



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Molecular e Celular
Área de Xenética

Sexado molecular en aves rapaces

Sexado molecular en aves rapaces

Molecular sex identification in birds of prey



Manuel Caeiro Aguado

Traballo de fin de grao en Bioloxía
Data da defensa: 29 de Xuño de 2015

Directoras: Ana M. González Tizón
Alejandra Perina Cedrón

RESUMEN

La correcta identificación del sexo de los animales es de vital importancia para la gestión y conservación de la fauna. En el caso de las aves, el sexado a partir de rasgos fenotípicos resulta complicado o imposible en numerosas ocasiones debido a la ausencia de dimorfismo sexual, tanto en los individuos juveniles como durante la etapa adulta. El desarrollo de metodologías moleculares para el sexado aviar permitió superar estas dificultades, siendo la PCR el método más extendido. En este trabajo describimos una prueba basada en la diferencia en las regiones del intrón entre los dos genes *CHD*, los cuales se encuentran en los cromosomas sexuales de todas las aves, a excepción de las ratites (*Struthioniformes*). El gen *CHD-W* está situado en el cromosoma W por lo que únicamente se encuentra en las hembras, mientras que el gen *CHD-Z* se localiza en el cromosoma Z y, por lo tanto, en ambos sexos (hembras ZW y machos ZZ). Las regiones del intrón fueron amplificadas por PCR haciendo uso del par de *primers* P2/P8 y los productos obtenidos fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa. Los individuos podrán mostrar dos bandas o una única banda, siendo identificados como hembras (ZW) y machos (ZZ), respectivamente.

SUMMARY

Accurate identification of the sex of the animals is of vital importance for the management and conservation of wildlife. Talking about birds, sexing from phenotypic traits is difficult or even impossible in many cases due to the absence of sexual dimorphism in both juveniles and during adulthood. The development of molecular methods for avian sexing made possible to overcome these difficulties, becoming the PCR the most widespread method. In this essay we describe a test based on the difference in intron regions between both *CHD* genes, which are located on sex chromosomes of all birds, with the exception of ratites (*Struthioniformes*). The *CHD-W* gene is located on the W chromosome so that it is only found in females, while the *CHD-Z* gene is located on the Z chromosome and therefore, in both sexes (females ZW and males ZZ). Intron regions were amplified by PCR using the pair of *primers* P2/P8 and the obtained products were evaluated by agarose gel electrophoresis. Individuals may exhibit two bands or a single band, being identified as female (ZW) and male (ZZ), respectively.

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivos.....	5
Material y métodos	6
Especies estudiadas	6
Toma de muestras	12
Extracción del DNA	13
Amplificación del DNA	13
Comprobación de la calidad y cantidad del DNA	13
Electroforesis	14
Secuenciación de las muestras y análisis bioinformático	14
Resultados	16
Extracción y amplificación del DNA	16
Secuenciación y filogenia	18
Discusión	23
Establecimiento del método de extracción de DNA óptimo	23
Sistema de sexado mediante PCR y electroforesis	23
Secuenciación y filogenia	24
Conclusión/Conclusions	26
Referencias bibliográficas	27

INTRODUCCIÓN

En aves, la distinción del sexo es una tarea sencilla en aquellos ejemplares que presentan dimorfismo sexual, sin embargo, la identificación del sexo por rasgos morfológicos a menudo puede ser compleja y difícil en los individuos monomorfos y polluelos de la mayor parte de la especies. Las metodologías tradicionales empleadas para la determinación del sexo en aves incluyen observaciones de comportamiento, laparoscopia, laparotomía, examinación cloacal y/o análisis citogenéticos (Morinha *et al.*, 2012).

El dimorfismo sexual es definido como la diferencia de formas, coloración y tamaños entre machos y hembras de una misma especie. El conjunto de dichos caracteres es lo que permite distinguir las llamadas características sexuales primarias (genitales externos) y las características sexuales secundarias, las cuales no son estrictamente necesarias para la reproducción pero tienen alguna función durante la misma, ya que la expresión de caracteres como tamaño, fuerza y colorido son un conjunto de aspectos que juegan un papel fundamental al garantizar el éxito en los procesos de apareamiento (Matta Camacho *et al.*, 2009). Este conjunto de parámetros son ampliamente controlados por genes ligados a los cromosomas sexuales; en el caso de las aves los cromosomas ZW y en el de los mamíferos XY (Frayer & Wolpoff, 1985). En aquellas, a diferencia de los mamíferos, las hembras constituyen el sexo heterogamético, es decir, tienen dos cromosomas sexuales diferentes (ZW), mientras que los machos son el sexo homogamético y llevan dos copias del cromosoma sexual Z (ZZ) (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Los cromosomas sexuales Z y W de las aves han evolucionado de manera diferente a como lo hicieron los cromosomas X e Y de otros grupos animales debido a que tuvo lugar a partir de pares autosómicos diferentes presentes en sus antepasados reptilianos (Fridolfsson *et al.*, 1998). Durante este proceso, el cromosoma W perdió muchos de sus genes y su tamaño se redujo (en muchas aves el cromosoma W se considera una versión degradada del cromosoma Z); sin embargo, el cromosoma Z no ha cambiado el contenido de genes (Matta Camacho *et al.*, 2009). El cromosoma W, aunque es específicamente femenino, tiene una estructura similar a la del cromosoma Y, excepto por la pobre estructura de los genes, su pequeño tamaño y su riqueza en heterocromatina y secuencias repetidas (Cerit & Avanus, 2006).

A pesar del elevado número de cromosomas en aves (la mayoría de las especies tienen más de 70 cromosomas), los cromosomas sexuales por lo general son fáciles de distinguir unos de otros debido a que difieren en su tamaño (Figura 1). El cromosoma Z se incluye en el grupo de los grandes cromosomas (macro cromosomas). Por el contrario, el cromosoma W está englobado dentro de los cromosomas más pequeños, los llamados micro cromosomas (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006), y se caracteriza por su riqueza en heterocromatina y la presencia de DNA repetitivo del tipo satélite (Smith, 2010). Ambos cromosomas contienen una pequeña región pseudoautosómica, es decir, secuencias que recombinan durante la meiosis (Smith, 2010).

Como excepción a lo mencionado en el párrafo anterior, en las aves no voladoras (ratites: emú, avestruz, casuario meridional, ñandú, kiwi y tinamú) los cromosomas sexuales Z y W son normalmente homomórficos (Figura 1), es decir, son morfológicamente muy similares o idénticos. Se cree que esto es debido a que los cromosomas sexuales de las ratites representan un estado evolutivo basal o primitivo del cromosoma sexual aviar (Smith, 2010).

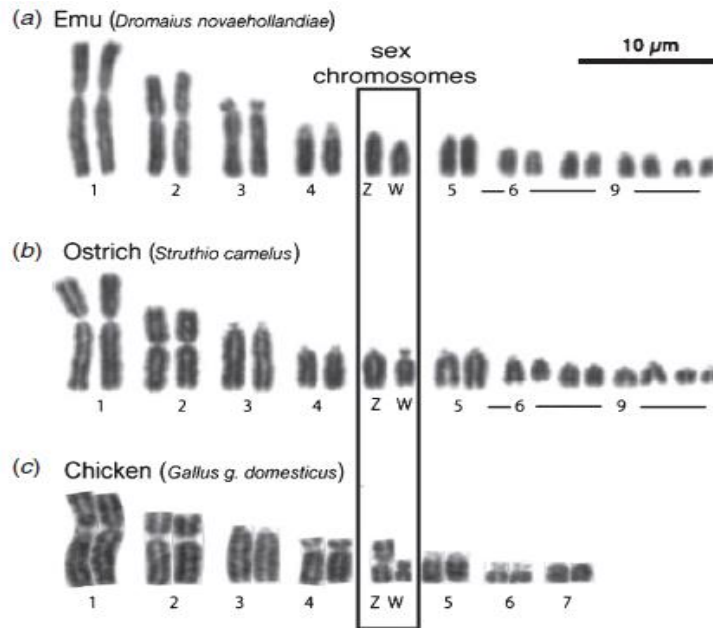


Figura 1: Comparativa de los cromosomas sexuales entre las aves no voladoras (ratites: a-emú y b-avestruz) y las aves voladoras (c-gallina). Fuente: Smith (2010).

El mecanismo básico para la determinación del sexo en aves ha sido un misterio durante décadas. El sexo puede estar determinado por la dosis del cromosoma Z (dos para un macho, uno para una hembra), o podría depender de un gen situado en el cromosoma sexual W. Estas dos posibilidades son conocidas como la hipótesis de la dosis Z e hipótesis de W dominante, respectivamente, las cuales no son necesariamente excluyentes (Ellegren, 2000). Un ejemplar con un genotipo ZZW que se desarrolló como macho a pesar de la presencia del cromosoma W apoyaría la hipótesis de la dosis Z, como lo haría un ave ZO (con sólo una Z), que sería una hembra. Alternativamente, una hembra ZZW o un macho ZO apoyarían la hipótesis de W dominante (Figura 2). No obstante, estas aneuploidías del cromosoma sexual no han sido documentadas en aves y se ha sugerido que los genotipos anteriores pueden ser mortales para los embriones (Smith, 2010).

