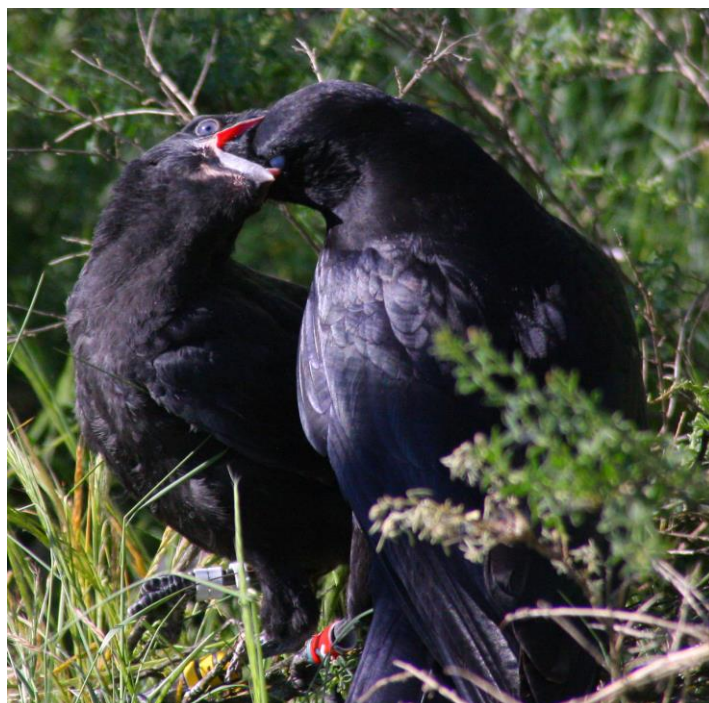


Sexado molecular en la corneja negra (*Corvus corone*)

Sexado molecular no corvo pequeno (*Corvus corone*)

Molecular sexing of carrion crow (*Corvus corone*)



Trabajo de Fin de Grado presentado por

Ana M^a Prieto López

Directores

Dra. Marta Vila Taboada & Dr. Vittorio Baglione

Fecha de defensa: 17 de febrero de 2016

ÍNDICE

Introducción	3
Justificación académica del presente TFG	4
Sexado molecular en aves.....	6
Objetivos	10
Material y métodos	11
Análisis del gen CHD1.....	12
Resultados y Discusión	15
Sexado de 49 muestras de <i>Corvus corone</i> utilizando 9 individuos control.....	15
Comparación entre el coste del sexado molecular realizado en el presente TFG y presupuestos ofertados por diferentes empresas e instituciones españolas	20
Optimización del protocolo de sexado molecular de <i>Corvus corone</i> realizado hasta la fecha por la tutora del presente TFG	23
Conclusiones	25
Bibliografía	26
Apéndice	

RESUMEN

Conocer el sexo de los individuos de una población es fundamental para distintas actividades humanas. En el caso de las aves no ratites, se han desarrollado varios protocolos basados en el gen *CHD1* que se encuentra en ambas cromosomas sexuales. En este Trabajo de Fin de Grado se ha procedido al sexado de 58 individuos de *Corvus corone* pertenecientes a una población de la provincia de León. Cuarenta y siete de las 49 muestras problemáticas fueron sexadas amplificando dos intrones del gen *CHD1* mediante sendas parejas de primers: P2/P8 (Griffiths et al. 1998) y 3007/3112 (Ellegren & Fridolfsson 1997). Como resultado del presente TFG se diseñó un único programa de termociclador que permite simultanear ambas reacciones de amplificación, disminuyendo así el tiempo de procesado en 2,5 horas por muestra. Con motivo de la necesidad de confirmar el sexado de dos muestras problemáticas se incorporó el protocolo de Wang et al. (2010), alternativo al de Griffiths et al. y optimizado para aves Passeriformes. El sexado molecular realizado para el presente TFG ha supuesto un coste aproximado de 8,11 € por muestra. Dicho coste se encuentra dentro del rango de precios ofertados por distintas instituciones españolas (3,9 - 15,75 €/muestra, IVA incluido).

SUMMARY

Knowing the sex of the individuals of a given population is important for several human activities. A few “universal” protocols have been developed to sex non ratite birds, mainly based on the sex-linked *CHD1* gene. In this project, 58 carrion crows (*Corvus corone*) from León (NW Spain) were sexed by applying the protocols by Griffiths et al. (1998) and Ellegren & Fridolfsson (1997), i.e. using primers pairs P2/P8 and 3007/3112 to amplify two introns. As many as 47 out of the 49 test individuals were unambiguously sexed by both methods. It was actually possible to use a single thermocycler program to simultaneously amplify both fragments. This meant a reduction of 2.5 hours in processing time per sample. There were two problematic samples where additional confirmation was obtained by means of an alternative protocol to P2/P8. Primers developed by Wang et al. (2010) were optimised for Passeriformes and worked fine in carrion crows. The molecular sexing conducted for this project costed approximately 8.11 € per sample. This amount is within the range of prices offered by different Spanish companies (3.9-15.75 €/sample, VAT included).

DECLARACIÓN

El TFG del Grado en Biología por la UDC implica una carga de trabajo de 150 horas. La alumna y sus tutores desean especificar la distribución de ese tiempo.

Tarea	Horas	Personas implicadas
Revisión bibliográfica y discusión inicial	2	Alumna, Dres. Baglione y Vila Taboada
Trabajo de laboratorio	92	Alumna, Dra. Vila Taboada
Seminario redacción documentos científicos	4	Alumna, Dra. Vila Taboada
Estancia laboratorio Biología Molecular SAI	2	Alumna, equipo Dra. Rodríguez Fariña
Elaboración de la memoria	40	Alumna, Dres. Baglione y Vila Taboada
Preparación presentación oral	10	Alumna, Dra. Vila Taboada
Total	150	

Por la presente, ambos tutores autorizan la presentación de este Trabajo de Fin de Grado realizado por D^a Ana M^a Prieto López para ser defendido el día 17 de febrero de 2016 ante el tribunal evaluador correspondiente.

A Coruña, 10 de febrero de 2016

Marta Vila Taboada

Vittorio Baglione

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a mis tutores Marta Vila Taboada y Vittorio Baglione por darme la oportunidad de formar parte de este estudio. Gracias a ellos he podido desarrollarme como profesional y sentirme casi autónoma en el laboratorio, apoyándome y resolviendo todas mis dudas en cada momento. Por otro lado, darle las gracias también a la Dra. Rodríguez Fariña por acogerme en la Unidad de Biología Molecular de los *Servicios de Apoyo á Investigación da Universidade da Coruña*, para conocer de cerca otra técnica de revelado de resultados, mediante el Bioanalyzer.

INTRODUCCIÓN

Conocer el sexo de los individuos de una población es fundamental para distintas actividades humanas. Así, el sexado con fines agropecuarios ha posibilitado la mejora genética, donde se han de programar cruzamientos entre individuos que presenten determinadas características de interés. La Biotecnología ha posibilitado un mayor refinamiento de dicho procedimiento ya que las técnicas moleculares permiten el sexado temprano de embriones *in vitro* y su posterior implantación en el útero materno. Esto ha supuesto un avance en la industria de producción, puesto que sólo se invierte tiempo y cuidados en el sexo más productivo (Palma 2001). Desde el punto de vista de la especie humana, el sexado de embriones forma parte del llamado Diagnóstico Genético Preimplantacional, particularmente cuando se trata de evitar determinados fenotipos ligados a los cromosomas sexuales.

El presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) se centra en el sexado mediante métodos moleculares con un objetivo académico, concretamente se desea determinar el sexo de una población de una especie sin dimorfismo sexual, la corneja negra (*Corvus corone* Linnaeus 1758), con el fin de ahondar en la ecología de su comportamiento (*behavioral ecology*). Se dice que una especie posee dimorfismo sexual cuando existen dos fenotipos claramente diferenciables, i.e. con características asociadas a cada uno de los sexos. Por ejemplo, en el pavo real (*Pavo cristatus*), los machos poseen una gran y colorida cola que los diferencia de las hembras.

En el presente TFG se utiliza la categoría de especie (*Corvus corone*) para la corneja negra, un ave perteneciente al orden Passeriformes y a la familia Corvidae. Esta apreciación es necesaria, habida cuenta de la histórica controversia acerca de la categoría taxonómica de las dos cornejas europeas: la negra [*Corvus (corone) corone*] y la cenicienta [*Corvus (corone) cornix*] (Figura 1). Dicho debate surge, por un lado, por la diferenciación en su área de distribución, si bien existe una estrecha pero extensa zona de contacto en Centroeuropa y Escocia donde se aparean entre sí (Figura 1) y, por otro, debido a sus diferencias morfológicas, mantenidas aún en presencia de flujo génico. Las subespecies *C. corone corone* y *C. corone cornix* se elevan a especies (*C. corone* y *C. cornix*) en 2003, basándose en que el apareamiento no es aleatorio y en que la eficacia biológica de los híbridos es más reducida. Recientemente se ha determinado la escasa diferenciación entre el genoma de la corneja negra y la cenicienta (0,28%). Dichas diferencias se centran en una pequeña región (1,95 Mb) del cromosoma 18, donde se han determinado (a) 81 de las 83 diferencias nucleotídicas entre las dos cornejas (sobre un total de 8,4 millones de pares de bases analizadas) y (b) un complejo patrón de

inversiones cromosómicas. Ambos taxones presentan fenotipos diferentes ya que una serie de genes de dicha región (involucrados en la pigmentación, percepción visual y regulación hormonal) presentan menores niveles de expresión en la corneja cenicienta que en la negra (revisado por De Knijff 2014). La divergencia fenotípica (negra vs cenicienta) aún en presencia de flujo génico parece estar mediada en este caso por las inversiones cromosómicas detectadas en el cromosoma 18. Dichas inversiones hacen imposible la recombinación en dicha zona durante la meiosis de un heterocigoto (híbrido) (revisado por Lee et al. 2013), manteniendo la transmisión de determinados genotipos “en bloque” en los gametos producidos (tipo “negra” o tipo “cenicienta”).

