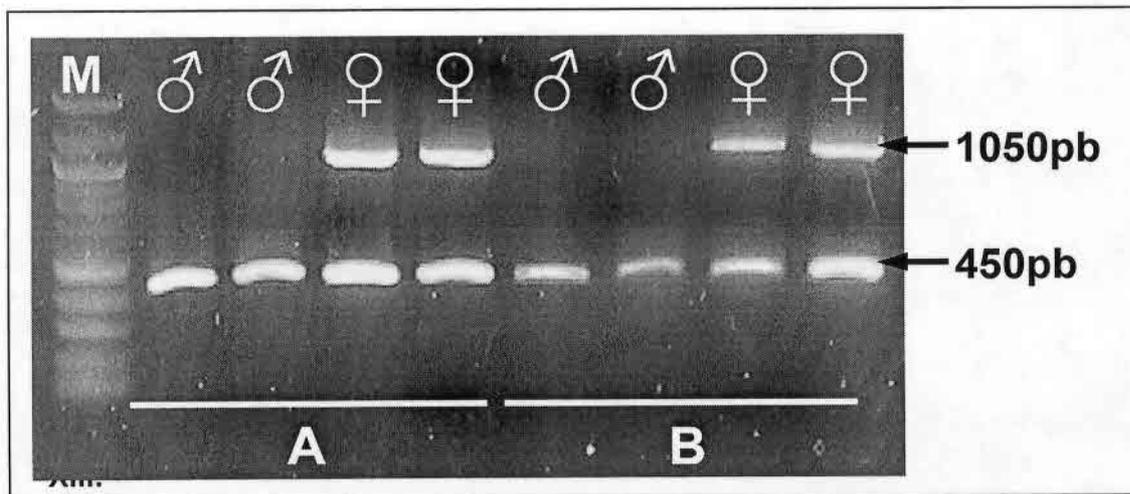


Figura 28. Amplificación de PCR múltiple en machos y hembras de emú utilizando dos temperaturas de annealing: A) 64°C, B) 65°C. M: marcador de peso molecular; pb: pares de bases.

Bibliografía

Danzmann, R.G. 1997. PROBMAX: a computer program for assigning unknown parentage in pedigree analysis from known genotypic pools of parents and progeny. *J Hered* 88: 333.

Henegariu, O., N. A. Heerema, S. R. Dlouhy, G. H. Vance y P. H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques* 23: 504-511.

Itoh, Y., M. Suzuki, A. Ogawa, I. Munechika, K. Murata y S. Mizuno. 2001. Identification of the Sex of a Wide Range of Carinatae Birds by PCR Using Primer Sets Selected from Chicken EE0.6 and Its Related Sequences. *J. Heredity* 92(4): 315-321.

Kimwele, C., Graves, J. 2003. A molecular genetic analysis of the communal nesting of the ostrich (*Struthio camelus*). *Mol. Ecol.* 12:229-236.

Lynch, M., Ritland, K. 1999. Estimation of a pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152:1753-1766.

Marshall T., Slate J., Kruuk, L, Pamberton, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol* 7:639-655.

Queller, D., Goodnight, K. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.

Wright, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *Am. Nat.* 56:330-339.