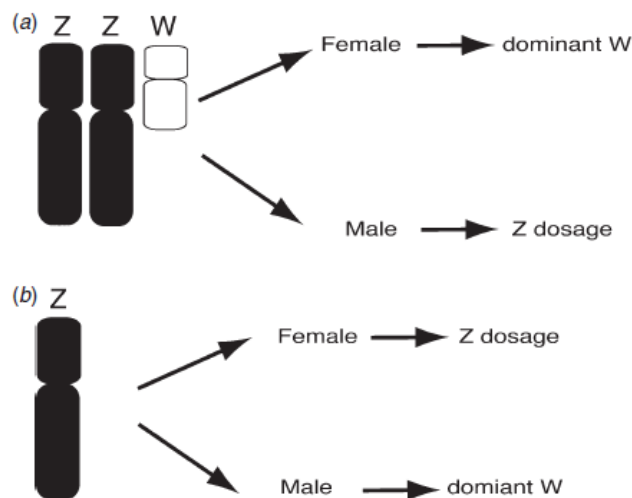


Figura 2: Mecanismos de la determinación del sexo en aves: (a) Hipótesis de W dominante; (b) Hipótesis de la dosis Z. Fuente: Smith (2010).

El método llevado a cabo para realizar el sexado molecular de las aves está basado en el análisis del gen *CHD* (gen que codifica la proteína cromohelicasa de unión al DNA), uno de los pocos genes ligados tanto al cromosoma Z como al W (Kahn *et al.*, 1998). La familia de genes *CHD* codifican para proteínas que comparten secuencias y dominios funcionales asociados con la regulación de la cromatina, estructura y transcripción del gen (Woodage *et al.*, 1997). Las proteínas codificadas por esta familia de genes tienen tres dominios (Figura 3), a los cuales deben su nombre (Matta Camacho *et al.*, 2009):

- Cromodominio: tiene una secuencia de aminoácidos similar a las proteínas HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) y Polcomb, unas proteínas involucradas en la represión génica, probablemente asociado a la condensación de la cromatina, aunque este mecanismo aún no está muy claro.
- Dominio Helicasa/ATPasa: es similar a las proteínas SNF2 (*Sucrose Non Fermentable 2*) del humano, que se ha demostrado que activan la transcripción por descondensación de la cromatina.
- Dominio de unión al DNA: se une selectivamente a secuencias ricas en AT (Adenina y Timina), vía interacción con el surco menor del DNA.

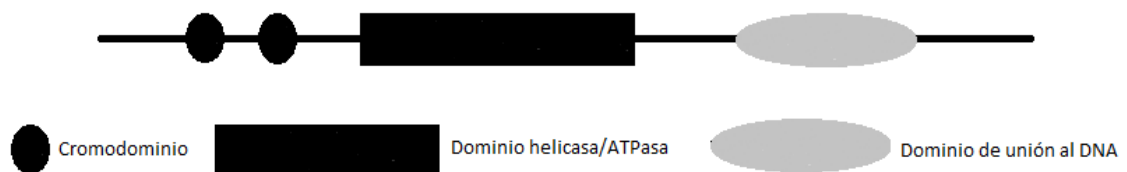


Figura 3: Dominios presentes en las proteínas codificadas por la familia de los genes *CHD*. Fuente: Matta Camacho *et al.* (2009). Adaptado de Woodage *et al.* (1997).

El gen *CHD* se encuentra muy conservado entre los diferentes órdenes evolutivos, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos (Fridolfsson & Ellegren, 1999), pudiendo distinguirse fácilmente los genes *CHD-W* y *CHD-Z* en todas las aves, a excepción de las ratites (*Struthioniformes*). Las tipificaciones basadas en este gen pueden darse por el corte diferencial con enzimas de restricción del producto amplificado (Griffiths *et al.*, 1998), polimorfismo conformacional de banda única (SSCP) (Griffiths *et al.*, 1998) o diferencias en el tamaño del intrón amplificado (Matta Camacho *et al.*, 2009). El gen *CHD-W* está localizado en el cromosoma W, por lo que es exclusivo de hembras; sin embargo, el *CHD-Z* se encuentra en el cromosoma Z y, por tanto, aparece en ambos sexos (Griffiths *et al.*, 1998). La falta de recombinación entre las copias de estos genes indica que se encuentra fuera de la región pseudoautosómica (Fridolfsson *et al.*, 1998).

El gen *CHD* contiene al menos dos intrones, los cuales están localizadas en el medio de dos regiones conservadas a las que se unen los *primers* y cuyas longitudes difieren entre los genes *CHD-W* y *CHD-Z*, posibilitando así la identificación del sexo (Cerit & Avanus, 2007). Por lo tanto, cuando los productos de la PCR son evaluados, si en el gel de agarosa aparece una sola banda (*CHD-Z*) el ejemplar será un macho, mientras que las hembras presentarán una banda (*CHD-W*) adicional (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Para la identificación y posterior amplificación del gen *CHD* se emplean una serie de *primers* que poseen una secuencia nucleotídica capaz de reconocer regiones exónicas conservadas, posibilitando de esta manera que se lleve a cabo la amplificación de un intrón, que es menos conservado (Griffiths *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 1998). Esto permite observar las diferencias de tamaño existentes en los productos amplificados del gen *CHD* en los cromosomas W y Z debido a las diferentes longitudes de los intrones amplificados para la determinación del sexo (Fridolfsson & Ellegren, 1999).

Para llevar a cabo la amplificación del gen muchos autores han empleado los *primers* P2/P8 descritos por Griffiths *et al.* (1998), ya que los test realizados con estos pares de *primers* son robustos y casi universales. No obstante, existen otros grupos de *primers* que han sido diseñados para flanquear el fragmento del gen con el intrón y que aseguran, por lo tanto, la amplificación en ciertas especies de aves (Tabla 1). Los más destacables son los *primers* 2550F/2718R (Fridolfsson & Ellegren, 1999) o los *primers* 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998).

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los principales *primers* empleados en el sexado molecular aviar.

<i>Primers</i>	Secuencia nucleotídica	Referencia
P2 P8	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	Griffiths <i>et al.</i> (1998)
2550F 2718R	5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3' 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	Fridolfsson & Ellegren (1999)
1237L 1272H	5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3' 5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	Kahn <i>et al.</i> (1998)

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en comprobar si las técnicas moleculares generales empleadas para llevar a cabo el sexado de aves constituyen un método fiable, íntegro y útil para la identificación del sexo en diferentes grupos de aves rapaces (órdenes *Falconiformes* y *Strigiformes*) o taxones próximos a ellas (orden *Caprimulgiformes*), utilizando para dicho fin la amplificación de la secuencia del intrón situado entre dos exones del gen *CHD*.

Otro de los aspectos a estudiar son las relaciones filogenéticas entre las especies sexadas, así como con otras especies de su mismo taxón. Además, se intenta dar una explicación a las distancias entre pares de secuencias en las especies consideradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especies estudiadas

Orden Falconiformes

Familia Accipitridae

Pernis apivorus (Linnaeus, 1758) (Abejero europeo)

Ave de 52-59cm. La coloración es muy variable, teniendo el macho la cabeza gris ceniza, las partes superiores pardogrisáceas y, por lo general, partes inferiores profusamente barradas (Figura 4). La hembra es de mayor tamaño y más parda en cabeza y dorso. Ambos sexos tienen partes inferiores oscuras, rara vez blancas. Presenta una cabeza tipo paloma, cuello estrecho y alas de base estrecha (Tory *et al.*, 1995). Las alas, vistas desde abajo, son generalmente blancas con manchas oscuras que pueden formar líneas y tienen los vértices flexores y las puntas y bordes posteriores oscuros (Penas *et al.*, 1991).



Figura 4: Ejemplar adulto de *Pernis apivorus*. Fuente: Manuel Caeiro Aguado.

Subfamilia Accipitrinae

Accipiter gentilis (Linnaeus, 1758) (Azor común)

Ave de entre 50-63cm, siendo el mayor de los *Accipiter* o rapaces de alas redondeadas de Europa. La hembra es mucho mayor que el macho y el plumaje, en ambos sexos, es similar en color (Tory *et al.*, 1995). Las partes superiores son pardas grisáceas y las inferiores blancas rayadas horizontalmente en los adultos. Los ejemplares juveniles son más parduzcos dorsalmente, mientras que en el pecho y el vientre muestran un color pardo o rojizo relativamente claro, surcado por abundantes manchas longitudinales (Figura 5)

(www.seo.org). Los ojos de los adultos son anaranjados mientras que los de los individuos juveniles son grises verdosos (Penas *et al.*, 1991).



Figura 5: Ejemplares adulto (izquierda) y juvenil (derecha) de *Accipiter gentilis*. Fuente: Manuel Caeiro Aguado.