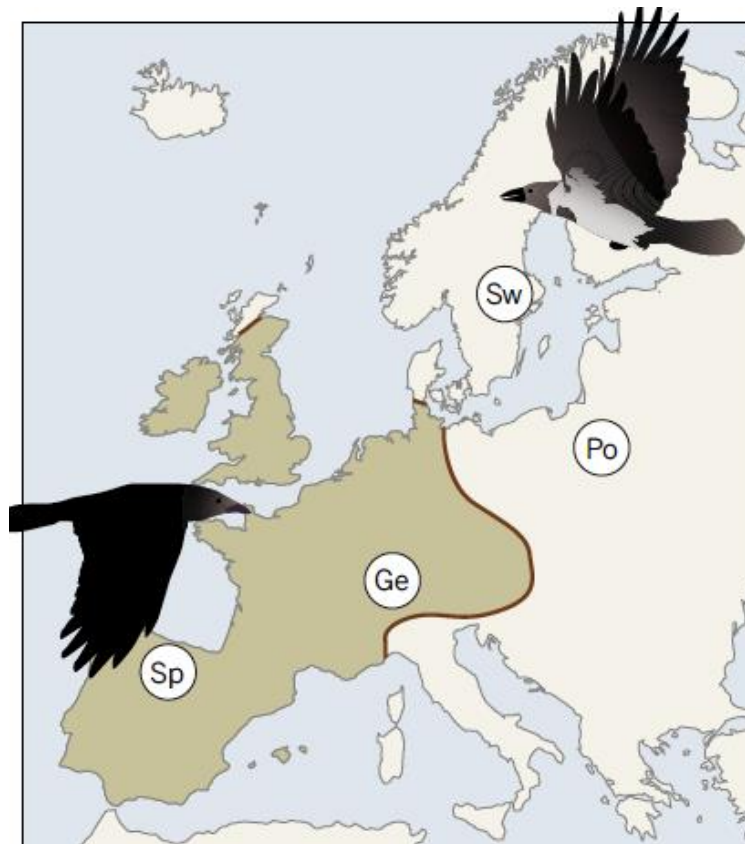


Figura 1. Distribución europea y fenotipos aproximados de las cornejas negra (izquierda) y cenicienta (derecha). Tomado de De Knijff (2014).

JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA DEL PRESENTE TFG

En las poblaciones de corneja ibérica existe cooperación dentro del grupo familiar. Se forman familias estables porque los hijos retardan la dispersión natal y se quedan con los padres. Sin embargo, esto no quiere decir que todos tengan exactamente los mismos intereses. Es decir, hay cooperación, pero puede que haya algún que otro conflicto. Uno de estos conflictos podría generarse a la hora de invertir más o menos recursos en los hijos de

diferentes sexos. Las cornejas son capaces de sesgar la proporción de hembras y machos (*sex ratio*) de sus polladas, bien de manera primaria (selección por parte de la hembra antes de la eclosión de los huevos), o bien de modo secundario en función del sexo de los pollos que finalmente abandonen el nido (Canestrari et al. 2012).

La *sex ratio* secundaria depende de cómo los individuos del grupo reparten la comida entre los pollos del nido, favoreciendo la supervivencia de uno u otro. La progenie masculina es la que con más frecuencia retarda la dispersión, convirtiéndose en ayudantes para la cría de nuevos pollos. A la hembra (y quizás también al macho reproductor) le podría interesar una mayor proporción de progenie masculina para garantizarse la ayuda. Sin embargo, para los miembros subordinados del grupo, más machos significa más competencia para quedarse en territorio de los padres. Por tanto, estos hijos podrían estar más interesados en una mayor proporción de hembras (que dispersarán con mayor probabilidad) como resultado de la siguiente puesta. Asimismo, existe una influencia del ambiente en la *sex ratio*: criar pollos machos es más costoso que criar pollos hembra, por tanto, cuando las condiciones ambientales son adversas, la proporción de hembras es mayor (Canestrari et al. 2012).

El Dr. Baglione y su equipo desean ahondar en cómo los miembros del grupo distribuyen la comida entre los diferentes pollos en el nido y si existen diferencias en función del sexo y categoría de los cuidadores (*breeder vs helpers*), así como al considerar sexo y edad de los pollos en el nido (la eclosión en la corneja es asincrónica, más o menos un pollo por día, así que hay diferencias de edad bastante importantes en cada pollada). Es por ello necesario el sexado de todos los individuos del grupo y de los pollos que crían que se unirán a los datos de comportamiento en el nido, que se obtienen con videocámaras y que se analizarán separadamente.

Corvus corone es una de las aves más abundante de la Península Ibérica, hallándose la población estudiada por el equipo del Dr. Baglione en la provincia de León. La corneja negra se caracteriza por un color negro intenso, tanto en el plumaje como en las patas y en el pico; su longitud es de aproximadamente 50 cm y su peso como adulto es de 500 g. Su cola es más cuadrada que en los grandes córvidos. Es una especie capaz de explotar todo tipo de hábitat, si bien muestra preferencia por zonas abiertas como pastizales o cultivos. Posee una dieta omnívora, pudiendo consumir desde frutas hasta pequeños vertebrados. No existe dimorfismo sexual, más allá de sutiles diferencias en la medida del tarso (poco visible si no es medida con un calibre) y de algún comportamiento de cría. Por lo que, salvo que se observe a un individuo poniendo huevos, no se puede saber a simple vista si se trata de un sexo o de otro (Boloipo et al. 2015 y referencias incluidas).

SEXADO MOLECULAR EN AVES

La determinación molecular del sexo en aves se basa en su sistema de determinación sexual, basado en dos cromosomas sexuales: el Z y el W. El sexo heterogamético (ZW) es el femenino, al contrario de lo que sucede en mamíferos, siendo el homogamético (ZZ) el masculino (revisado por Matta Camacho et al. 2008). Por tanto, el sexado molecular en aves, utiliza marcadores moleculares presentes en ambos cromosomas sexuales pero que permiten diferenciar un individuo ZZ de un ZW.

En ambos cromosomas sexuales encontramos el gen *CHD1*, que es la base de los sexados moleculares en casi todas las aves. Griffiths et al. (1996) lo dividen en tres regiones.

-Cromodominio: tiene una secuencia similar a la de algunas proteínas de represión génica y se cree que podría estar asociado con la condensación de cromatina.

-Helicasa/ATPasa: similar a las proteínas humanas SNF 2, descondensan la cromatina.

-Motivo de unión al ADN: rico en A-T.

Existen varios protocolos “universales” para el sexado molecular en aves no ratites. Los más utilizados son: por un lado, los *primers* de Griffiths et al. (1998): P2 y P8; por otro lado las diversas parejas de *primers* publicados por Ellegren & Fridolfsson (1997) y Fridolfsson & Ellegren (1999). Ambos grupos de investigación sexaron en estos trabajos especies de la familia Corvidae: *Corcorax melanorhamphos* y *Corvus corax*, por lo que constituyeron en su momento una buena referencia para el sexado de esta especie. La Dra. Vila utiliza rutinariamente las parejas P2/P8 y 3007/3112 (Ellegren & Fridolfsson 1997) para sexar individuos de *Corvus corone* dentro del marco de una fructífera colaboración con el Dr. Baglione que se remonta al año 2008. Ambos protocolos amplifican distintos intrones (Figura 2). La posición exacta de dichos *primers* respecto al genoma de *Corvus cornix* (NW_010959695.1 Unplaced Scaffold Reference Hooded_Crow_genome Primary Assembly) es:

- primer 3007: 1405849:1405868, exón 19;
- primer 3112: 1405533:1405549, exón 20;
- primer P8: 1404210:1404230, exón 22;
- primer P2: 1403787:1403897, exón 23.

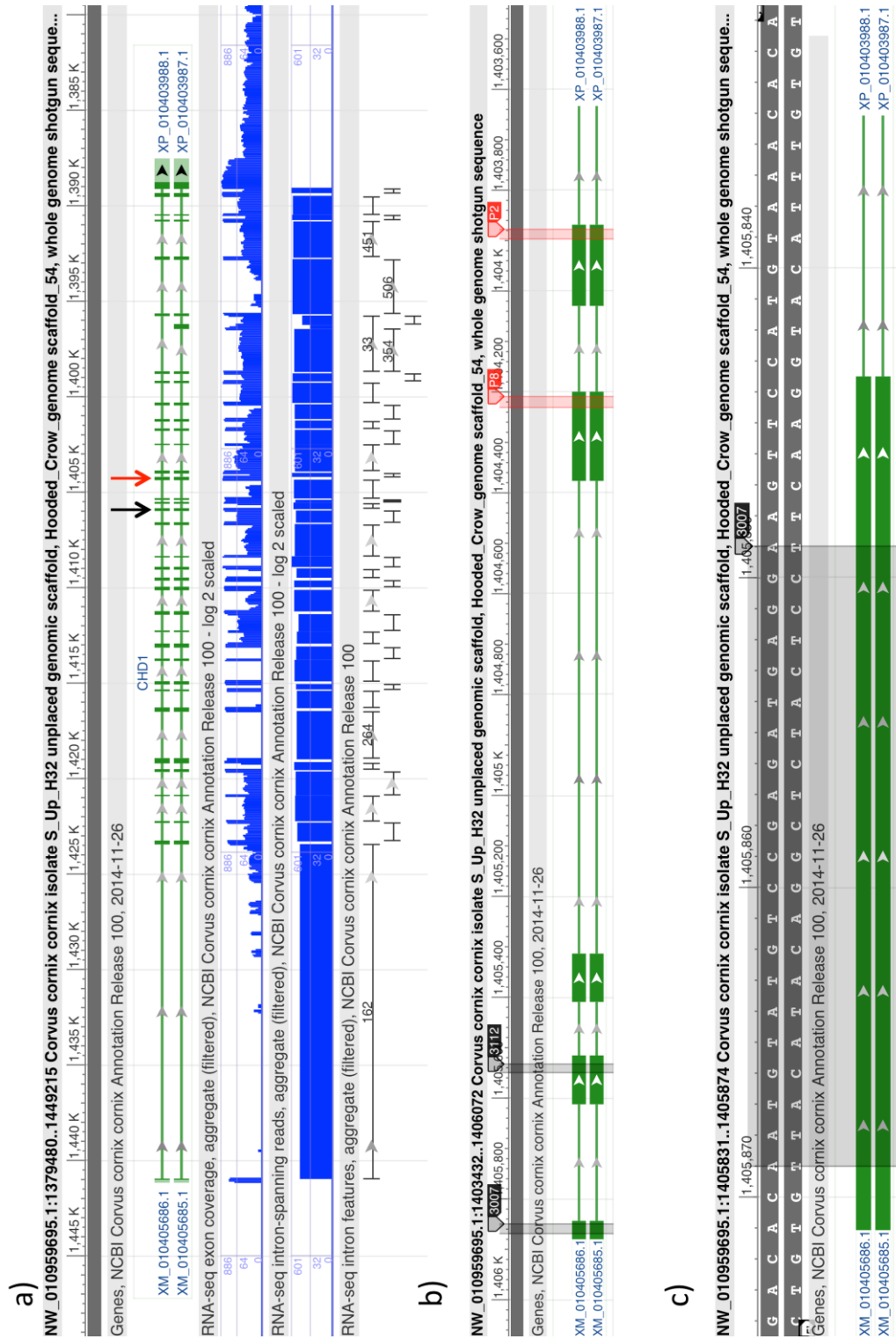


Figura 2. Regiones del gen *CHD1* analizadas en el presente TFG. (a) El gen *CHD1* de *Corvus cornix* está compuesto por 36 exones (véase <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/104693191>). Las fechas verticales izquierda y derecha indican la posición de los exones 19 y 22, respectivamente; (b) detalle de las dos regiones amplificadas mediante los protocolos de Ellegren & Fridolfsson (1997) y Griffiths et al. (1998); (c) detalle del alineamiento del *primer* 3007, localizado en el exón 19 (elaboración propia).