ANEXO 1

Ficha Costos Detallada

ESTRUCTURA DE COSTOS

ITEM	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR UNITARIO (\$)	COSTO (\$)
MUESTRAS DE SANGRE				
TUBO EPPENDORF	unidad	1,00	\$ 12,98	\$ 12,98
TIRA PAPEL WATMAN	unidad	3,00	\$ 0,12	\$ 0,36
SUB-TOTAL				\$ 13,34
EXTRACCION DNA				
QUELEX	gramos	0,15	\$ 8,88	\$ 1,33
TUBO EPPENDORF	uso caja	1,00	\$ 12,98	\$ 12,98
CAJA ALMACENAJE	uso caja	1,00	\$ 11,00	\$ 11,00
PUNTAS	uso caja	2,00	\$ 7,49	\$ 14,98
TBE	gramos	0,50	\$ 47,50	\$ 23,75
SUB-TOTAL				\$ 64,04
PCR SCAR				
SINTESIS PARTIDORES	servicio pb	2,00	\$ 0,98	\$ 1,96
TAQ	microlitro	1,00	\$ 136,40	\$ 136,40
DNTPS	microlitro	0,15	\$ 180,00	\$ 27,00
AGUA	microlitro	7,00	\$ 0,06	\$ 0,42
PUNTAS	unidad	10,00	\$ 7,49	\$ 74,90
MARKER	set	1,00	\$ 193,00	\$ 193,00
BUFFER DE CARGA	microlitro	2,50	\$ 2,00	\$ 5,00
AGAROSA	miligramo	0,04	\$ 980,00	\$ 39,20
TBE	mililitro	6,00	\$ 47,50	\$ 285,00
FOTO	unidad	1,00	\$ 20,00	\$ 20,00
BROMURO DE ETIDIO	mililitro	1,00	\$ 60,00	\$ 60,00
SUB-TOTAL				\$ 842,88
RECURSOS HUMANOS				
ESPECIALISTA	Hora hombre	0,10	\$ 15.000,00	\$ 1.500,00
TECNICO DE LABORATORIO - EXTRACCION DNA	Hora hombre	1,00	\$ 1.750,00	\$ 1.750,00
TECNICO DE LABORATORIO - PCR SCAR	Hora hombre	0,50	\$ 1.750,00	\$ 875,00
TECNICO DE LABORATORIO - GEL	Hora hombre	0,25	\$ 1.750,00	\$ 437,50
TECNICO DE LABORATORIO - CARGAR GEL	Hora hombre	0,03	\$ 1.750,00	\$ 58,33
SUB-TOTAL				\$ 4.620,83
USO DE EQUIPOS				
BOTELLA		2.000	\$ 10.000	\$ 5,00
VASO PRECIPITADO		2.000	\$ 3.800	\$ 1,90
GRADILLA		2.000	\$ 6.900	\$ 3,45
MAQUINA FOTOGRAFICA		10.000	\$ 120.000	\$ 12,00
TERMOCICLADOR		960.000	\$ 4.200.000	\$ 4,38
CAMARA ELECTROFORESIS		960.000	\$ 460.000	\$ 0,48
SUB-TOTAL				\$ 27,21
COSTO UNITARIO ANALISIS PCR				\$ 5.568,30

USO DE EQUIPOS	VALOR EQUIPO \$	SERVICIOS VIDA UTIL unidad	ANALISIS POR BATERIA unidad	COSTO POR USO \$
BOTELLA	10.000	2.000	1	5,00
VASO PRECIPITADO	3.800	2.000	1	1,90
GRADILLA	6.900	2.000	1	3,45
MAQUINA FOTOGRAFICA	120.000	10.000	1	12,00
TERMOCICLADOR	4.200.000	10.000	96	4,38
CAMARA ELECTROFORESIS	460.000	10.000	96	0,48

ANEXO 3

Análisis Estratégico y Plan de Marketing

Tabla de Contenidos

1. RESUMEN	2
2. TAMAÑO DEL MERCADO	3
3. COMPETENCIA IDENTIFICADA	4
A.- ESPAÑA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA, SERVICIOS INTEGRADOS DE GENÓMICA Y PROTEÓMICA (SIGIP)	4
B.- ESTADOS UNIDOS, UNIVERSITY OF ILLINOIS CAPITOL ILLINI VETERINARY SERVICES IN SPRINGFIELD	5
C.- REINO UNIDO, GREENDALE VETERINARY DIAGNOSTICS.	6
D.- ESTADOS UNIDOS, VITATECH, "THE AVIAN & RATITE TESTING SERVICE"	7
4. FORMA DE ABORDAR LA OPORTUNIDAD	9
5. RECURSOS COMPROMETIDOS	10
6. VENTAJAS QUE PRESENTA LA EMPRESA PARA SER EXITOSA EN EL NEGOCIO	12
7. RESULTADOS FINANCIEROS	13
8. ANEXO: INFORMACIÓN DE COMPETENCIA IDENTIFICADA	19

Análisis Estratégico y Plan de Marketing Servicio Sexaje de Ratites

1. Resumen

El negocio a desarrollar contempla el servicio de sexaje de ratites mediante marcadores moleculares y la evaluación de consanguinidad o parentesco a nivel de criaderos de estas aves. El canal de comercialización considera el funcionamiento de un laboratorio como unidad autónoma, el cual realiza difusión y venta de los servicios a través de un vendedor que presente el servicio a los veterinarios o profesionales encargados de los criaderos, y la empresa, no existen más intermediarios en el negocio. El ámbito del negocio es nacional para los servicios de sexaje e internacional para los de consanguinidad.

El servicio contempla el envío de un kit de toma de muestra al productor nacional interesado, quien debe enviar la muestra por correo al laboratorio. Luego el análisis realizado a nivel de laboratorio y el envío del resultado del análisis a través de la red o de correo. .

Actualmente el sexaje de ratites a nivel nacional, se realiza en forma visual o manual, lo que tiene una eficiencia del 75%. La cual puede aumentar a más de un 99% si se utiliza la técnica de sexaje molecular.