Subfamilia *Buteoninae*

Buteo buteo (Linnaeus, 1758) (Busardo ratonero)

Ave de 45-57cm con numerosas variaciones individuales en su plumaje, por lo que se pueden observar desde individuos muy claros hasta ejemplares bastante oscuros (Figura 6) (www.seo.org). Presenta una cabeza roma, cuello corto, alas muy anchas y cortas y cola ancha y redondeada cuando la extiende (Tory *et al.*, 1995). La forma más común en Galicia tiene las partes superiores, cabeza, garganta y buche pardos oscuros; el resto de las partes inferiores son más claras. Los ejemplares juveniles son muy parecidos a los adultos, pero la cola casi siempre carece de la ancha banda terminal, la cabeza es algo listada y el iris es más claro (Penas *et al.*, 1991).



Figura 6: Ejemplares de *Buteo buteo* con patrones de coloración diferentes. Fuente: Manuel Caeiro Aguado.

Subfamilia *Circaetinae*

Circaetus gallicus (Gmelin, 1788) (Culebrera europea)

Ave de 63-70cm con sexos iguales en color. Existen dos formas: ambas tienen las partes superiores castañas grisáceas y las inferiores blancas moteadas de pardo (en la forma clara a penas se aprecian), cabeza grande, ojos amarillos, pico pequeño y buche castaño (Penas *et al.*, 1991); las alas son largas y anchas, la cola bastante larga y los tarsos desnudos y largos (Figura 8) (Tory *et al.*, 1995). Los ejemplares juveniles aparecen menos barrados en las regiones ventrales, las bandas de las plumas secundarias y la cola están menos patentes y las alas son más estrechas (www.seo.org).



Figura 7: Ejemplar de *Circaetus gallicus*. Fuente: sevilla.abc.es.

Subfamilia *Aegypiinae*

Gyps fulvus (Hablizl, 1783) (Buitre leonado)

Ave de 96-110cm con apenas dimorfismo sexual (www.seo.org). Presenta un pico alto, cabeza redondeada y relativamente pequeña (caída cuando vuela), cuello largo y desplumado (encogido cuando vuela o descansa), alas muy largas, anchas y acabadas en “dedos” y cola cuadrada y reducida (Tory *et al.*, 1995). El cuerpo es de color pardo leonado con rectrices muy oscuras y cabeza y cuello cubiertos de plumas blancas, situándose en la base de este último una gorguera de color ante pálido (Figura 8) (Penas *et al.*, 1991). Los ejemplares juveniles son de color marrón rojizo, más oscuro que en los adultos, y poseen el iris y el pico negros (Figura 9) (www.seo.com).



Figura 8: Ejemplar adulto de *Gyps fulvus*. Fuente: www.taxidermiaartisfauna.es.

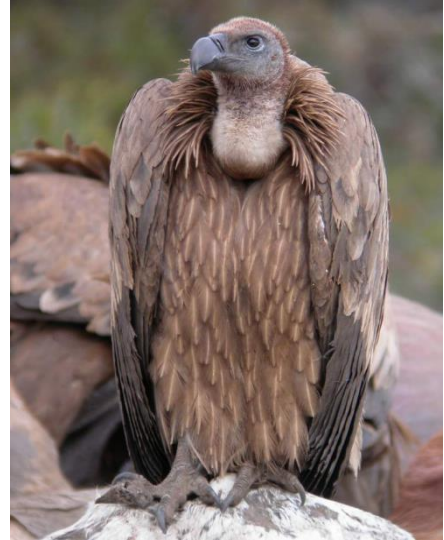


Figura 9: Juvenil de *Gyps fulvus*. Fuente: www.silvema.org.

Familia Falconidae

***Falco tinnunculus* (Linnaeus, 1758) (Cernícalo vulgar)**

Ave de 32-39cm con un acusado dimorfismo sexual. Los machos adultos poseen el dorso de color rojizo con manchas negras mientras que en las regiones inferiores predominan los tonos crema; la cabeza es grisácea y aparece algo rayada de negro, en tanto que en la cara destacan las mejillas blanquecinas y una marcada bigotera oscura. Las hembras son de mayor tamaño, exhiben tonos más pardos, con las regiones dorsales profusamente manchadas, al igual que el pecho y el vientre, ambos de tonos ocráceos; la bigotera resulta mucho menos evidente que en los machos (Figura 10). Los ejemplares jóvenes son muy parecidos a las hembras, pero poseen bordes pálidos en las plumas de la parte superior del ala y el pecho más estriado (www.seo.org).



Figura 10: Hembra (izquierda) y macho (derecha) de *Falco tinnunculus*. Fuente: quedadanatural.net.

Orden Strigiformes

Familia Strigidae

Athene noctua (Scopoli, 1769) (Mochuelo europeo)

Ave de 21-23cm con sexos iguales en coloración. Presenta una cabeza voluminosa y redondeada, adornada con finas manchas blancas; píleo pequeño, ojos amarillos y patas bastante largas. En su plumaje predominan los tonos marrones y grisáceos profusamente moteados de blanco. Las partes ventrales son más claras que las dorsales, aunque aparecen también intensamente moteadas (Figura 11). La cola es corta, al igual que las alas, que tienden a ser redondeadas; tanto una como otras aparecen abundantemente barradas con franjas parduzcas (www.seo.org). Puede ser activo de día, pero caza sobre todo al atardecer y al alba (Penas *et al.*, 1991).



Figura 11: Ejemplares de *Athene noctua* posado (izquierda) y volando con una presa (derecha). Fuente: Manuel Caeiro Aguado (imagen de la izquierda) y www.fotonatura.org (imagen de la derecha).

Strix aluco (Linnaeus, 1758) (Cárabo común)

Ave de 38cm con sexos similares en coloración. Presenta una cabeza redonda y voluminosa, cuerpo de barril y alas redondeadas y amplias (Tory *et al.*, 1995). Puede presentar dos formas en cuanto a la coloración de la base: grisácea y parda, en ambas formas las partes superiores están densamente rayadas y con manchas oscuras y las inferiores son grisáceas claras o cremosas con líneas verticales en forma de arpón (Figura 12) (Penas *et al.*, 1991). La cara es de color blancuzco, grisáceo o rojizo, y en ella destacan dos listas blanquecinas a modo de “cejas” y unos enormes y globosos ojos negros (www.seo.org). Es estrictamente nocturna excepto en condiciones atmosféricas extremas (Penas *et al.*, 1991).



Figura 12: Coloración grisácea (izquierda) y parda (derecha) en dos ejemplares de *Strix aluco*. Fuentes: www.avifauna.net (imagen izquierda) y www.lukaszlukasik.pl (imagen derecha).

Familia Tytonidae

***Tyto alba* (Scopoli, 1769) (Lechuza común)**

Ave de 34-39cm con sexos de coloración parecida. Lechuza de tamaño medio muy pálida, con distintiva cara en forma de corazón, parte inferior del cuerpo ahusada y largas patas bien visibles con los tarsos emplumados (Tory *et al.*, 1995). Las partes superiores son ocre doradas, manchadas de gris y finalmente moteadas; cara blanca con ojos oscuros y pico claro (Figura 13). La subespecie *Tyto alba alba* tiene las partes inferiores principalmente blancas y la subespecie *Tyto alba guttata* totalmente ocre (Figura 14). Los ejemplares jóvenes poseen un plumaje muy similar al de los adultos (www.seo.org). Es nocturna pero a menudo caza de día en invierno (Penas *et al.*, 1991).



Figura 13: Ejemplar adulto de *Tyto alba*.
Fuente: Manuel Caeiro Aguado.



Figura 14: Ejemplares de *Tyto alba guttata* (izquierda) y *Tyto alba alba* (derecha). Fuente: www.flickr.com.

Orden Caprimulgiformes

Familia Caprimulgidae

Caprimulgus europaeus (Linnaeus, 1758) (Chotacabras europeo)

Ave de 28cm con cabeza ancha y plana, cola y alas largas y plumaje pardo grisáceo, profusamente moteado y barrado de marrón oscuro y ocre. El macho se distingue de la hembra por la corta franja blanca que le cruza las plumas primarias externas y los vértices blancos de la cola (Figura 15) (Tory *et al.*, 1995). Los ejemplares juveniles son similares a las hembras, pero un poco más grisáceos (Penas *et al.*, 1991). Presenta una enorme comisura bucal que se prolonga hasta debajo de los ojos, “barbas” en los bordes de la mandíbula superior y patas pequeñas (Figura 16) (www.seo.org). A diferencia de todas las especies anteriores no se trata un ave rapaz y el motivo por el cual ha sido incluida en este trabajo es para poder estudiar su relación filogenética con otras especies nocturnas.



Figura 15: Ejemplar adulto de *Caprimulgus europaeus*. Fuente: www.fugleognatur.dk.



Figura 16: Comisura bucal y “barbas” en *Caprimulgus europaeus*. Fuente: www.fotonatura.org.