La amplificación de estos fragmentos tiene lugar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores (*primers*) son fragmentos cortos (20 pb aproximadamente) de secuencia conocida, que hibridan durante la fase de anillamiento (*annealing*) en zonas del ADN problema donde presentan complementariedad de bases, marcando el lugar de inicio para la acción de la ADN-polimerasa. El anillamiento es posible porque previamente ha habido una fase de desnaturalización (*denaturing*) que ha separado las dos hebras de la molécula de ADN. Durante la llamada fase de extensión (*extension*) esta enzima procede a la replicación del ADN añadiendo secuencialmente las bases complementarias a las del fragmento de ADN molde. Este proceso se repetirá durante un número determinado de ciclos.

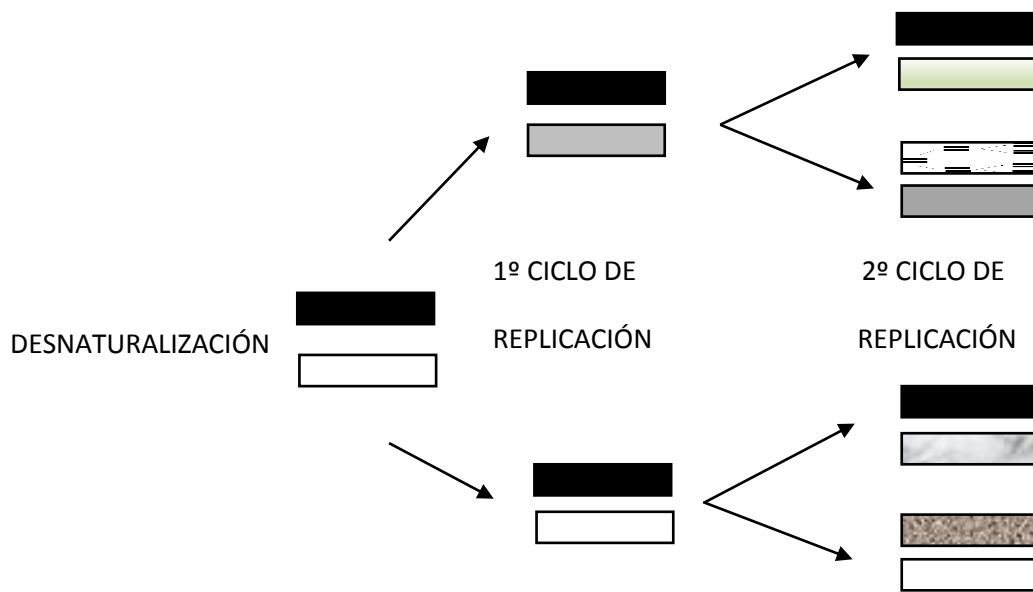


Figura 3. Esquema de la replicación de las hebras de ADN durante dos ciclos de una PCR (elaboración propia).

Tras la amplificación del marcador objeto de estudio (en este caso, distintos intrones del gen *CHD1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/395783>), el gel de electroforesis revelará un patrón de bandas distinto para cada uno de los sexos: dos bandas diferenciadas en la hembra heterogamética (correspondientes con distintos tamaños del intrón en los cromosomas W y del Z) y una única banda en el macho homogamético puesto que el intrón amplificado en ambos cromosomas Z es similar. Las diferencias de tamaño entre las regiones intrónicas homólogas entre cromosoma W y Z son debidas a mutaciones de tipo inserción/delección (*indels*).

Existe la posibilidad de que una hembra presente un único producto de PCR (banda amplificada) y sea asignada erróneamente al sexo masculino. Dos de las posibles razones de que esto ocurra son: la existencia de alelos nulos y la amplificación preferencial. Se habla de alelo nulo cuando existe una mutación en la región donde debería anillar un *primer* que impide la amplificación. Debido a los mecanismos de evolución que pueden afectar de modo diferenciado a ambos cromosomas sexuales, es factible el anillamiento de la pareja de primers en uno pero no en otro de los cromosomas sexuales, obteniéndose por tanto una única banda aún cuando existen dos alelos para esa región genómica. En la amplificación preferencial se amplifica uno de los alelos con mucha mayor eficiencia/intensidad. Debido a procesos de mutación o a regiones ricas en guanina/citosina, el producto del alelo del gen *CHD-Z* es menor que el del *CHD-W* y puede amplificarse de manera preferencial (Robertson & Gemmel 2006). Distintos autores recalcan la necesidad de confirmar los sexados moleculares de machos mediante la amplificación de otro marcador ligado a cromosomas sexuales.

Las aves del grupo ratites (miembros no voladores del superorden Palaeognathae), como el avestruz, el emú o el ñandú, son una excepción puesto que sus cromosomas Z y W son homomórficos y no es posible la determinación sexual de los individuos mediante la utilización del gen *CHD1*, habiéndose desarrollado marcadores propios para este grupo (Huynen et al. 2002). En el resto de las aves el cromosoma W, heterocromático casi en su totalidad, es mucho más pequeño. De hecho, el cariotipo de la corneja está compuesto por 80 cromosomas ($2n = 80$), de los cuales seis pares de autosomas y el cromosoma Z están clasificados como macrocromosomas (Roslik & Kriukov 2001).

OBJETIVOS

1. Sexar una serie de 49 muestras sanguíneas de corneja negra (*Corvus corone*) mediante métodos de Genética Molecular.
2. Calcular el coste de dicho encargo y compararlo con los precios ofertados en España por distintas empresas e instituciones.
3. Optimizar el protocolo de sexado en aves utilizado por la tutora de este TFG hasta la fecha.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recibieron 58 muestras de sangre conservadas en etanol 95%. Es de señalar la ventaja de utilizar sangre como material de partida para la extracción de ADN genómico en aves, ya que sus eritrocitos son nucleados. Sin embargo, también es posible obtenerlo a partir de las cáscaras de huevos o de las plumas. Cada muestra fue extraída de la vena braquial de un individuo diferente. En esas 58 muestras están incluidos nueve individuos de sexo conocido (5 machos y 4 hembras) para ser utilizados como control positivo. Las hembras control están sexadas por presencia de la placa incubatriz (piel carente de plumas, que se encuentra en el vientre de las hembras) durante el período reproductor y su comportamiento de incubación de los huevos (exclusivo de las hembras). Los machos por ausencia de estos caracteres y determinados rasgos comportamentales, i.e. pertenecían todos a parejas sin ayudantes, de forma que, de no ser hembras, sólo podían ser los machos reproductores. Las longitudes de tarso obtenidas para estos nueve individuos control fueron, asimismo, consistentes con el sexo atribuido.

Tras la recepción de las muestras se procede a la fase de extracción del ADN. En esta fase se sigue el protocolo de extracción que marca el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Las principales modificaciones sobre protocolo sugerido por el fabricante han sido:

- Reducción del tiempo de incubado. Tras la adición a la muestra del primer buffer (*Tissue Lysis Buffer*) y del segundo (*Binding Buffer*) se debe proceder a una incubación de tres horas. En este caso, como se trata de sangre, “tejido blando” de fácil disgregación, se redujo el tiempo de incubación a 1 hora.
- Obtención de un volumen final de 100 μ L para cada extracción. Se realizaron varias extracciones de prueba con muestras que contenían gran cantidad y mínimo volumen de sangre, procediendo a realizar las dos últimas centrifugaciones del protocolo con 50 y 100 μ L de buffer de elución (volumen total 100 y 200 μ L, respectivamente). Una vez obtenidas las concentraciones y calidad de dichas extracciones, se optó por realizar las dos últimas centrifugaciones con 50 μ L de buffer de elución.

Tras la fase de extracción se midió de la cantidad y calidad del ADN genómico obtenido para cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.), que mide las absorbancias a 230 nm, 260 nm y 280 nm (Figura 4). Los cocientes 260/280 y 260/230 (*ratios*) se utilizan para saber el grado de pureza en que se encuentra el ADN de la muestra. Una ratio 260/280 de 1,8 o superior indica elevada pureza del ADN, siendo 2 el valor indicativo para ARN. Que la ratio sea apreciablemente menor puede

indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben en torno a 280 nm. La ratio 260/230 es un indicador secundario, considerándose como ADN de gran calidad aquel con valores en torno a 2-2,2. El que esta ratio sea menor, puede indicar la presencia de un contaminante co-purificado, como por ejemplo el EDTA, utilizado en la composición de múltiples tampones de extracción y que presenta una gran absorbancia en torno a 230 nm (Thermo Scientific 2010).