2. Tamaño del Mercado

El mercado del sexaje de ratites a nivel nacional está conformado por los criaderos de avestruces, quienes estarán interesados en conocer tempranamente el sexo de sus aves, lo que les permitirá seleccionar los animales que quedarán para reproductores, y vender reproductores de poca edad, adecuadamente sexados.

Para la estimación del tamaño de mercado se utilizó como base los datos recolectados de entrevistas realizadas a los principales productores de ratites a nivel nacional, en la cual se contactaron 22 productores.

Del total de productores, 2 eran productores de Emú y tenían 5 hembras cada uno; y 20 productores eran criaderos de avestruces, estos tenían un promedio de 126 animales cada uno, de los cuales el 33% eran reproductores, es decir 42 reproductores por criadero. Si consideramos que mantienen sus reproductores en trío, existe un total de 28 hembras promedio por productor.

Lo anterior se traduce en 20 hembras reproductoras de Emú y 560 hembras reproductoras de Avestruces.

Bajo el supuesto de que los productores estarán interesados en sexar un 30% de los pollos nacidos para dejarlos como reproductores, ya sea como reemplazo de su criadero o para vender; y que cada hembra produce 30 pollos vivos al año para el caso de las avestruces, y 40 pollos vivos al año para el caso de los emú; se obtiene una demanda anual de:

- $20 \times 40 \times 30\% \rightarrow 240$ servicios de sexaje para el caso de los Emú.
- $560 \times 30 \times 30\% \rightarrow 5.040$ servicios de sexaje para el caso de las Avestruces

3. Competencia Identificada

La competencia identificada para el producto desarrollado a nivel nacional está conformada por los métodos usados actualmente para detección de sexo, manual y visual, los que tienen una eficiencia menor al 75%, por lo que pueden ser descartados como competencia directa o de importancia para el servicio a ofrecer. Por otra parte está la empresa DIAGNOTEC, que se dedica a trabajar en screening para animales y vegetales, pero no se encontraron antecedentes que indiquen que esté desarrollando el servicio de sexaje de ratites por marcadores moleculares.

A nivel internacional existen institutos, universidades y laboratorios que están aplicando la técnica de marcadores moleculares para sexaje en ratites, y algunos ofrecen el servicio.

Dentro de la búsqueda realizada se encontraron 4 empresas que ofrecen el servicio de sexaje, las cuales se describen a continuación:

a.- España, Universidad Autónoma de Barcelona, Servicios Integrados de Genómica y Proteómica (SIGIP)

El servicio, integrado dentro de los Servicios Integrados de Genómica y Proteómica (SIGIP), ofrece técnicas genéticas de diagnóstico veterinario mediante el análisis de DNA, tanto a grupos de la UAB como a profesionales o empresas del sector. El SVGM realiza pruebas de paternidad y de identificación genética en distintas especies animales. Ha desarrollado marcadores moleculares para el sexaje de aves así como para diagnosticar patologías hereditarias o infecciosas en animales de renta, compañía y fauna salvaje. Dispone de protocolos para PCR que permiten la determinación y presencia de resto animales en alimentos, muestras de matadero y piensos para controles de calidad y fraude. Ha

desarrollado técnicas para la detección de genes de interés en especies animales (microsatélites, SNP y AFLP).

Servicios que ofrece:

- Identificación individual (Fingerprinting) y Pruebas de Paternidad mediante el análisis del DNA en distintas especies de mamíferos y aves (rumiantes, equinos, animales de compañía, organismos marinos y fauna salvaje). Verificación de pedigrís y control de filiaciones por DNA
- Identificación y diagnóstico por PCR de patologías hereditarias de tipos monogénicos en especies domésticas
- Identificación y genotipado por PCR de genes de interés en especies animales
- Determinación del sexo por PCR en ratites
- Diagnóstico por PCR de Leishmaniosis canina y felina
- Determinación del origen animal por PCR (alimentos, muestras de matadero, ...)
- Detección por PCR de restos animales en piensos (bovino, ovino, ganado cabrío, porcino, aves).

b.- Estados Unidos, University of Illinois Capitol Illini Veterinary Services in Springfield

Para conocer el sexo de un ave, específicamente de un ratite, se puede llevar una muestra de sangre para un análisis sanguíneo a un centro veterinario. Este centro o clínica veterinaria recibe un kit para colección de sangre, gratis por parte de P.E.-Aggen.

El kit incluye un tubo de capilaridad para hematocrito y un agente preservador para el envío.

El costo de la visita a la clínica de springfield para un análisis sanguíneo es de 34 dólares. P.E.-Aggen cobra 20 dólares para correr el test en su laboratorio, pero la clínica cobra 20 dólares adicionales para cubrir los costos de envío y manejo.

Los resultados se reciben dentro de 24 a 48 horas luego que P.E.-Aggen recibe la muestra.