Toma de muestras

La toma de muestras fue llevada a cabo mediante la recolección de plumas de aves presentes en el Centro de Recuperación de la Fauna Salvaje de Santa Cruz, Oleiros (A Coruña), lugar en el cual realicé las prácticas externas en empresa durante los meses de Julio y Agosto del año 2014. Para la elaboración de este trabajo fueron utilizadas tanto plumas caídas (*A. gentilis*, *B. buteo*, *G. fulvus* y *S. aluco*) como plumas arrancadas (*P. apivorus*, *C. gallicus*, *F. tinnunculus*, *A. noctua*, *T. alba* y *C. europaeus*), estas últimas procedentes de animales que ingresaban muertos, morían o eran operados en el Centro de Recuperación. Todas las plumas formaban parte de las estructuras alares de los animales, a excepción de las recogidas en *P. apivorus*, las cuales fueron arrancadas del pecho.

La extracción del DNA se realizó en células situadas en la parte basal del cálamo (parte inferior de la pluma de un ave, pelada, cilíndrica y hueca que se inserta en la piel), lugar donde se concentra una pequeña cantidad de sangre en aquellas plumas que fueron arrancadas.

Extracción del DNA

Para llevar a cabo la extracción del DNA fue necesario comprobar primeramente qué método era el más adecuado para obtener una mayor cantidad y pureza de DNA y, por lo tanto, mejores resultados. Los métodos de extracción seleccionados fueron la resina *Chelex*[®] (*Bio-Rad*) y el kit de extracción *Realpure Spin Kit* (*REAL*[®]).

Teniendo en cuenta trabajos anteriores (González-Suurbach, 2014), la extracción llevada a cabo mediante el kit *Realpure Spin Kit* (*REAL*[®]) es más rápida y pura que la de la resina *Chelex*[®] (*Bio-Rad*). No obstante, para asegurarnos y ver cómo variaban los resultados, realizamos una prueba de extracción en plumas de *B. buteo* provenientes del mismo ejemplar. Los resultados obtenidos verificarían lo observado en estudios previos por lo que sería el kit de extracción el que finalmente se utilizaría para llevar a cabo la extracción del DNA de todas las aves.

Dentro del kit *Realpure Spin Kit* (*REAL*[®]), el protocolo seleccionado fue aquel destinado a la extracción de DNA genómico a partir de 25mg de tejidos animales, que incluye cuatro pasos fundamentales después de los cuales el DNA puede utilizarse directamente en reacciones posteriores (PCR, *Southern*, cualquier reacción enzimática, etc.):

1. Lisis celular por incubación de la muestra en una solución que contenía SDS y proteinasa K a 55°C.
2. Adición de una de grandes cantidades de iones caotrópicos para crear las condiciones adecuadas para que el DNA se una a la membrana de fibra de vidrio de columnas *Microspin*.
3. Eliminación de los contaminantes mediante un lavado eficiente con tampón de lavado.
4. Elución del DNA genómico puro mediante un tampón de elución.

Comprobación de la calidad y cantidad del DNA

Finalizada la extracción del DNA, se comprobaron tanto la cantidad como la calidad del mismo mediante espectrofotometría con *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*). La calidad del DNA viene determinada por los cocientes de las absorbancias A260/A280 y A230/A260, indicando A260/A280 el grado de impurezas de nuestra muestra en calidad de proteínas y A230/A260 una segunda medida de la pureza de ácidos nucleicos. Si el valor del cociente A260/A280 es muy próximo o similar a 1.8, el DNA es generalmente aceptado como “puro”; sin embargo, si el valor es inferior, podría indicar la presencia de proteínas en nuestra muestra. Por su parte, los valores de A230/A260 para considerar el DNA como “puro” son a menudo mayores que los valores de A260/A280, situándose estos dentro del rango 2.0-2.2; un ratio considerablemente menor puede ser debido a la presencia de contaminantes que absorben a una longitud de onda de 230nm (*NanoDrop Technologies, Inc., 2007*).

Amplificación del DNA

Tras la comprobación de la calidad y cantidad del material genético, el gen *CHD-Z* del DNA obtenido en cada una de las muestras fue amplificado por PCR empleando el kit *NZYS Tag Green*

Master Mix, separate MgCl₂ (Nzytech). Los *primers* utilizados fueron P2 (5'-TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT-3') y P8 (5'-CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG-3') (Griffiths *et al.*, 1998) al 25%. Para llevar a cabo la PCR, el programa utilizado (Tabla 2) constaba de los siguientes pasos:

1. Una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min.
2. 30 ciclos de PCR de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 48°C y 45 segundos a 72°C.
3. Una extensión final a 72°C durante 5 min.

Tabla 2: Programa de PCR para la amplificación de DNA.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
<i>Annealing</i>	48°C	45 s	30
Extensión	72°C	45 s	30
Extensión final	72°C	5 min	1

Es importante mencionar que en las muestras con bajas concentraciones de DNA (inferiores a 2ng/mL) fue necesario modificar las concentraciones de agua y DNA establecidas por el kit *NZYTag Green Master Mix, separate MgCl₂ (Nzytech)*; aumentándose la cantidad de DNA utilizado en detrimento del contenido de agua. Las concentraciones del resto de componentes (*Master Mix, MgCl₂ y primers*) se mantuvieron constantes.

Electroforesis

A partir de los productos de PCR obtenidos, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 3% (0.900gr de agarosa en 30-35ml de tampón TAE) para separar los productos y poder observar así el número de bandas resultantes, lo cual nos permitirá posteriormente determinar el sexo de las aves muestreadas. El marcador utilizado fue *Kb DNA Ladder (Agilent)*, el cual contiene bandas de 250pb a 12kb. Una vez cargadas las muestras en el gel, estas se dejaron correr durante 2 o 3 horas en la cubeta de electroforesis para, finalmente, observar el gel en el fotodocumentador (*Red™ Imaging System From Alpha Innotech*).

Secuenciación de las muestras y análisis bioinformático

Una vez finalizada la electroforesis y conocido el sexo de cada ejemplar, las muestras identificadas como machos fueron enviadas a los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador de DNA modelo 3130xl *Genetic Analysis System, Applied Biosystems*. La calidad de los electroferogramas fue comprobada en el programa *BioEdit*

7.2.5 (Hall, 1999). En las muestras anteriores, junto con muestras extraídas del *GenBank* (Tabla 3), se realizaron diversas técnicas bioinformáticas. Para ello se emplearon los programas *ClustalX 2.1* (Larkin *et al.*, 2007), con el que se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias, y *MEGA6* (Tamura *et al.*, 2013), utilizado para la obtención de los modelos estadísticos, la matriz de distancias entre secuencias y los árboles filogenéticos.

Por lo tanto, para llevar a cabo los análisis filogenéticos se utilizaron 15 secuencias correspondientes a 6 ejemplares machos muestreados en el laboratorio y las secuencias extraídas del *GenBank* (Tabla 3).

Tabla 3: Especies cuyas secuencias fueron extraídas del *GenBank*.

Nombre común	Nombre científico	Código <i>GenBank</i>
Águila calva	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	JX460789.1
Autillo flamulado	<i>Otus flammeolus</i>	DQ985272.1
Autillo yanqui	<i>Megascops asio</i>	KF601364.1
Búho campestre	<i>Asio flammeus</i>	KF601360.1
Búho nival	<i>Bubo scandiacus</i>	KF601366.1
Buitre dorsiblanco bengalí	<i>Gyps bengalensis</i>	HQ236388.1
Buitre negro	<i>Aegypius monachus</i>	HQ236382.1
Cóndor real	<i>Sarcoramphus papa</i>	FJ913850.1
Lechuza común	<i>Tyto alba</i>	KF412788.1
Lechuza norteña	<i>Aegolius acadicus</i>	KF601362.1

RESULTADOS

Extracción y amplificación del DNA

En la extracción de prueba, en la muestra Ratonero2 analizada mediante *Chelex*[®] (*Bio-Rad*) se obtuvo una concentración de DNA de 17.59ng/mL y unos cocientes de absorbancia A280/A260 y A260/A230 de 1.67 y 0.78, respectivamente. Por el contrario, la extracción llevada a cabo con el kit *Realpure Spin Kit* (*REAL*[®]) mostró una cantidad de DNA mayor (39.53ng/mL), siendo mayores también los cocientes de absorbancia A280/A260 y A260/A230, con valores de 2.31 y 3.11 respectivamente (Tabla 4). Estos datos apoyan los resultados obtenidos en trabajos previos (González-Suurbach, 2014) por lo que para el resto de muestras se decidió realizar la extracción empleando el kit *Realpure Spin Kit* (*REAL*[®]).

Tabla 4: Datos comparativos sobre la concentración y calidad del DNA en las muestras examinadas.