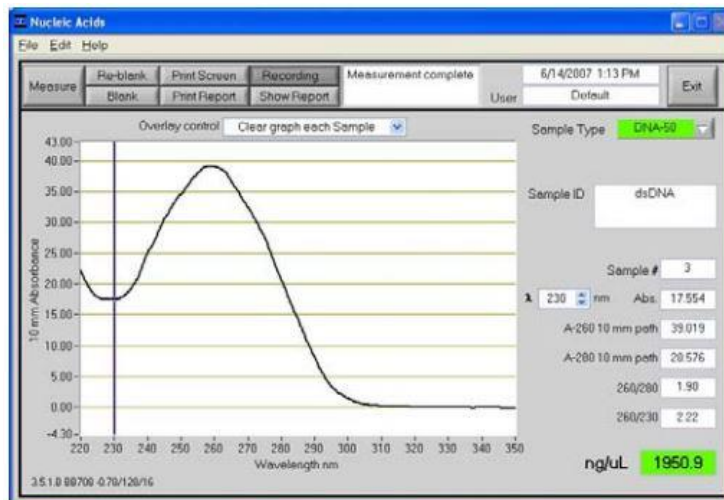


Figura 4. Patrón espectral esperado para un ADN puro. Imagen obtenida del manual de uso del NanoDrop 1000 v3.7.

Análisis del gen *CHD1*

Se amplificaron dos regiones del gen *CHD1* mediante sendas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Siguiendo los protocolos utilizados por la tutora del presente TFG, ambas amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L que contenía 1X PCR Buffer (5 PRIME), 3,15 mM $MgCl_2$, 1 U TaqADN Polymerasa (5 PRIME), 0,225 mM de cada dNTPs, 1 μ M de cada cebador (*primer*) y entre 30 y 800 ng de ADN.

En una primera fase, se realizaron dos PCR con diferentes parejas *primers* para cada muestra. Una primera PCR con los *primers* P2 (5'-TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT-3') y P8 (5'-CTC CA AGG ATG AGR AAY TG-3') (Griffiths et al. 1998). La letra R indica que en esa posición puede anillar tanto una guanina como una adenina (purina), mientras que la letra Y indica que puede anillar con una citosina o una timina (pirimidina). El programa del termociclador consistió en

una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min; 35 ciclos de repeticiones de 45 s a 45°C, 45 s a 68°C, 30s a 94°C, 1 in a 45°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 68°C.

Los *primers* utilizados para la segunda PCR fueron 3007 (5'-TAC ATA CAG GCT CTA CTC CT-3') y 3112 (5'-CCC CTT CAG GTT CTT TAA AA-3') (Ellegren & Fridolfsson 1997). El programa de termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 95° durante 2 min 30s 35 ciclos de repeticiones de 35 s a 95°C, 35s a 45°C, 40s a 68°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 68°C.

En una segunda fase, se procedió a sexar dos individuos con fallos repetidos mediante Griffiths et al. (1998) utilizando las parejas de primers *sex1'*-*sex2* y *sex1'*-*sexmix*, diseñados para Passeriformes y probados en individuos de *Corvus corone* (Wang & Zhang 2009, Wang et al. 2010) *sex1'* (5'-CTC CCA AGG ATG AGA AAC TGT GCA AAA CAG-3'), *sex2* (5'-CCT TCA CTT CCA TTA AAG CTG ATC TGG AAT TTC-3') y *sex-mix* (5'-CCT TCR CTK CCA TTR AAG CTR ATC TGG AAT-3'). Estas amplificaciones también se realizaron en un volumen final de 20 µL que contenía 1X PCR Buffer (5 PRIME) (que ya contiene MgCl₂, siendo la concentración final de este compuesto de 2,5 mM en el tubo reacción), 1 U Taq polimerasa (5 PRIME), 0,225 mM de cada dNTPs, 1 µM de cada *primer* y entre 114 y 257 ng de ADN. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min 30s; 35 ciclos de repeticiones de 30s a 94°C, 45s a 50°C, 30s a 68°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 68°C.

Los productos de las diferentes PCR se sometieron a electroforesis (90 V durante 50 min) en gel de agarosa (3% en 1XTAE [Tris-acetato 40 mm PH 8, EDTA 1 Mm]) teñido con RedSafe™ 20.000X (iNtRON Biotechnology, Inc.) (1,5 µL de tinción por cada 30 ml de gel). Se incluyó un marcador comercial GeneRuler™ 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific) 0,1 µg/µL, que permitió calcular el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados. El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta.

Al tratarse de un TFG cuyos resultados serán utilizados en investigación, se tomaron una serie de precauciones que aseguren la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.

1. Inclusión de controles negativos en las reacciones de PCR.
2. El 38% de los análisis (extracciones de ADN genómico y PCRs) fueron replicados por la tutora del presente TFG.
3. Utilización por parte de la alumna de puntas de micropipeta con filtro.

Todos los productos de PCR fueron enviados a los *Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) da Universidade da Coruña*, para ser procesados en un Agilent 2100 Bioanalyzer, con el

fin de registrar el tamaño de banda con una mejor resolución, de hasta 5 pb. En el Bioanalyzer se insertan unos chips formados por 12 pocillos, donde se inocula una mezcla formada por un polímero y un fluoróforo (Figura 5). El fluoróforo contiene dos marcadores el upper (marca 1500 pb) y el lower (marca 15 pb) que le sirven al propio instrumento como referencia. Tras la lectura realizada por el láser, el software elabora una recta de calibrado, donde se van extrapolando los valores de las muestras. Esta técnica permitió revelar correctamente bandas con escasa visibilidad en el gel de agarosa.

A.

B.

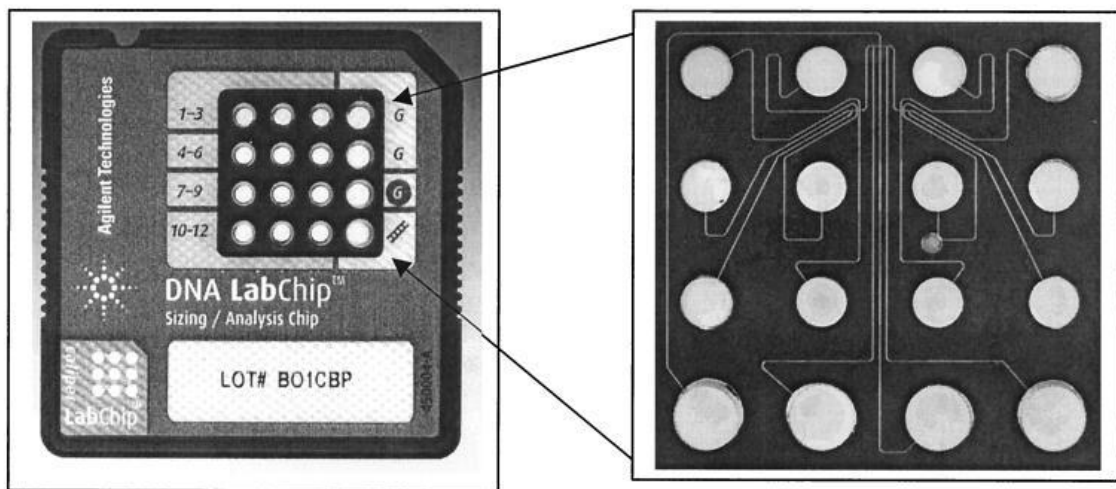


Figura 5. Ejemplo de chip del Agilent 2100 Bioanalyzer. (A) Vista en planta de un chip donde se aprecian los 12 pocillos para cargar muestras y los 4 correspondientes al marcador de tamaño. (B) El chip realiza electroforesis capilar en una serie de micro canales. Tomado de Nachamkin et al. (2001).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Sexado de 49 muestras sanguíneas de *Corvus corone* utilizando 9 individuos control.

Como era previsible, las primeras extracciones realizadas por la alumna presentaron una menor concentración/calidad que las realizadas por la tutora. Una vez que las extracciones realizadas por ambas fueron similares, la alumna procedió a realizar el resto de extracciones. No se apreció ninguna discrepancia entre los resultados de amplificaciones realizadas por la alumna y por la tutora. Ninguno de los controles negativos produjo amplificación.

La calidad y cantidad del ADN extraído fue muy variable, si bien todas las muestras rindieron productos de PCR. Las concentraciones variaron entre 14 y 469 ng/uL, mientras que los rangos para las ratios fueron de 1,6-2,3 para 260/280 y 0,9-2,8 para 260/230 (Tabla 1).

Se consiguió sexar a todos los individuos problema y control. La utilización de los *primers* P2/P8 y 3007/3112 permitió sexar congruentemente a un 93% de los individuos, correspondiendo el 7% restante a muestras dudosas (v.g. CC21) o a resultados contradictorios entre ambos métodos (CC4, CC34 y CC36, Tabla 1). En esos casos se repitieron las PCRs. Las muestras CC4 y CC36 pudieron ser inequívocamente sexadas como hembras al obtenerse resultado de dos bandas en tres de las cuatro amplificaciones realizadas. Es decir, únicamente una de las cuatro amplificaciones produjo resultado de una única banca, siendo achacable tal resultado a un fallo puntual en la PCR (i.e. *allelic dropout* con la pareja de primers 3007/3112 para CC4 y con la pareja P2/P8 para CC36).

Las muestras CC21 y CC34 presentaron problemas de repetibilidad en relación al fragmento P2/P8. Inicialmente, el individuo CC21 presentó amplificación positiva para ambos marcadores. Sin embargo, la existencia de una segunda banda, muy tenue, en el rango de tamaño de la correspondiente al cromosoma W al ser amplificada por P2/P8 hizo necesaria su confirmación. La muestra CC34 ofreció inicialmente resultados contradictorios: hembra según Griffiths (Figura 6), pero macho según Ellegren (Figura 7). Nuevamente, hubo problemas para repetir la amplificación de su fragmento P2/P8 y proceder a la confirmación del sexo femenino.

Debido a estos problemas, CC21 y C34 fueron amplificadas, junto con una serie de controles, utilizando dos parejas de *primers* desarrollados para Passeriformes para esa misma región del gen *CHD1* por Wang et al. (2010). Dicho procecimiento permitió asignar a

ambos individuos inequívocamente como machos, siendo este resultado congruente con el proporcionado por la pareja 3007/3112 (Figura 8).

Tabla 1. Concentración y calidad del ADN obtenido, sexo asignado por cada uno de los métodos moleculares y chip de Bioanalyzer donde se registró dicho resultado (Apéndice). El sexo se codificó como M (macho, *male*) o F (hembra, *female*). Los códigos CC1M, CC6M, CC10M, CC14F, CC18F, CC22F, CC41M y CC46M corresponden a los individuos control.