Por lo tanto los costos totales para determinar el sexo de un ave sería por lo menos de 74 dólares en la Clínica Veterinaria "Capitol Illini Vet Clinic"

c.- Reino Unido, Greendale Veterinary Diagnostics.

Dentro de este centro veterinario de diagnóstico, existe un laboratorio dedicado exclusivamente a especies exóticas, el cual fue creado para mejorar y apoyar el cuidado de estas especies.

Además del laboratorio de rutina, cuenta con un laboratorio de "referencia" en el cual se mantienen y archivan muestras y resultados que puedan ser útiles para investigaciones futuras. El servicio incluye una asesoría integral de crianza, cuidados, epidemiología, control de enfermedades y técnicas terapéuticas, que pueden ser programadas según cada requerimiento.

Dentro de las especies estudiadas en este laboratorio se encuentran:

Emú, Tortuga gigante, tortuga griega, kiwi, avestruz, pingüinos, tortugas terrestres, tortugas de agua, patos y terrapines.

El servicio de identificación de sexo de ratites mediante muestra de pluma o sangre, toma entre 3 y 7 días desde que la muestra llega al centro de diagnóstico y tiene un costo de 57 dólares por muestra.

d.- Estados Unidos, VITATECH, “The Avian & Ratite Testing Service”

Se especializa en sexaje por ADN y análisis de paternidad de prácticamente todas las especies de aves, incluyendo especies exóticas, pollos y ratites.

El sexaje por ADN puede realizarse por muestras de sangre, o mediante muestras de plumas. Para el caso de análisis de paternidad solo se aceptan muestras de sangre.

Para la toma de muestras en ratites se deben seguir los siguientes procedimientos:

a) Muestra de Sangre uso de Tarjeta “Easy Card”

- Escriba el número identificador del ave en la tarjeta. La mejor parte para tomar muestra de sangre es la punta del ala. Primero se debe limpiar el área con alcohol y dejar secar un poco.
- Corte la punta del ala con un cortaúñas que permita una pequeña salida de sangre, puede apretar el ala en forma intermitente para acelerar la salida de sangre. Debe limpiar el cortaúñas entre ave y ave.
- Deje que salga algo de sangre. Cuidadosamente toque la sangre con la punta de la tarjeta hasta que la sangre llegue a la línea punteada. Repita para la otra punta. Evite tocar el punto de sangre. Muestrée solo un ave por tarjeta.
- Asegure que la tarjeta esté completamente seca, dejándola a temperatura ambiente por 30 minutos. Una vez que esté seca guárdela en el sobre entregado. Ponga solo una tarjeta por sobre.
- Una vez que las tarjetas están secas y guardadas en su sobre, los sobres pueden ser cerrados y enviados por correo. Incluya información de identificación en las tarjetas y en el formulario de envío. Guarde las tarjetas a temperatura ambiente y en lugar seco.

b) Recolección de plumas

- Las plumas deberán ser arrancadas del ave. La punta de la pluma que está unida a la piel deberá estar presente en la pluma arrancada. La pluma debe ser poco manipulada y estar lo más limpia posible.
- El mejor lugar para arrancar las plumas es de un lado del pecho al frente del ala. Arranque 10 a 15 plumas por ave y guárdelas en una bolsa ziploc. Anote el número de identificación del ave en la bolsa con un marcador permanente.
- Envíe la muestra a VITATECH Inc por correo, courier, etc.

El costo del servicio para residentes estadounidenses es de 20 dólares por muestra, y de 25 dólares para residentes en Canadá.

4. Forma de Abordar la Oportunidad

En base al estudio de investigación desarrollado se puede observar una demanda por estos servicios, la cual no es demasiado inflexible y es altamente sensible a condiciones de precio. En base al sondeo muy pocos productores nacionales estarían dispuestos a pagar más de 10 dólares por cada muestra ya que el costo de contratar a un veterinario con una certeza del 75% (3 aciertos entre 4 aves testeadas) es la visita (alrededor de 150 dólares). De esta forma productores grandes asumen que prefieren muestrear de esta forma lotes de 20 aves y más. Productores pequeños en cambio ven en ésta técnica una herramienta al alcance para pocas muestras (costo marginal respecto al beneficio reportado).

En el caso del servicio de consanguinidad o parentesco se puede señalar que este despierta mucho interés en los productores más grandes y con mayor tiempo en el negocio, ya que debido al escaso número de reproductores iniciales desde el cuál se dio inicio a la explotación comercial en el país, se produce una alta tasa de consanguinidad y por consiguiente una depresión endogámica que reduce el potencial productivo de las aves (postura, incubabilidad, deformaciones, etc.). Si bien el concepto es extraño para la mayoría de los productores, es una realidad que se aproxima y si el negocio de la carne y cuero despega la posibilidad de contar con estos análisis será vital. La experiencia del salmón, es un ejemplo típico. Chile debido a su condición sanitaria no puede importar ovas desde cualquier país y ha debido generar programas de selección a nivel nacional, donde recién se está comenzando con este tipo de análisis para identificar parentesco en forma adecuada.