Muestra	Nombre científico	Método de extracción	[DNA] (ng/mL)	A260/A280	A260/A230
Ratonero1	<i>Buteo buteo</i>	<i>REAL</i> [®]	39.53	2.31	3.11
Ratonero2	<i>Buteo buteo</i>	<i>Chelex</i> [®]	17.59	1.67	0.78
Culebrera1*	<i>Circaetus gallicus</i>	<i>REAL</i> [®]	4.19	2.36	-1.91
Abejero1*	<i>Pernis apivorus</i>	<i>REAL</i> [®]	0.59	-0.65	-0.21
Cárabo1*	<i>Strix aluco</i>	<i>REAL</i> [®]	1.95	3.26	-31.2
Mochuelo	<i>Athene noctua</i>	<i>REAL</i> [®]	30.1	2.19	3.74
Cernícalo	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>REAL</i> [®]	78.59	2.02	2.71
Lechuza	<i>Tyto alba</i>	<i>REAL</i> [®]	302.18	2.04	2.24
Azor1	<i>Accipiter gentilis</i>	<i>REAL</i> [®]	1.45	-2.7	-0.31
Azor2	<i>Accipiter gentilis</i>	<i>REAL</i> [®]	88.56	2	2.53
Buitre	<i>Gyps fulvus</i>	<i>REAL</i> [®]	9.85	2.4	3.07
Cárabo2	<i>Strix aluco</i>	<i>REAL</i> [®]	1.18	-4.32	-0.43
Chotacabras	<i>Caprimulgus europaeus</i>	<i>REAL</i> [®]	71.66	2.13	2.49
Abejero2*	<i>Pernis apivorus</i>	<i>REAL</i> [®]	-0.18	0.11	0.07
Culebrera2	<i>Circaetus gallicus</i>	<i>REAL</i> [®]	47.63	2.05	2.19

REAL[®]: extracción con el kit *Realpure Spin Kit*. *Chelex*[®]: extracción con *Chelex*[®] (*Bio-Rad*).

* Indica aquellas muestras en las cuales no se obtuvieron productos de amplificación.

Como se observa en esta Tabla, la concentración de DNA obtenida en las muestras fue muy variable de unos individuos a otros, siendo la máxima concentración extraída de 302.2ng/mL en la

muestra de Lechuza1. Otros ejemplares de los cuales se logró extraer una gran cantidad de DNA fueron en las muestras Azor2 (88.6ng/mL), que finalmente se trataría de un macho, y Cernícalo1 (78.6ng/mL). Cabe mencionar que estas concentraciones de DNA fueron obtenidas en plumas, tanto arrancadas como caídas, que presentaban restos de sangre en la zona del cálamo.

Por otro lado, menores concentraciones de DNA se obtuvieron en las muestras Abejero1, Azor1 y Cárabo2; siendo necesario en estas dos últimas muestras modificar los volúmenes de agua y DNA utilizados en la extracción para poder obtener así una buena amplificación. La menor concentración de DNA se obtuvo en la muestra Abejero2 (-0.18ng/mL), este resultado negativo podría ser debido a que las plumas fueron arrancadas con brusquedad del pecho del animal durante una operación, haciendo que la muestra pudiese estar degradada o rompiendo la pluma en la zona del cálamo.

Una vez finalizada la PCR, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se realizaron diferentes electroforesis en geles de agarosa al 3% con los productos obtenidos. En las muestras de Ratonero2, Culebrera1, Abejero1 y Cárabo1 la electroforesis no mostró ningún producto de amplificación por lo que, para las tres últimas muestras, se volvió a empezar el proceso de extracción desde el inicio (se renombraron como Culebrera2, Abejero2 y Cárabo2), consiguiéndose finalmente resultados positivos en las muestras Culebrera2 y Cárabo2. La muestra Abejero2, al tratarse de una muestra contaminada, no se intentó amplificar.

Por otra parte, la muestra de Ratonero2 extraída con *Chelex*[®] (*Bio-Rad*), tampoco dio ninguna banda observable en el gel, quizás debido a la baja concentración de DNA obtenida en su extracción. Dicha muestra no se trató de purificar y se dejó sin analizar debido a que la muestra de Ratonero1 extraída con el kit *Realpure Spin Kit* (*REAL*[®]) sí mostró amplificación y bandas en el gel.

Para tratar de facilitar la visualización de los productos de amplificación obtenidos, se efectuó una nueva electroforesis en geles de agarosa al 3% para aquellas muestras en las que se obtuvo amplificación y la concentración de DNA era óptima (esto es, las muestras Ratonero1, Ratonero2, Culebrera1, Abejero1, Cárabo1 y Abejero2 no aparecen representadas en ninguno de los geles), procediéndose finalmente a su observación en el fotodocumentador (Figura 17). En dichos geles se pueden apreciar 10 muestras, 9 de ellas corresponden a muestras examinadas en este trabajo mientras que la restante se trata de una muestra prueba de Gallina, la cual fue utilizada como control positivo. Los geles muestran cómo de las 9 muestras estudiadas, 7 fueron identificadas como machos (Culebrera2, Cárabo2, Azor2, Chotacabras, Buitre, Mochuelo y Cernícalo) y 2 como hembras (Azor1 y Lechuza).

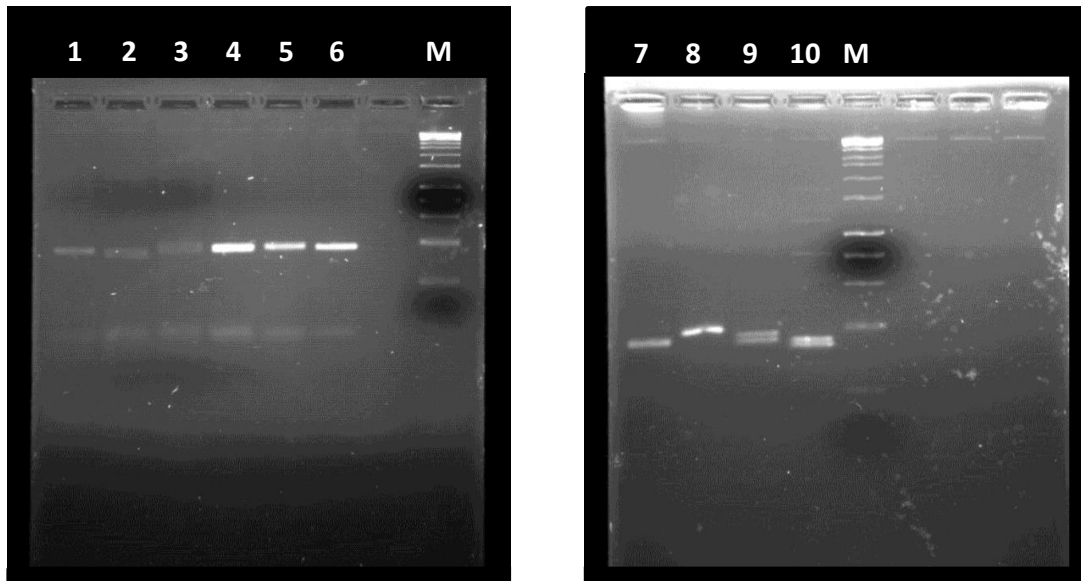


Figura 17: Geles de agarosa al 3% vistos en el fotodocumentador. (1) Culebrera2, (2) Cáрабо2, (3) Azor1, (4) Azor2, (5) Chotacabras, (6) Buitre, (7) Mochuelo, (8) Cernícalo, (9) Lechuza, (10) Gallina y (M) Marcador *Kb DNA Ladder (Agilent)*. En el gel de la izquierda se puede observar cómo las muestras Culebrera2, Cáрабо2, Azor2, Chotacabras y Buitre presentan una única banda, tratándose por tanto de ejemplares machos; mientras que la muestra Azor1, a pesar de su poca nitidez, presenta dos bandas, siendo una hembra. En el gel de la derecha se aprecia como las muestras Mochuelo y Cernícalo se corresponden con ejemplares machos ya que presentan una única banda, sin embargo, las muestras Lechuza y Gallina (control positivo) contienen dos bandas, tratándose de dos ejemplares hembras. En el caso del control positivo (carril 10) es posible observar numerosas bandas de intensidad más baja, probablemente debidas a la baja especificidad de los *primers*, cuya secuencia puede semejarse a otras no correspondientes al gen *CHD-Z*, amplificándolas del mismo modo.

Secuenciación y filogenia

Los productos de PCR de los machos Cernícalo1, Mochuelo1, Buitre1, Azor2, Cáрабо2, Culebrera2 y Chotacabras fueron secuenciados como se indicó en el apartado de material y métodos. Los resultados obtenidos en la muestra Chotacabras mostraron una elevada homología con la mayoría de las especies empleadas en este trabajo de modo que *a priori* pensamos que este resultado podría ser debido a la contaminación de la muestra, no obstante, también es posible que el gen *CHD-Z* esté muy conservado entre los diferentes filos. Para comprobar y corroborar estos datos sería necesario repetir los análisis en experimentos futuros. Además, al no estar publicada en el *GenBank* la secuencia del Chotacabras europeo para dicho gen, no fue posible utilizar esta especie para la construcción de los árboles filogenéticos.

Tabla 5: Clasificación de las aves empleadas para los análisis filogenéticos según el NCBI.