Código muestra	ng/uL	260/280	260/230	Sexo Griffiths	CHIP	Sexo Ellegren	CHIP	RESULT. FINAL
CC1M	78,95	1,9	2,43	M, M	1,3	M	1,4	M
CC2	176,88	1,6	0,89	F	3	F,F	2,4	F
CC3	76,78	1,76	1,21	M	3	M	4	M
CC4	73,56	1,96	2,22	F, F	3, 11	M, F	4,12	F
CC5	110,2	1,66	1,05	M	2	M	4	M
CC6M	226,16	1,88	2,18	M, M, M	1, 2,3	M,M,M	1,2,4	M
CC7	237,95	1,89	1,85	M	3	M	4	M
CC8	39,91	1,71	1,22	F	3	F	4	F
CC9	116,42	1,97	2,32	M	3	M	4	M
CC10M	200,3	1,89	2,33	M, M	1, 2,3	M,M,M	1,2,4	M
CC11	140,63	1,69	0,94	M	3	M	4	M
CC12	195,5	1,61	0,83	M	3	M	4	M
CC13	163,39	1,69	1,03	M	5	M	6	M
CC14F	172,89	1,89	2,26	F, F, F	1, 2, 5	F,F,F	1,2,6	F
CC15	36,75	1,89	2,63	F	5	F	6	F
CC16	55,07	1,91	2,25	F	5	F	6	F
CC17	90,44	1,88	2,09	M	5	M	6	M
CC18F	147,32	1,88	2,34	F	5	F	6	F
CC19	63,25	1,75	1,49	M	5	M	6	M

CC20	52,49	1,93	2,7	M	5	M	6	M
CC21	114,69	1,87	2,38	M?, M	5, 14	M, M	6, 14	M
CC22F	102,92	1,83	2,02	F, F, F	1, 2, 5	F,F,F	1,2,6	F
CC23	92,38	1,88	2,47	M	5	M	6	M
CC24	14,48	1,81	1,53	F	5	F	6	F
CC25	23	1,96	2,77	M	7	M	8	M
CC26	46,75	1,97	2,25	M	7	M	8	M
CC27	46,22	1,93	2,14	M	7	M	8	M
CC28	112,75	2	2,47	M	7	M	8	M
CC29	388,09	1,86	2,04	F	7	F	8	F
CC30	457,53	1,88	2,12	M	7	M	8	M
CC31	316,79	1,87	2,28	F	7	F	8	F
CC32	117,92	1,87	1,97	M	7	M	8	M
CC33	82,92	1,8	1,34	M,M	7, 11	M	8	M
CC34	257,25	1,88	2,37	F, ?	7, 13	M,M	8, 12	M
CC35	84,2	1,79	1,41	F	7	F	8	F
CC36	184,19	1,89	2,3	M, F	7, 13	F,F	8, 13	F
CC37	71,99	1,87	2,03	M	9	M	10	M
CC38	138,3	1,91	2,2	F	9	F	10	F
CC39	40,76	2,02	1,72	F	9	F	10	F
CC40F	220,6	1,87	2,35	F, F, F	1, 2, 9	F,F,F	1,2,1 0	F
CC41M	171,21	1,88	2,31	M	9	M	10	M
CC42	285,12	1,9	2,29	F	9	F	10	F
CC43	411,14	1,88	2,23	F	9	F	10	F
CC44	74,34	1,92	2,32	M	9	M	10	M
CC45	159,38	1,89	2,36	M	9	M	10	M
CC46M	58,54	1,84	2,04	M	9	M	10	M
CC47	187,58	1,89	2,35	F	9	F	10	F
CC48	77,39	1,97	2,2	F	9	F	10	F

CC49	65,67	1,92	1,5	F	11	F	12	F
CC50	217,96	2,305	1,89	F	11	F	12	F
CC51	107,26	1,88	2,42	F	11	F	12	F
CC52	171,44	1,85	2,02	M	11	M	12	M
CC53	468,73	1,84	2,08	F	11	M	12	M
CC54	199,02	1,79	1,49	F	11	F	12	F
CC55	453,87	1,86	2,29	F	11	F	12	F
CC56	106,33	1,62	0,95	M	11	M	12	M
CC57	143,9	1,93	0,93	M	11	M	12	M
CC58	59,08	2,01	2,33	M	11	M	12	M

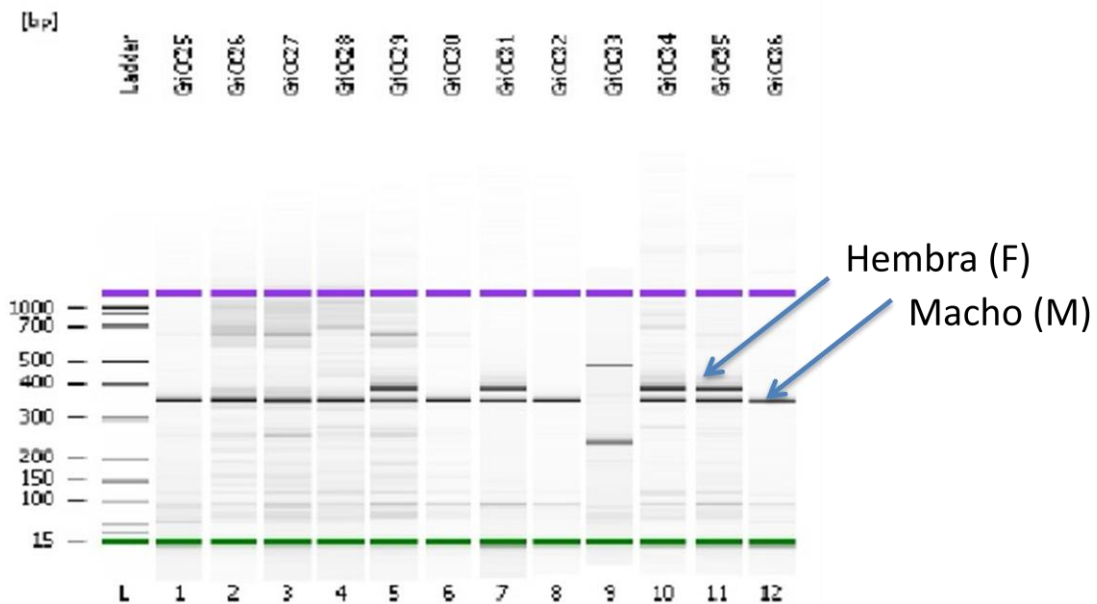


Figura 6. Productos de PCR de 12 individuos amplificados mediante el protocolo de Griffiths et al. (1998) y revelados mediante Bioanalyzer. Cuatro individuos serían según este marcador hembras, presentando dos bandas (400 y 350 bp aproximadamente). Las demás muestras solo presentan la banda en torno a 350 bp, por lo que se les asignaría sexo masculino. En la muestra GRIC33 (carril 9) no hay producto en torno al tamaño esperado, por lo que se ha de proceder a la repetición de la amplificación.

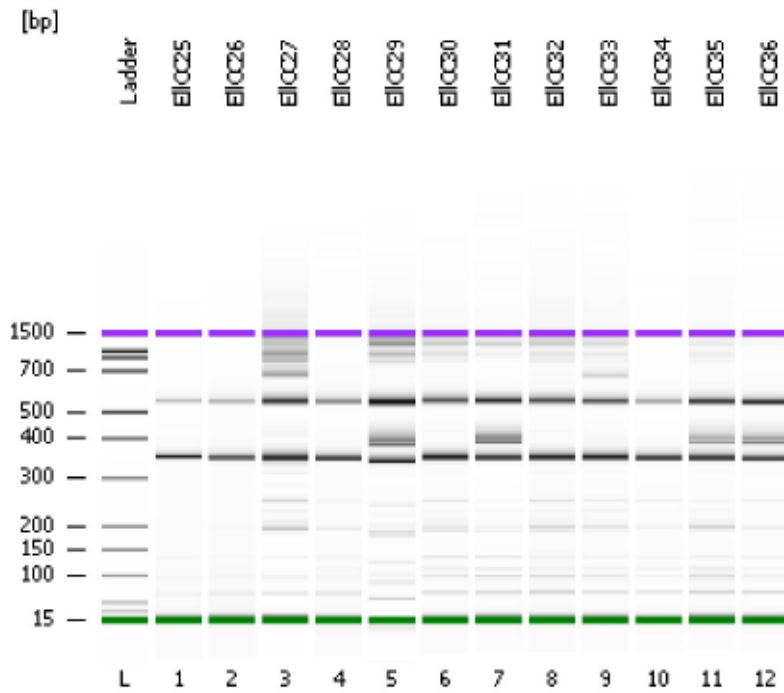


Figura 7. Productos de PCR de 12 individuos amplificados mediante el protocolo de Ellegren & Fridolfsson (1997) y revelados mediante Bioanalyzer. Los carriles 5, 7, 11 y 12 corresponden con hembras, ya que se observan dos bandas (400 y 350 pb respectivamente).

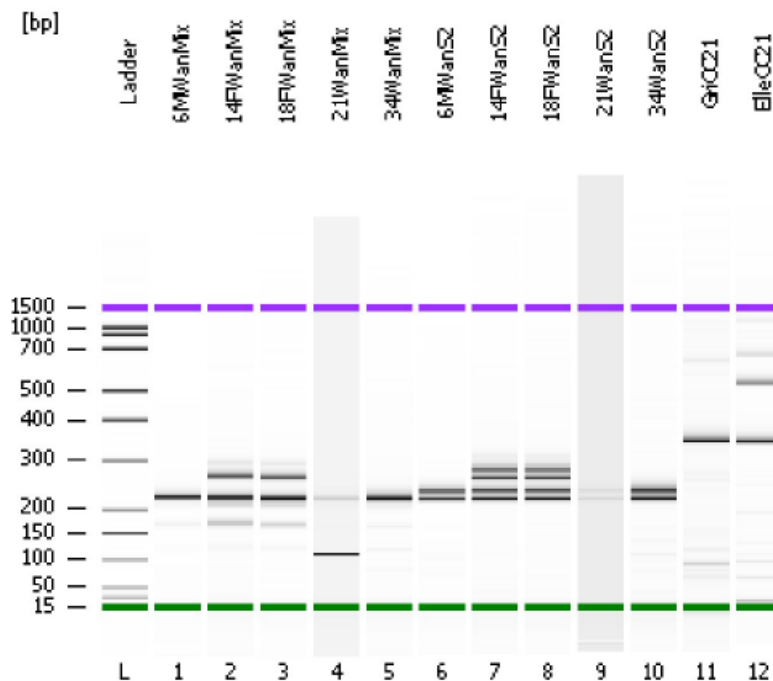


Figura 8. Productos de PCR de tres controles (CC6 macho, CC14 hembra y CC18 hembra) y dos individuos problema (CC21 y CC34) amplificados mediante las dos parejas de primers desarrolladas por Wang et al. (2010) y revelados mediante Bioanalyzer. Carriles 1- 5:

amplificaciones realizadas con los *primers sex1'/sexmix*. Carriles 6-10: amplificaciones realizadas con los *primers sex1'/sex2*. Los carriles 11 y 12 muestran las repeticiones de CC21 mediante P2/P8 y 3007/3112, respectivamente. En los carriles 4 y 9 se aprecia un color de fondo más intenso debido a la posible saturación de sales durante la PCR.