Adicionalmente la posibilidad de contar con un laboratorio de análisis para este nicho abre la posibilidad de generar nuevas búsquedas tanto para características productivas o para enfermedades u otros servicios. De esta forma la posibilidad de montar un laboratorio de genética molecular para análisis específicos, permite derivar a nuevas especies y/o servicios dentro del sector.

De esta forma la propuesta analizada considera el montaje de un laboratorio de análisis molecular para ratites y no considera otros programas. Como se presenta más adelante los ingresos del sistema si bien generan utilidad son limitados como negocio, siendo de una escala muy reducida y por ende permite la búsqueda de estos nuevos nichos.

El plan de negocios propuesto se basa en el montaje del laboratorio de análisis como una unidad independiente, ya sea en alguno de los agentes asociados (Universidades o By tech) o como una unidad de negocios nueva. Considera el desarrollo de un plan de acción orientado a informar y orientar a la totalidad de los criaderos nacionales de los análisis disponibles, las ventajas técnicas y económicas de contar con dichos servicios y la posibilidad de enviar muestras en forma permanente durante el año. A nivel internacional se pretende generar información técnica en la web, mailing directo a la base de datos de asociaciones de productores de ratites, respuestas rápidas y ágiles ya sea a través de servicios courier o vía internet.

5. Recursos comprometidos

Los recursos con los cuáles se debe contar para el escalamiento del proyecto se refieren a:

Recursos Humanos:

- Investigador Principal: responsable de la dirección y supervisión del trabajo de laboratorio, certificados y soporte técnico del proyecto. Debido al grado de relevancia es deseable un compromiso societario con la iniciativa o en caso de permanecer en las universidades, la posibilidad de contar con royaltie a los análisis generados.

- Personal de laboratorio: personal de nivel técnico de dominio acabado de las técnicas de aislación, screening, PCR, etc, bajo supervisión directa del investigador principal.
- Personal de administración y marketing: responsable de la difusión, ventas y búsqueda de nuevas alternativas de negocios, será el encargado de ejecutar las políticas de crecimiento que se requieran, la administración legal y contable.

Recursos económicos

- Laboratorio de análisis: la presente iniciativa requiere de los equipos y utensilios desglosados en el ítem correspondiente (ver fichas más adelante), los cuáles tienen asignado un valor de uso para el proyecto. No se considera la posibilidad de compra desde el inicio, sino más bien la de uso, debido al perfil de los agentes involucrados. Considera la mantención en comodato de los equipos pertenecientes a FIA.
- Capital de Trabajo: se requiere capital de operación por un año y tres meses de operación, el cuál se detalla en los cuadros de flujo consignados más adelante. El monto asciende a MM\$ 22,8 los cuáles representan el capital de trabajo de la iniciativa.
- Infraestructura: la propuesta considera el arriendo de un espacio físico para el montaje y operación del laboratorio, con un adecuado grado de independencia y con las habilitaciones y permisos correspondientes.
- Página Web: la propuesta considera la creación y mantención de un sitio web en dos idiomas, en el cual se difundirán los aspectos técnicos y comerciales de la iniciativa.

6. Ventajas que Presenta la Empresa para ser Exitosa en el Negocio

Este punto debe ser abordado en forma exhaustiva previo al inicio del desarrollo del proyecto, ya que uno de los puntos críticos del éxito del mismo es la capacidad y experiencia de la empresa. En general además de las capacidades técnicas y financieras de la empresa se debe reconocer cuáles serán las principales fortalezas de la iniciativa:

- **Producto:** la iniciativa cuenta con un set de marcadores para ratites que le permiten en forma única brindar servicios de sexaje y parentesco, así como escalar a nuevos requerimientos, tales como servicios de búsqueda de características específicas y productos adicionales (venta de genética, asesoría directa a criaderos, etc.).
- **Capacidad de innovar:** la iniciativa cuenta con la capacidad de orientarse a la búsqueda de soluciones específicas en diversas áreas de la producción animal, tales como uso y aplicación de marcadores específicos en la industria ganadera y lechera, representación de marcas extranjeras, servicios de screening para infinidad de especies animales, etc.
- **Capacidad de Respuesta:** el conocimiento de la problemática productiva comercial y el equipo de trabajo permite reaccionar en forma muy rápida a los requerimientos, pudiendo entregar resultados de análisis en 48 horas. De esta forma se puede responder a las inquietudes de los clientes en el momento en que tienen el problema.
- **Alcance nacional e internacional:** debido a las características de las soluciones ofrecidas se puede en forma ágil llegar a cualquier punto del país que estén bajo cobertura de algún servicio courier, incluso a nivel internacional.
- **Conocimiento y contacto con los principales consumidores:** el grado de conocimiento del mercado de los agentes participantes, así como el

prestigio que poseen les permiten poder llegar a un sinnúmero de potenciales clientes.