Orden	Familia	Especie
<i>Falconiformes</i>	<i>Accipitridae</i>	<i>Accipiter gentilis</i> <i>Aegypius monachus</i> * <i>Circaetus gallicus</i> <i>Gyps bengalensis</i> * <i>Gyps fulvus</i> <i>Haliaeetus leucocephalus</i> *
	<i>Falconidae</i>	<i>Falco tinnunculus</i>
	<i>Cathartidae</i>	<i>Sarcoramphus papa</i> *
<i>Strigiformes</i>	<i>Strigidae</i>	<i>Aegolius acadicus</i> * <i>Asio flammeus</i> * <i>Athene noctua</i> <i>Bubo scandiacus</i> * <i>Megascops asio</i> * <i>Otus flammeolus</i> * <i>Strix aluco</i> <i>Tyto alba</i> *

* Indica aquellas muestras extraídas del *GenBank*.

Debido a la ausencia del Chotacabras europeo, para los análisis filogenéticos fueron empleadas finalmente 16 secuencias, 8 de ellas pertenecen al orden *Falconiformes* (6 a la familia *Accipitridae*, 1 a la familia *Falconidae* y otra a la familia *Cathartidae*) y las 8 restantes al orden *Strigiformes*, todas ellas englobadas dentro de la familia *Strigidae* (Tabla 5).

Para llevar a cabo el alineamiento de las 14 secuencias utilizamos el programa *ClustalX 2.1*. Posteriormente, mediante el programa *MEGA6* y empleando el modelo Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980), se estimaron las distancias entre pares de secuencias (Tabla 6). Los resultados muestran que la menor distancia es la que se produce entre las especies *G. bengalensis* y *A. monachus*; no obstante, es posible observar también pequeñas distancias entre otras especies, como por ejemplo *O. flammeolus*, *B. scandiacus*, *A. flammeus*, *A. acadicus* y *M. asio*. Por el contrario, la mayor de las distancias se encuentra entre las especies *T. alba* y *A. flammeus*, siendo también elevada la distancia existente entre *T. alba* y *O. flammeolus*.

Tabla 6: Matriz de distancias entre las muestras en donde se observan las distancias nucleotídicas.

	<i>Accipiter gentilis</i>	<i>Gyps fulvus</i>	<i>Gyps bengalensis</i>	<i>Aegyptius monachus</i>	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	<i>Sarcoramphus papa</i>	<i>Tyto alba</i>	<i>Strix aluco</i>	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Circaetus gallicus</i>	<i>Megascops asio</i>	<i>Otus flammeolus</i>	<i>Bubo scandiacus</i>	<i>Asio flammeus</i>	<i>Aegolius acadicus</i>	<i>Athene noctua</i>
<i>Accipiter gentilis</i>	-															
<i>Gyps fulvus</i>	0.047	-														
<i>Gyps bengalensis</i>	0.028	0.018	-													
<i>Aegyptius monachus</i>	0.032	0.023	0.005	-												
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	0.047	0.056	0.037	0.042	-											
<i>Sarcoramphus papa</i>	0.097	0.097	0.082	0.087	0.087	-										
<i>Tyto alba</i>	0.146	0.123	0.113	0.118	0.145	0.092	-									
<i>Strix aluco</i>	0.153	0.153	0.136	0.142	0.147	0.082	0.113	-								
<i>Falco tinnunculus</i>	0.173	0.167	0.156	0.162	0.168	0.123	0.185	0.167	-							
<i>Circaetus gallicus</i>	0.388	0.373	0.366	0.373	0.388	0.359	0.469	0.420	0.437	-						
<i>Megascops asio</i>	1.167	1.167	1.127	1.127	1.210	1.412	1.770	1.499	1.370	1.250	-					
<i>Otus flammeolus</i>	1.198	1.198	1.157	1.157	1.244	1.465	1.881	1.561	1.416	1.280	0.014	-				
<i>Bubo scandiacus</i>	1.188	1.188	1.147	1.147	1.232	1.443	1.644	1.535	1.398	1.304	0.037	0.033	-			
<i>Asio flammeus</i>	1.255	1.255	1.210	1.210	1.306	1.561	1.954	1.678	1.499	1.373	0.028	0.023	0.028	-		
<i>Aegolius acadicus</i>	1.243	1.243	1.198	1.198	1.292	1.476	1.781	1.404	1.466	1.329	0.047	0.052	0.057	0.037	-	
<i>Athene noctua</i>	1.41	1.51	1.5	1.45	1.48	1.45	1.57	1.64	1.45	1.7	1.35	1.4	1.33	1.37	1.4	-

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó también el programa *MEGA6*, mediante el cual elaboramos los árboles de máxima parsimonia (Figura 18) y máxima verosimilitud (Figura 19). En ambos casos, el sistema de remuestreo empleado para determinar la calidad de los nodos del árbol fue el *bootstrap*; sin embargo, el modelo aplicado difiere entre un árbol y otro. Para la representación del árbol filogenético de máxima parsimonia se utilizó el modelo Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980), mientras que para el árbol de máxima verosimilitud fue necesario realizar un análisis de la bondad de ajuste para establecer cuál era el modelo evolutivo que mejor se adaptaba a las secuencias que habían sido empleadas.

Las relaciones filogenéticas resultantes del árbol de máxima parsimonia (Figura 18) muestran valores de *bootstrap* superiores al 80% en el nodo que agrupa *T. alba* y *S. aluco*, así como el que agrupa las dos especies anteriores, *S. papa* y *F. tinnunculus*, y el que engloba todas las especies pertenecientes a la familia *Accipitridae*, a excepción de *C. gallicus*. Además, es posible observar nodos en los cuales las relaciones filogenéticas presentan valores máximos de *bootstrap* (100%).

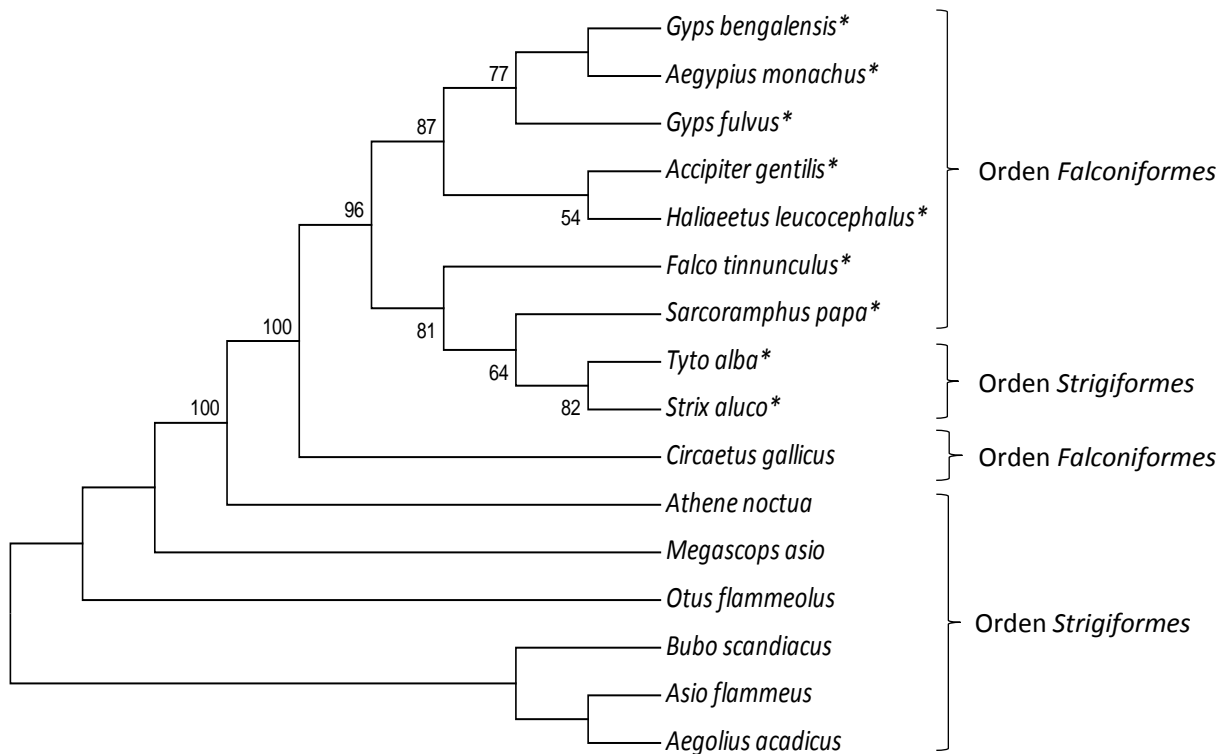


Figura 18: Árbol filogenético de máxima parsimonia (únicamente se muestran aquellos valores de *bootstrap* superiores a 50). * Indica aquellas especies que forman parte de una politomía.

En cuanto al árbol filogenético de máxima verosimilitud, para llevar a cabo el análisis de la bondad de ajuste fue necesario el programa *MEGA6*. Los modelos con valores de BIC (*Bayesian Information Criterion*) más bajos serán los más adecuados para la descripción del patrón de sustitución; además, es necesario tener en cuenta para cada modelo el menor valor de AICC (*Akaike Information Criterion, corrected*) y el mayor valor de máxima verosimilitud (lnL). En nuestro caso, el criterio empleado fue el logaritmo neperiano de la verosimilitud, siendo el modelo que mejor se adaptaba a las secuencias el GTR+G+I (*General Time Reversible model*), con un valor para este parámetro de -1574.400021.