2. Comparación entre coste del sexado molecular realizado en el presente TFG y presupuestos ofertados por distintas empresas e instituciones españolas.

Los precios por muestra ofertados por distintas empresas e instituciones españolas varían entre 3,9 y 15,75 €/muestra (IVA incluido). A este importe ha de sumársele en algunos casos el servicio de envío de muestras al laboratorio. Algunos proveedores ofertan mejores precios en función del número de muestras a analizar (Tabla 2).

Tabla 2. Laboratorios que realizan sexado molecular y precios ofertados en diciembre de 2015.

EMPRESA	PRECIO/INDIVIDUO	TRANSPORTE	Fuente
	(€, IVA INCLUIDO)	(€)	
Estación Biológica de Doñana (CSIC)	9,5	No detallado	http://www.ebd.csic.es/documentos/29927/33715/instrucciones_SEX_ADO.pdf/edbf7e39-86ca-4acd-b438-a80e4c7bf6c3
Iberogen	6,5 5,20 (Bono 10) 3,90 (Bono 20)	6,90	http://iberogen.es/sexadodeaves/
LARCO	6,05	5,02	https://canaricultores.wordpress.com/2014/10/02/larco-sexaje-de-aves-por-tecnica-de-biologia-molecular-pcr/
Vetorni	9	6,14	http://www.vetorni.com/content/12-sexaje-de-aves

Analytical Biotech	15,75	Incluido en Tenerife	https://analyticalbiotech.wordpress.com/sexado-de-aves/
		No detallado estatal	

El sexado molecular realizado para el presente TFG ha supuesto un coste de 7,37 € por muestra (Tabla 3). Es práctica habitual de los laboratorios sumar un 10% del coste para cubrir gastos de repeticiones debidas a fallos. Dicha corrección implicaría un coste de 8,11 €/muestra. Dicho importe podría rebajarse en 2,58 € si los resultados no fuesen enviados a Bioanalizador, sino simplemente registrados en gel de agarosa al 3%. A dicho importe habría de sumársele el coste de personal. Una estima preliminar del coste para la empresa de 8 horas de trabajo de un contratado/a con el nivel de Grado/Licenciatura sería 38,3 € según convenio (S.C.A. Alimentya S.L, comunicación personal). Sería necesario un mayor detalle sobre las actividades del laboratorio ya que en esas 8 horas de trabajo, la persona realizaría simultáneamente otras labores no relacionadas con el sexado molecular. El cálculo del presente presupuesto no contempla gastos comunes como electricidad, agua, alquiler de local ni el coste del aparataje necesario para el procedimiento (v.g. centrífuga, fotodocumentador).

Tabla 3. Estimación del material utilizado para sexado molecular en el presente TFG (elaboración propia).

Extracción ADN genómico 10 muestras	N o cantidad	Precio en € (IVA incluido)	
Kit High Pure Roche		10	34,49
Tubo Eppendorf 1,5 uL		20	0,15
Isopropanol	100 uL		0,02
Etanol para rellenar tubos muestra	500 uL		0,03
Puntas micropipeta pequeñas		0	0
Puntas micropipeta medianas		40	0,18
Puntas micropipeta grandes		51	0,36
Guantes nitrilo		4	0,31

Total extracción 10 muestras		35,54
------------------------------	--	-------

Precio unitario extracción	3,55
---------------------------------------	-------------

Electroforesis 19 muestras + ladder

Agarosa (gel 30 ml)	0,3 g		0,22
TAE	20 geles = 1,69 euros aprox		0,08
Ladder			0,67
Papel bobina (limpieza fotodocumentador)	2 trozos		0,02
Alcohol (limpieza fotodocumentador)	10 mL		0,03
Guantes nitrilo		4	0,31
Puntas micropipetas pequeñas		1	0,02
Puntas micropipeta medianas		31	0,14
Total electroforesis 19 muestras + ladder			1,49

Precio unitario electroforesis	0,08
---	-------------

PCR 10 muestras

Tubo Eppendrof 0,2 uL		10	0,5
Tubo Eppendrof 0,5 uL (mastermix)		1	0,04
Puntas micropipeta pequeñas		11	0,19
Puntas micropipeta medianas		15	0,07
Puntas micropipeta grandes		2	0,01
Taq+Dntp	1 uX10		3,5
Primer1+Primer2		0,13	1,3
Guantes nitrilo		2	0,16
Total PCR 10 muestras 1 pareja primers			5,77

Precio unitario PCR 2
parejas de primers 1,15

Bioanalizador (SAI, Tarifa UDC)

Chip 12 muestras	31
Precio unitario bioanalizador	2,58
PRECIO/MUESTRA	7,37

El valor de 8,11 € (teniendo en cuenta las repeticiones) se encuentra dentro del rango de los precios ofertados. Es de tener en cuenta que la situación en la que se encuentre cada laboratorio hará que el precio se abarate o se encarezca.

3. Optimización del protocolo de sexado molecular de *Corvus corone* realizado hasta la fecha por la tutora del presente TFG.

Como optimización resultante del presente TFG, ambas reacciones de amplificación (*primers* P2/P8 y 3007/3112) han podido ser realizadas con el mismo programa de termociclador: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min 30s; 35 ciclos de repeticiones de 30s a 95°C, 30s a 45°C, 30s a 68°C, seguidos de una extensión final de 5 min a 68°C. Esto supone una disminución del 26% en el tiempo de procesado de las muestras a sexar, asumiendo 3 horas para extracción, 2,5 horas para PCR (P2/P8), 2,5 horas para PCR (3007/3112) y una hora para electroforesis.

Se incorporó al laboratorio de la tutora un protocolo alternativo al sexado con P2/P8 (Griffiths et al. 1998) a raíz de la necesidad de confirmar el sexo de las muestras CC21, CC34 y CC36. El protocolo de Wang et al. (2010) se ha desarrollado para mejorar el sexado con P2/P8 en el orden Passeriformes, por lo que es más específico, que los otros dos protocolos. Contempla dos parejas posibles de primers, sex1'-sex2 o sex1'-sex-mix que amplifican el mismo intrón que P2/P8. Los autores apuntan que las amplificaciones preferenciales se minimizan con el uso de la primera pareja (sex1'-sex2).

Por último, decir que se valoró la formación de heterodúplex como posible causa de la incongruencia inicial entre los sexados proporcionados por ambos métodos en las muestras CC4, CC21, CC35 y CC36. Estos heterodúplex (molécula de ADN que se forma por hibridación

de dos hebras complementarias con diferente origen) se forman por pequeñas deleciones en el cromosoma Z, que hacen que ambos cromosomas Z de un macho se alineen juntos durante la PCR. En el gel de agarosa se verán dos bandas debido a que las moléculas que conforman el heterodúplex migran menos en el gel (tienen mayor peso molecular) y constituyen una banda espúrea, mientras que las moléculas que no lo conforman migran de manera normal, formando la banda correspondiente al cromosoma Z real. El resultado es el sexado erróneo de un macho como una hembra (Casey et al. 2009) (Figura 9). Los resultados obtenidos en el presente TFG no muestran evidencia de heterodúplex, ya que (1) las segundas bandas (indicativas de hembra) se encontraron siempre en el rango de tamaño esperado para el cromosoma W y (2) todos los sexados pudieron ser confirmados mediante un segundo protocolo que amplificaba una región distinta del gen *CHD1*.

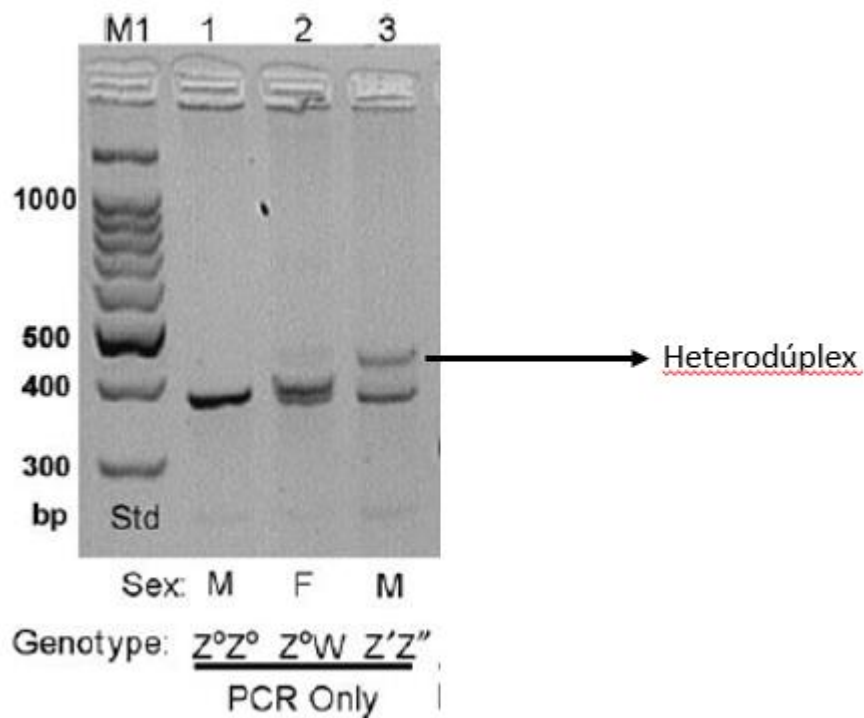


Figura 9. Resultado de la electroforesis realizada tras la amplificación del gen *CHD1* (primers P2/P8) a un macho ($Z^{\circ}Z^{\circ}$), una hembra ($Z^{\circ}W$) y un macho mutante ($Z'Z''$) erróneamente sexado como hembra. Tomado de Casey et al. (2009).