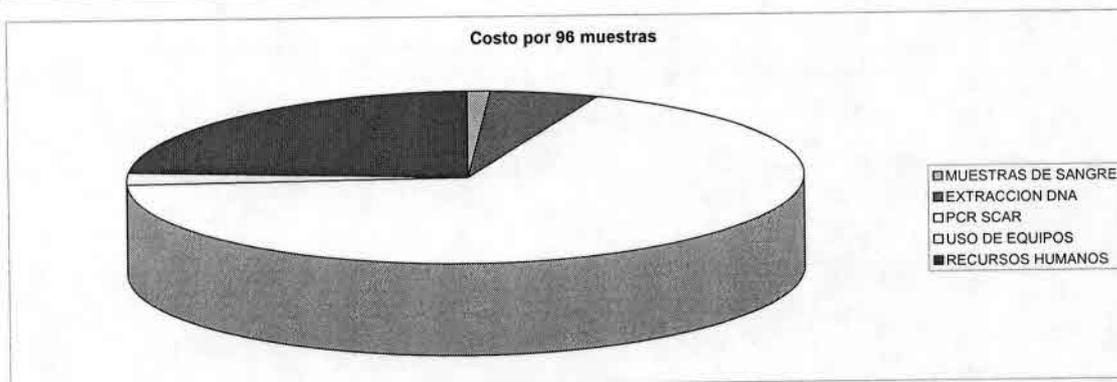
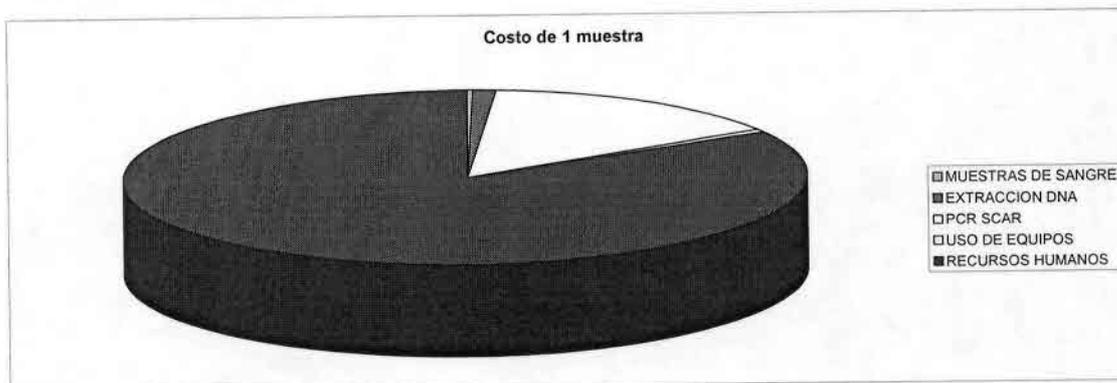
7. Resultados Financieros

En base a los análisis desarrollados y el trabajo del equipo técnico se puede señalar que los costos unitarios de cada servicio están representados por el valor de aplicación de la técnica desarrollada, desglosada en costos variables unitarios los cuáles se presentan en el siguiente cuadro:

ESTRUCTURA DE COSTOS				
ITEM	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR UNITARIO (\$)	COSTO (\$)
MUESTRAS DE SANGRE				
TUBO EPPENDORF	unidad	1	12,98	12,98
TIRA PAPEL WATMAN	unidad	3	0,12	0,36
SUB-TOTAL				13,34
EXTRACCION DNA				
QUELEX	gramos	0,15	8,88	1,332
TUBO EPPENDORF	unidad	1	12,98	12,98
CAJA ALMACENAJE	costo de uso	1	11	11
PUNTAS	unidad	2	7,49	14,98
TBE	gramos	0,5	47,5	23,75
SUB-TOTAL				64,042
PCR SCAR				
SINTESIS PARTIDORES	servicio pb	2	0,98	1,96
TAQ	microlitro	1	136,4	136,4
DNTPS	microlitro	0,15	180	27
AGUA	microlitro	7	0,06	0,42
PUNTAS	unidad	10	7,49	74,9
MARKER	set	1	193	193
BUFFER DE CARGA	microlitro	2,5	2	5
AGAROSA	miligramo	0,04	980	39,2
TBE	mililitro	6	47,5	285
FOTO	unidad	1	20	20
BROMURO DE ETIDIO	mililitro	1	60	60
SUB-TOTAL				842,88
USO DE EQUIPOS (ver adjunto)				
BOTELLA	costo de uso	2000	10000	5
VASO PRECIPITADO	costo de uso	2000	3800	1,9
GRADILLA	costo de uso	2000	6900	3,45
MAQUINA FOTOGRAFICA	costo de uso	10000	120000	12
TERMOCICLADOR	costo de uso	10000	4200000	4,38
CAMARA ELECTROFORESIS	costo de uso	10000	460000	0,48
SUB-TOTAL				27,20416667
RECURSOS HUMANOS				
ESPECIALISTA	hora hombre	0,1	15000	1.500
TECNICO DE LABORATORIO - EXTRACCION DNA	hora hombre	1	1750	1.750
TECNICO DE LABORATORIO - PCR SCAR	hora hombre	0,5	1750	875
TECNICO DE LABORATORIO - GEL	hora hombre	0,25	1750	438
TECNICO DE LABORATORIO - CARGAR GEL	hora hombre	0,03	1750	58
SUB-TOTAL				4.621
COSTO UNITARIO				5.568

USO DE EQUIPOS	VALOR EQUIPO \$	SERVICIOS VIDA UTIL unidad	ANALISIS POR BATERIA unidad	COSTO POR USO \$
BOTELLA	10.000	2.000	1	5,00
VASO PRECIPITADO	3.800	2.000	1	1,90
GRADILLA	6.900	2.000	1	3,45
MAQUINA FOTOGRAFICA	120.000	10.000	1	12,00
TERMOCICLADOR	4.200.000	10.000	96	4,38
CAMARA ELECTROFORESIS	460.000	10.000	96	0,48

De esta forma es posible tener costos unitarios competitivos (cerca de los 10 dólares) por cada marcador aplicado. Si se observa el desglose de costos se puede señalar que lo relevante de cada análisis son los costos de recursos humanos los cuales son muy altos para muestras individuales. Sin embargo debido a la capacidad de los equipos disponibles, es posible reducirlos desde los \$5.628 a \$1.051 para baterías de análisis de más de 100 unidades. Esto último es posible debido a que los tiempos muertos de los equipos influyen en el costo total del sistema.



En base al estudio de mercado nacional desarrollado y al análisis del mercado internacional a continuación se presenta el tamaño del mercado potencial

SUPUESTOS DEL MERCADO				
PARAMETROS ESTIMACION MERCADO OBJETIVO				
MERCADO POTENCIAL	ANALISIS		% DEL MERCADO	TOTAL ESTIMADO
	NACIONAL	INTERNACIONAL		
ANÁLISIS AVESTRUZ	5.040	0	30	1.512
ANÁLISIS EMU	240	0	30	72
ANÁLISIS ÑANDÚ	100	0	30	30
SERVICIOS CONSANGUINIDAD AVESTRUZ	100	10	30	40
SERVICIOS CONSANGUINIDAD EMU	100	10	30	40
Total	5.580	20		1.694

Se pretende abarcar el 30% del mercado potencial de acuerdo a los datos consultados. Si bien el número de muestras es bastante escaso, y el acceso al mercado internacional es casi despreciable, en base a estos datos es posible estructurar un análisis de costos como empresa base (sin considerar otros servicios, desarrollos, etc.).