Las relaciones filogenéticas generadas a través del árbol de máxima verosimilitud (Figura 19) difieren en gran medida respecto a las obtenidas en el árbol de máxima parsimonia, siendo en la mayoría de los casos inferiores. En este árbol se detectan valores de *bootstrap* superiores al 80% únicamente en los nodos que agrupan *A. flammeus* con *A. acadicus*, *B. scandiacus*, *M. asio* y *O. flammeolus*; así como el que engloba *A. noctua* con todas las especies anteriores. Por otro lado, los individuos del género *Gyps* son los que presentan una mayor divergencia evolutiva para el gen *CHD-Z* con respecto a los otros géneros de la familia *Accipitridae*.

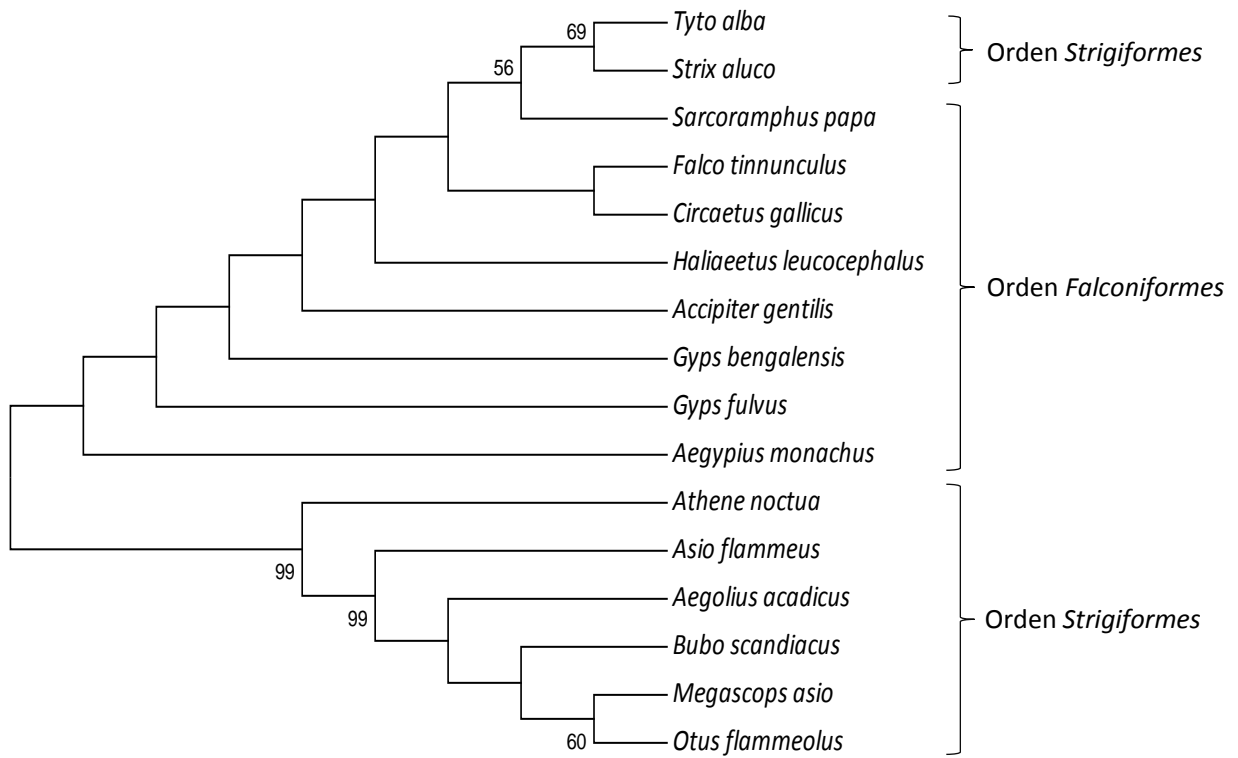


Figura 19: Árbol filogenético de máxima verosimilitud (únicamente se muestran aquellos valores de *bootstrap* superiores a 50).

DISCUSIÓN

Establecimiento del método de extracción de DNA óptimo

Para tratar de encontrar qué método de extracción de DNA era el más apropiado para llevar a cabo este trabajo y con el cual conseguir mejores resultados, probamos primero a realizar una extracción con *Chelex*[®] (*Bio-Rad*), el método más económico. El uso de esta resina de sílice tiene, además de su bajo coste, la ventaja de ser un método fácil. No obstante, después de la extracción de prueba en la muestra Ratonero1, ha quedado demostrado que su uso provoca una baja eficiencia en la extracción de DNA, consiguiéndose como resultado muestras altamente contaminadas.

Por el contrario, con el kit de extracción *Realpure Spin Kit (REAL)*[®], los resultados obtenidos en la mayoría de los casos fueron rápidos y óptimos, pudiendo obtenerse así elevadas concentraciones de DNA y una alta calidad y purificación del mismo. Esto permitió que, con el fotodocumentador, se observasen bandas claras en los geles de agarosa obtenidos, lo cual permitió realizar la determinación del sexo de las muestras.

Sistema de sexado mediante PCR y electroforesis

La metodología estándar para el sexado molecular de aves está basada en la amplificación, mediante PCR, de los alelos W y Z, empleando *primers* específicos diseñados para detectar las variaciones en el intrón (tamaño y secuencias nucleotídicas) en los genes ligados al sexo (Morinha *et al.*, 2012). Debido a la existencia de un alto grado de conservación, incluso entre especies distantes, el gen *CHD* es un marcador interesante para el desarrollo del sexado (Vucicevic *et al.*, 2013); no obstante, si la diferencia existente entre los productos de PCR de los genes *CHD-Z* y *CHD-W* es demasiado corta como para ser resuelta, el proceso de sexado fracasa (Chang *et al.*, 2008).

Las diferencias existentes entre las bandas Z y W resultantes de la amplificación con los *primers* 2550F/2718R se suelen situar en el intervalo de 150 a 250pb (Fridolfsson & Ellegren, 1999; Jensen *et al.*, 2003), permitiendo de esta manera su separación y visualización en gel de agarosa (Vucicevic *et al.*, 2013). Por el contrario, los productos amplificados con los *primers* P2/P8 no suelen mostrar, en el caso de las hembras, una buena resolución, pudiendo ser estas malinterpretadas como una única banda, característica de un macho (Ong & Vellayan, 2008). En nuestro trabajo, a pesar del uso de los *primers* P2/P8, la identificación del sexo en las aves objeto de estudio fue exitosa. El par de *primers* 1237L/1272H puede llegar a producir un mayor número de fragmentos no específicos que P2/P8, de modo que se recomienda utilizar este último par de *primers* para llevar a cabo el sexado (Jensen *et al.*, 2003).

La razón por la cual los *primers* P2/P8 no proporcionan una buena resolución reside en que el producto de PCR del alelo del gen *CHD-Z* es menor que el de *CHD-W*, de modo que el primero puede amplificarse de manera preferencial (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Además, el polimorfismo del gen *CHD-Z* (Dawson *et al.*, 2001) y la pequeña diferencia en el tamaño de los intrones amplificados por este juego de *primers* (Griffiths *et al.*, 1998) dificultan la determinación del sexo. Todo lo anterior hace que, en ocasiones, las hembras sean identificadas como machos, principalmente cuando la amplificación es débil (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). Para solventar

este inconveniente, los autores recomiendan el empleo de mecanismos que proporcionen una resolución suficiente para discriminar entre productos *CHD-Z* y *CHD-W* (Chang *et al.*, 2008), como es el caso de geles de poliacrilamida u otros métodos de alta resolución, como la electroforesis capilar (Vucicevic *et al.*, 2013).

La limitación que supone la diferencia de longitud existente en el intrón para los genes *CHD-W* y *CHD-Z* puede ser solventada mediante el uso de *primers* para PCR rediseñados, así como otras técnicas como la PCR-RFLP, RAPD y AFLP *fingerprintings*. Algunos de estos métodos pueden tener aplicación y un elevado rendimiento en el sexado molecular de aves; no obstante, para ello es necesario mejorar previamente el paso de la electroforesis en gel (Chang *et al.*, 2008).

La modificación del protocolo en términos de temperatura de *annealing* y reamplificaciones o el uso de un nuevo kit *Master Mix* especializado pueden ser necesarios para realizar el sexado de ciertas especies de aves (Vucicevic *et al.*, 2013). Esto podría ser debido a que varios inhibidores de la PCR pueden estar presentes en las plumas de los animales, así como en los pigmentos (Baignet *et al.*, 2005), las células muertas, el RNA (Nielsen *et al.*, 2001), o varios microorganismos (Vucicevic *et al.*, 2013). Además, el sexado molecular también podría estar influenciado por las variaciones interespecíficas del intrón dentro del gen *CHD* (Kahn *et al.*, 1998) y un polimorfismo en el cromosoma W (Dawson *et al.*, 2001).