CONCLUSIONES

1. Los métodos de Griffiths et al. (1998) y Ellegren & Fridolfsson (1997) permitieron sexar inequívocamente 45 de las 49 muestras problema de *Corvus corone*.
2. Las repeticiones de ambos protocolos y la incorporación de las parejas de primers sex1'/sex mix y sex1'/sex2 desarrolladas para Passeriformes (Wang et al. 2010) permitieron el sexado fiable de las cuatro muestras restantes.
3. El coste de sexar cada muestra ha ascendido a 8,11 €. Dicho valor se encuentra dentro del rango de los precios ofertados por las diferentes entidades analizadas. El valor calculado es orientativo ya que no incluye el coste de personal y, además, podría abarataarse si los productos de PCR no se revelasen mediante Bioanalyzer.
4. Se ha conseguido unificar el programa de termociclador para las amplificaciones con P2/P8 y 3007/3112, disminuyendo así el tiempo de procesado por muestra en 2,5 horas.

CONCLUSIONS

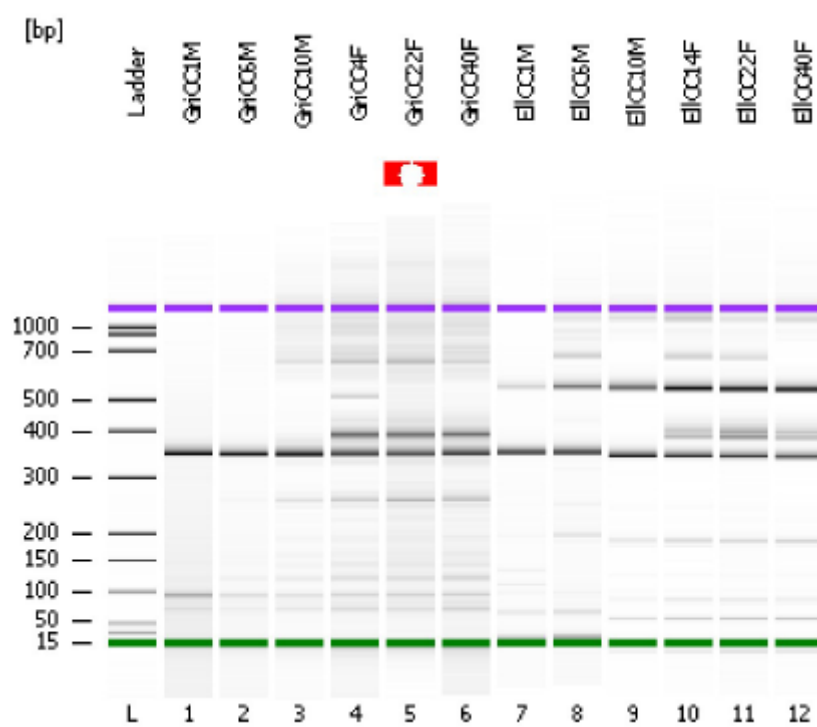
1. I successfully sexed 45 out of the 49 test samples of *Corvus corone* by applying the protocols by Griffiths et al. (1998) and Ellegren & Fridolfsson (1997).
2. The repetition of both protocols and the use of a new set of primers (sex1'/sex-mix and sex1'/sex2) optimised for Passeriformes by Wang et al. (2010), allowed the reliable sexing of the remaining four samples.
3. Sexing each sampled costed 8,11 €. This value is within the range of prices offered by the different Spanish companies/institutions surveyed. This value should be taken with caution as cost of personnel is not included and, in addition, such a cost could decrease if PCR products were not separated using the Bioanalyzer.
4. It was possible to amplify both *CHD1* regions (using primers P2/P8 and 3007/3112) using the same. Therefore, processing time per sample took 2.5 hours less.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

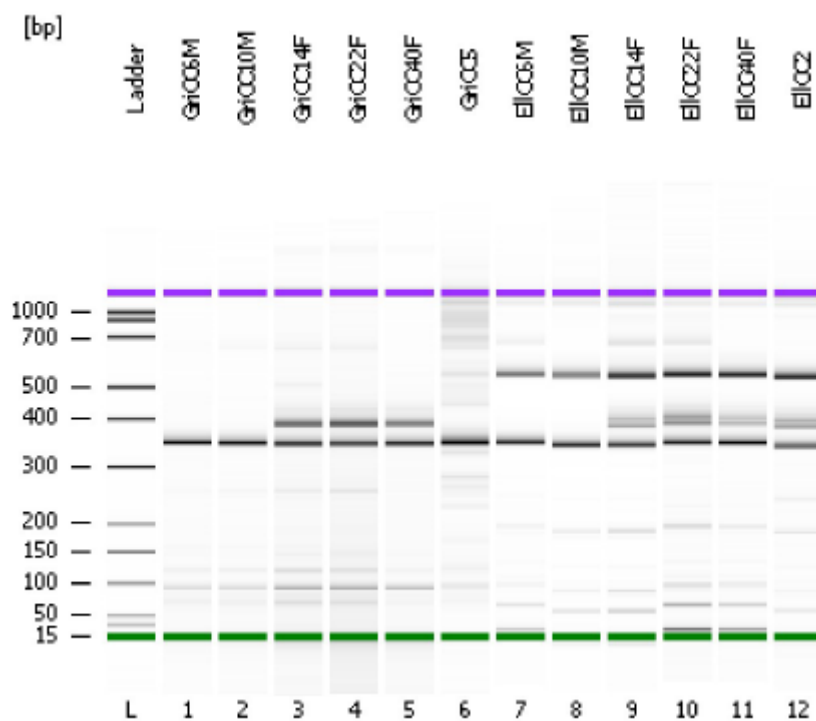
- Bolopo D, Canestrari D & Baglione V (2015) Corneja negra – *Corvus corone*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Morales, M. B. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
<http://www.vertebradosibericos.org/aves/corcor.html> [Último acceso 13/01/2016]
- Canestrari D, Vila M, Marcos J M & Baglione V (2012) Cooperatively breeding carrion crows adjust offspring sex ratio according to group composition. *Behav Ecol Sociobiol* 66:1225-1235. DOI: 10.1007/s00265-012-1375-7
- Casey A E, Jones K L, Sandercock B K & Wisely S M (2009) Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing. *Molecular Ecology Resources* 9:61-65. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02307.x
- De Knijff P (2014) How carrion and hooded crows defeat Linnaeus's curse. *Science* 344:1345-1346. DOI: 10.1126/science.1255744
- Ellegren H & Fridolfsson AK (1997) Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nature Genetics* 17:182-184. DOI: 10.1038/ng1097-182
- Fridolfsson AK & Ellegren H (1999) A simple and universal method for sexing non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30:116-121. DOI: 10.2307/3677252
- Griffiths R, Daan S & Dijkstra C (1996) Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 263:1249-1254. DOI: 10.1098/rspb.1996.0184
- Griffiths R, Double MC, Orr K & Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071-1075. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x
- Lee Y, Collier T C, Sanford M R, Marsden C D et al. (2013) Chromosome Inversions, Genomic Differentiation and Speciation in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLOS one* 8:e57887. DOI: 10.1371/journal.pone.0057887
- Matta Camacho NE, Ramírez Martín N, Zúñiga Díaz BC & Vera V (2009) Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta Biológica Colombiana* 14:25-38.
- Nachamkin I, Panaro NJ, Li M, Ung H et al. (2001) Agilent 2100 Bioanalyzer for Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *Campylobacter jejuni* Flagellin Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:754-757. DOI:10.1128/JCM.39.2.754-757.2001

- Palma GA (2001) Biotecnología de la reproducción 1ed. Balcacere, Argentina. 701 p.
- Roslik GV & Kryokov AP (2001) A karyological study of some corvine birds (Corvidae, Aves).
Russian Journal of Genetics 37:796-806. Traducido al inglés a partir de: Genetika
37:962-973. DOI: 10.1023/A:1016703127516
- Thermo Scientific (2010) Thermo Scientific, 2010. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop
Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios.
<http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> [Último acceso 04/02/2016]
- Wang N & Zhang Z (2009) The novel primers for sex identification in the Brown eared-pheasant
and their application to other species. Molecular Ecology Resources 9:186-188. DOI:
10.1111/j.1755-0998.2008.02177.x
- Wang N, Li J, Liu Y & Zhang Z (2010) Improvement on molecular sex identification primers for
Passeriform bird species. Chinese Birds 1:65-69. DOI 10.5122/cbirds.2009.0009