ESTRUCTURA ANUAL DE COSTOS AÑO ESTABILIZADO
MODALIDAD EVALUACION: COSTO-BENEFICIO PURO

	UNIDAD	CANTIDAD	\$/Unid.	TOTAL (\$)
Ingresos				37.201.250
ANÁLISIS AVESTRUZ	análisis	1.512	14.375,00	21.735.000
ANÁLISIS EMU	análisis	72	14.375,00	1.035.000
ANÁLISIS ÑANDÚ	análisis	30	14.375,00	431.250
SERVICIOS CONSANGUINIDAD AVESTRUZ	servicio	40	175.000,00	7.000.000
SERVICIOS CONSANGUINIDAD EMU	servicio	40	175.000,00	7.000.000
		2.894,00		
				-2.663.238
Costos Variables				
MUESTRAS DE SANGRE				
TUBO EPPENDORF	unidad	2.894,00	12,9800	-37.564
TIRA PAPEL WATMAN	unidad	8.682,00	0,1200	-1.042
EXTRACCION DNA				
QUELEX	gramos	434,10	8,8800	-3.855
TUBO EPPENDORF	unidad	2.894,00	12,9800	-37.564
CAJA ALMACENAJE	costo uso	2.894,00	11,0000	-31.834
PUNTAS	unidad	5.788,00	7,4900	-43.352
TBE	gramos	1.447,00	47,5000	-68.733
PCR SCAR				
SINTESIS PARTIDORES	servicio pb	5.788,00	0,9800	-5.672
TAQ	microlitro	2.894,00	136,4000	-394.742
DNTPS	microlitro	434,10	180,0000	-78.138
AGUA	microlitro	20.258,00	0,0600	-1.215
PUNTAS	unidad	28.940,00	7,4900	-216.761
MARKER	set	2.894,00	193,0000	-558.542
BUFFER DE CARGA	microlitro	7.235,00	2,0000	-14.470
AGAROSA	miligramo	115,76	980,0000	-113.445
TBE	mililitro	17.364,00	47,5000	-824.790
FOTO	unidad	2.894,00	20,0000	-57.880
BROMURO DE ETIDIO	mililitro	2.894,00	60,0000	-173.640
				34.538.012
Margen Bruto				-25.176.088
Costos Fijos				
ESPECIALISTA	hora hombre	1,00	1.000.000	-12.000.000
TECNICO DE LABORATORIO	hora hombre	1,00	300.000	-3.600.000
USO DE INFRAESTRUCTURA	costo de uso	1,00	150.000	-1.800.000
USO DE EQUIPOS	costo de uso	1,00	150.000	-1.800.000
MANTENCIÓN DE EQUIPOS	porcentaje	0,04	4.800.700	-192.028
ADMINISTRACIÓN	servicio	1,00	400.000	-4.800.000
COSTO DE VENTA	servicio	0,01		-372.013
MARKETING	servicio	0,01		-372.013
DEPRECIACION	porcentaje	20,00	4.800.700	-240035
				9.361.924
Margen operacional				-1.591.527
Impuesto	tasa	0,17		
				7.770.397
Margen D.I.				240.035
Depreciación	porcentaje			
				8.010.432
Flujo Neto				

El análisis genera un escenario bastante limitado, el cual genera un flujo anual de MM\$ 8,0 después de impuestos, lo que se genera por el escaso volumen de análisis que se puede vender de acuerdo a los datos del estudio de mercado. Sin

embargo y bajo un escenario de evaluación conservador se puede evaluar el proyecto a cinco años de la siguiente forma.

FLUJO ANUAL DEL PROYECTO - EVALUACIÓN ECONÓMICA

	0	1	2	3	4	5
FLUJO ANUAL						
Inversión Inicial	- 4.800.700					23.807.263
Capital de Operación	- 21.144.025	- 2.663.238				1.200.175
Valor Residual						8.010.432
Utilidad Neta		4.005.216	8.010.432	8.010.432	8.010.432	8.010.432
Flujo	- 25.944.725	1.341.978	8.010.432	8.010.432	8.010.432	33.017.870
TIR		23%				
VAN		9.970.539				

El monto de inversión inicial se refiere a los equipos (ver estructura de costos) y el capital de trabajo u operación al funcionamiento de 1 año tres meses hasta comenzar la venta de análisis. Como ya se ha mencionado no considera la venta de otros servicios y está muy acotado a los datos arrojados por el estudio de mercado. El VAN del proyecto es de MM\$ 9,97 y la TIR de 23%, lo que lo hace un negocio atractivo de acuerdo a los parámetros normales pero con un tamaño muy pequeño. De esta forma el interés que pueda surgir por el desarrollo de esta iniciativa estará condicionado, a nuestro entender, a las siguientes situaciones:

- Universidades: acoplarse a alguna unidad de servicios de análisis similares existentes o generar una nueva unidad en pos de dar impulso a nuevas alternativas que se produzcan bajo el alero del proyecto. Se debe tener presente que es una unidad pequeña que se autosustenta y genera excedentes.
- Laboratorios: puede servir de base para el escalamiento hacia nuevos nichos de mercados. Sólo se constituye en alternativa para aquellos que cuentan con el personal idóneo o la capacidad de generarlo.
- Empresas agrícolas o de ratites: no presentan ninguna ventaja estratégica ni genera un volumen de negocio atractivo, por ende no califican dentro de las candidatas.
- Incubadoras de Negocio: debido al alto grado de innovación y desarrollo tecnológico involucrado, puede ser una excelente idea para desarrollar en alguna incubadora de negocios con apoyo de fondos de inversión de

riesgos, en el sentido de usarla de plataforma para arremeter hacia nuevos servicios y desarrollos. En ambos casos y dada la pertenencia de los resultados en forma conjunta a las universidades y FIA, las cuales cuentan con este tipo de incubadoras podría ser un negocio interesante para estructurar, hacerlo crecer y posteriormente venderlo.