Dentro del clado de las aves existen tres grupos monofiléticos separados, los cuales se encuentran constituidos por las secuencias *CHD-W*, *CHD-Z* y *CHD-paleognato* (García Moreno & Mindell, 2000), este último grupo formado por las ratites, en las que el cromosoma W mantiene bandas homólogas al cromosoma Z, siendo altamente homomórficos (Ansari *et al.*, 1988). Este es el motivo por el cual en este grupo de aves la diferenciación del sexo en un gel es más complicada, siendo las diferencias en la longitud de las secuencias analizadas muy pequeñas. Valores relativamente bajos de *bootstrap* para el clado formado por *CHD-Z* y *CHD-W* son debidos al movimiento ocasional de uno u otro hacia el clado de *CHD-paleognato* (García Moreno & Mindell, 2000).

Las estrategias moleculares para llevar a cabo el sexado aviar han ido mejorando claramente durante la última década, permitiendo el desarrollo de análisis simples, precisos, rápidos y a gran escala que revolucionarán, ampliarán y facilitarán su aplicabilidad en estudios sobre biología de conservación, reproductividad, ecología y evolución (Morinha *et al.*, 2012). Algunos de estos novedosos mecanismos son la *PCR-melting curve analysis* (PCR/MCA), que no precisa la realización posterior de un gel, siendo rápido y económico (Chang *et al.*, 2008); la electroforesis capilar (*Capillary electrophoresis*, CE), automatizada y de alto rendimiento, velocidad, aplicabilidad y resolución; o la *High-resolution melting* (HRM), de elevada sensibilidad y rapidez (Morinha *et al.*, 2012).

Secuenciación y filogenia

En lo referente a las distancias que fueron obtenidas a partir del alineamiento de las secuencias (Tabla 6), la mayoría de los casos estudiados muestran valores reducidos cuando las especies están clasificadas dentro de la misma familia. Esto se observa entre las especies *O. flammeolus*, *B. scandiacus*, *A. flammeus*, *A. acadicus* y *M. asio* pertenecientes a la familia *Strigidae*;

así como entre las especies *G. bengalensis* y *A. monachus* de la familia *Accipitridae*. No obstante, en algunos casos es posible observar mayores distancias entre especies congénéricas, como *G. fulvus* y *G. bengalensis* (0.018), que entre otras de la misma familia, como *G. bengalensis* y *A. monachus* (0.005). También, las distancias existentes entre las especies *T. alba* con *A. flammeus* y *T. alba* con *O. flammeolus*, pertenecientes a la misma familia, son bastante elevadas. En este sentido hay que tener en cuenta que en este trabajo hemos realizado un árbol de un gen y no un árbol de especies por lo que las tasas de mutación, siempre aleatorias, pueden tener este tipo de consecuencias. También hay que señalar que a pesar de pertenecer a órdenes diferentes, las distancias nucleotídicas entre las secuencias de *S. aluco* y *T. alba*, dos especies de *Strigiformes*, y las secuencias de los representantes del orden *Falconiformes*, son muy reducidas en comparación con las obtenidas al comparar dichas especies con otros ejemplares de su mismo orden (Tabla 6). Además, esta misma Tabla muestra que las distancias nucleotídicas de las secuencias de las especies *S. aluco* y *T. alba* presentan sus valores más reducidos con la especie *S. papa* (valores de 0.082 y 0.092, respectivamente).

Las 16 especies empleadas en los análisis filogenéticos pertenecían a 4 familias diferentes (Tabla 5), por lo que cabría esperar que aquellos ejemplares de la misma familia se encontrasen agrupados en el mismo nodo en los árboles filogenéticos (Figuras 18 y 19); por un lado tendríamos los ejemplares pertenecientes a las familias *Accipitridae*, *Falconidae* y *Cathartidae* (orden *Falconiformes*) y por el otro aquellos englobados dentro de la familia *Strigidae* (orden *Strigiformes*). Sin embargo, resulta sorprendente observar cómo tanto en el árbol filogenético de máxima parsimonia (Figura 18) como en el de máxima verosimilitud (Figura 19) las especies *S. aluco* y *T. alba*, ambas pertenecientes a la familia *Strigidae*, están agrupadas en el mismo nodo que las especies del orden *Falconiformes*, estando más próximas del nodo que contiene a la especie *S. papa* (único representante de la familia *Cathartidae*). Además, debemos señalar que los valores de *bootstrap* de las ramas son en general inferiores al 85%, valor considerado óptimo para no colapsar las ramas. Esto implicaría que a partir del nodo con un *bootstrap* de 96 se debería de producir una politomía de la cual saldrían las ramas que llegan a las especies *G. bengalensis*, *A. monachus*, *G. fulvus*, *A. gentilis*, *H. leucocephalus*, *F. tinnunculus*, *S. papa*, *T. alba* y *S. aluco*. Este hecho es todavía mucho más significativo en el árbol de máxima verosimilitud en el que únicamente dos nodos presentan valores superiores al 85%.

CONCLUSIONES

El empleo de metodologías basadas en la PCR y la amplificación del gen *CHD* permite llevar a cabo un sexado molecular fiable, efectivo y rápido en la mayoría de las aves, tanto en aquellas especies caracterizadas por presentar un marcado dimorfismo sexual como en otras en las que este es escaso o nulo. Este mecanismo de sexado constituye también una herramienta valiosa debido a su sensibilidad y posibilidad de tomar muestras de un modo que reduce el estrés de los ejemplares, como por ejemplo a través plumas caídas.

CONCLUSIONS

Using methodologies based on PCR and the amplification of the *CHD* gene allows carrying on a reliable, effective and rapid molecular sexing in most of the birds, both in those species characterized by having a marked sexual dimorphism as others in which this rate is low or null. Moreover, this mechanism is also a valuable tool because of its sensitivity and possibility to take samples in a way that reduce animal stress, such as falling feathers.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansari, H.A., Takagi, N. & Sasaki, M. (1988). Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 47:185-188.
- Baignet, S., Petherbridge, L., Howes, K., Smith, L., Currie, R. & Nair, V. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 123:53-56.
- Cerit, H. & Avanus, K. (2007). Sex determination by *PRIW* and *CHD-Z* genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 31:371-374.
- Chang, H.W., Cheng, C.A., Gu, D.L., Chang, C.C., Su, S.H., Wen, C.H., Chou, Y.C., Chou, T.C., Yao, C.T., Tsai, C.L. & Cheng, C.C. (2008). High-throughput avian molecular sexing by SYBR green-based real-time PCR combined with melting curve analysis. *BMC Biotechnology*, 8:12.
- Dawson, D., Darby, S., Hunter, F., Krupa, A., Jones, I. & Burket, T. (2001). A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Molecular Ecology Notes*, 1:201-204.
- Dubiec, A. & Zagalska-Neubauer, M. (2006). Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological Letters*, 43:3-12.
- Ellegren, H. (2000). Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology & Evolution*, 15:188-192.
- Frayer, D.M. & Wolpoff, M.H. (1985). Sexual dimorphism. *Annual Review of Anthropology*, 14:427-429.
- Fridolfsson, A.K., Cheng, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Liu, H.C., Raudsepp, T., Woodage, T., Chowdhary, B., Halverson, J. & Ellegren, H. (1998). Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:8147-8152.
- Fridolfsson, A.K. & Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30:116-121.
- González Suurbach, S. (2014). Sexado molecular en aves. Trabajo de Fin de Grado. A Coruña: Universidade da Coruña.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7:1071-1075.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
- Jensen, T., Pernasetti, F. & Durrant, B. (2003). Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo Biology*, 22:561-571.

- Kahn, N.W., John, J.S. & Quinn, T.W. (1998). Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk*, 115:1074-1078.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Matta Camacho, N.E., Ramírez Martín, N., Zúñiga Díaz, B.C. & Vera, V. (2009). Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta Biológica Colombiana*, 14:25-38.
- Morinha, F., Cabral, J.A. & Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*, 78:703-714.
- NanoDrop Technologies, Inc. (2007). NanoDrop Technical Support Bulletin T009, 260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers. Wilmington, Delaware USA.
- Nielsen, S., Houe, H., Thamsborg, S. & Bitsch, V. (2001). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13:164-166.
- Ong, A. & Vellayan, S. (2008). An evaluation of *CHD*-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biology*, 27:62-69.
- Penas, X.M., Pedreira, C. & Silvar, C. (1991). *Guía das aves de Galicia*. Bahía edicions, Salamanca.
- Smith, C.A. (2010). Sex determination in birds: a review. *Emu*, 110:364-377.
- Sociedad Española de Ornitología (SEO/BirdLife)*. <<http://www.seo.org>> [Consulta: 5 de mayo de 2015].
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.
- Tory, R., Mountfort, G. & Hollom, P.A.D. (1995). *Guía de campo de las aves de España y de Europa* (5ª edición). Ediciones Omega, Barcelona.
- Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N. & Stanimirovic, Z. (2013). Sex determination in 58 bird species and evaluation of *CHD* gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology*, 32:269-276.
- Woodage, T., Basrai, M.A., Baxevanis, A.D., Hieter, P. & Collins, F.S. (1997). Characterization of the *CHD* family of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:11472-11477.