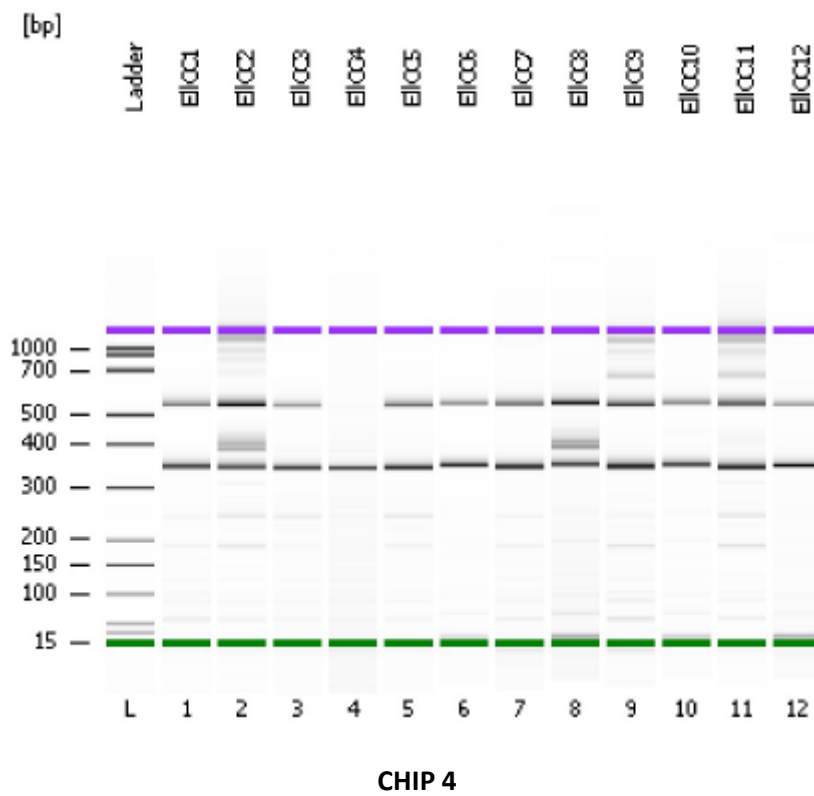
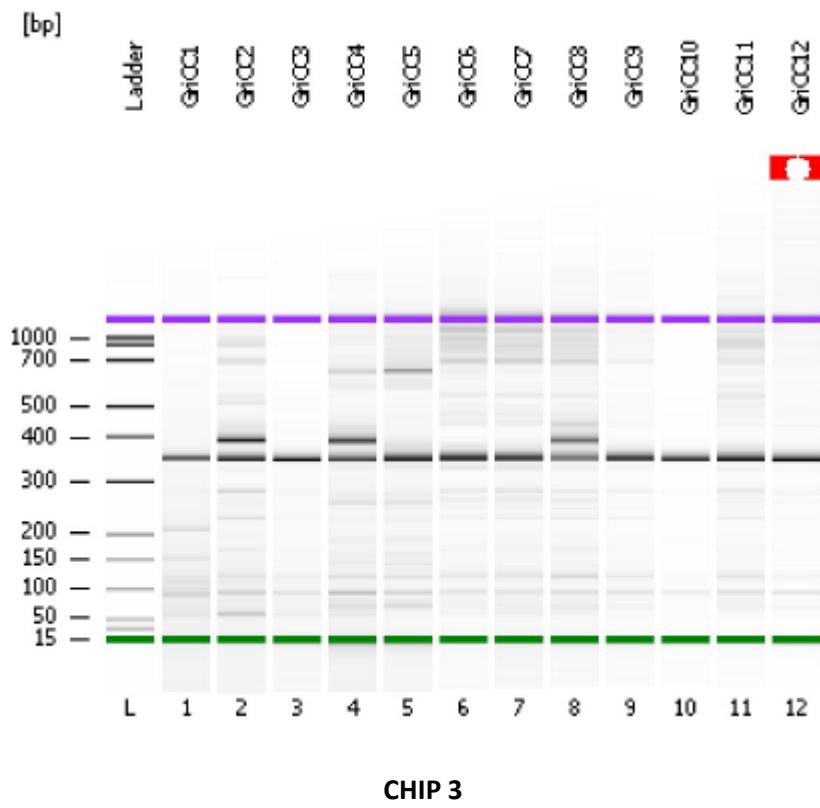
APÉNDICE

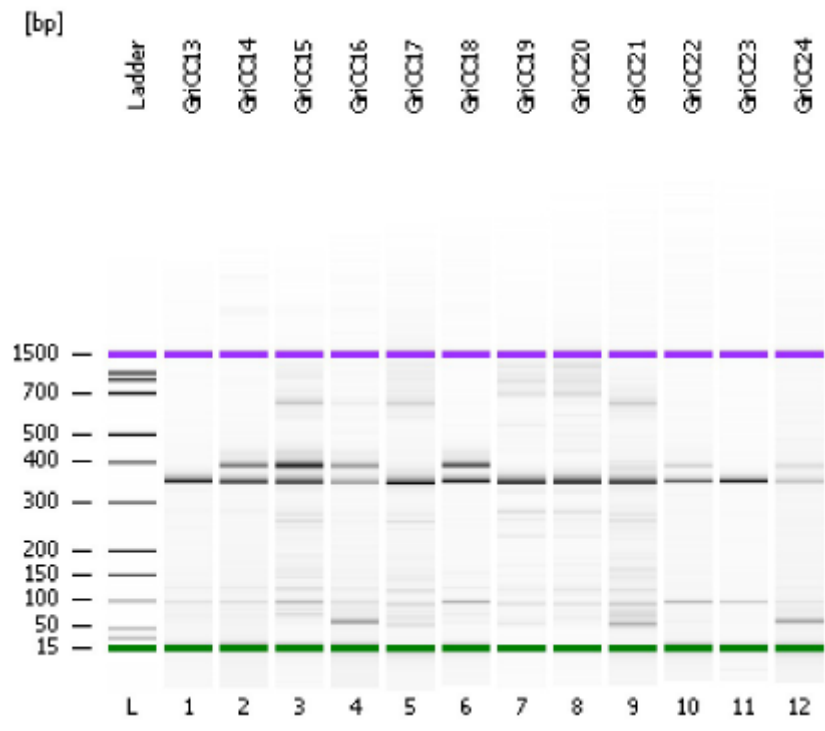


CHIP 1

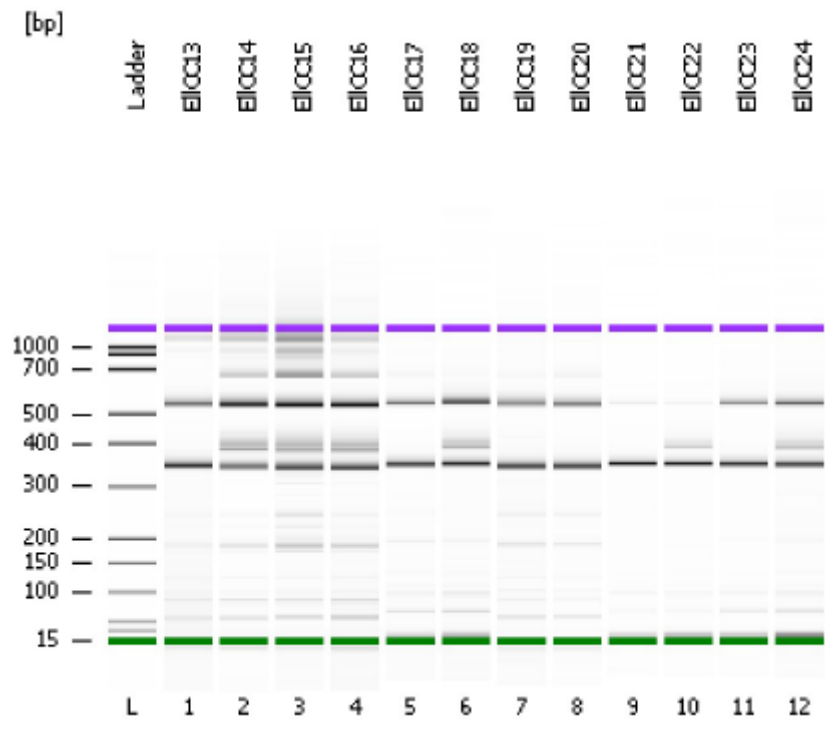


CHIP 2

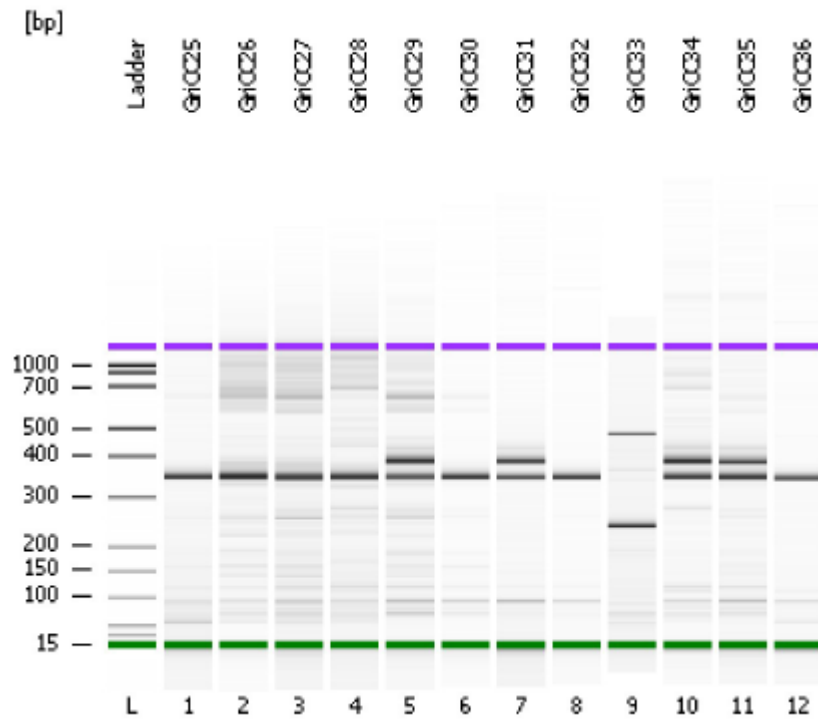




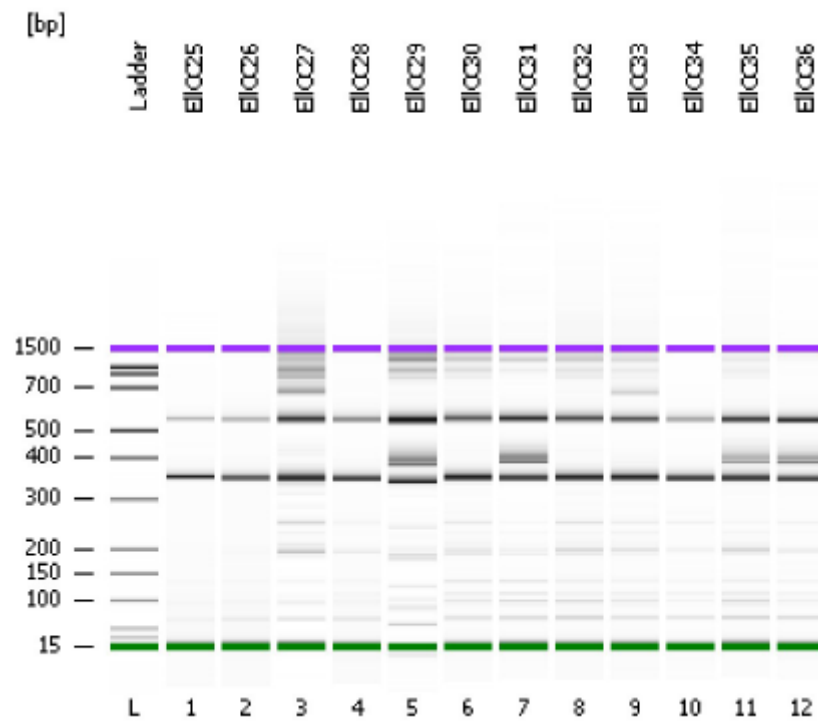
CHIP 5



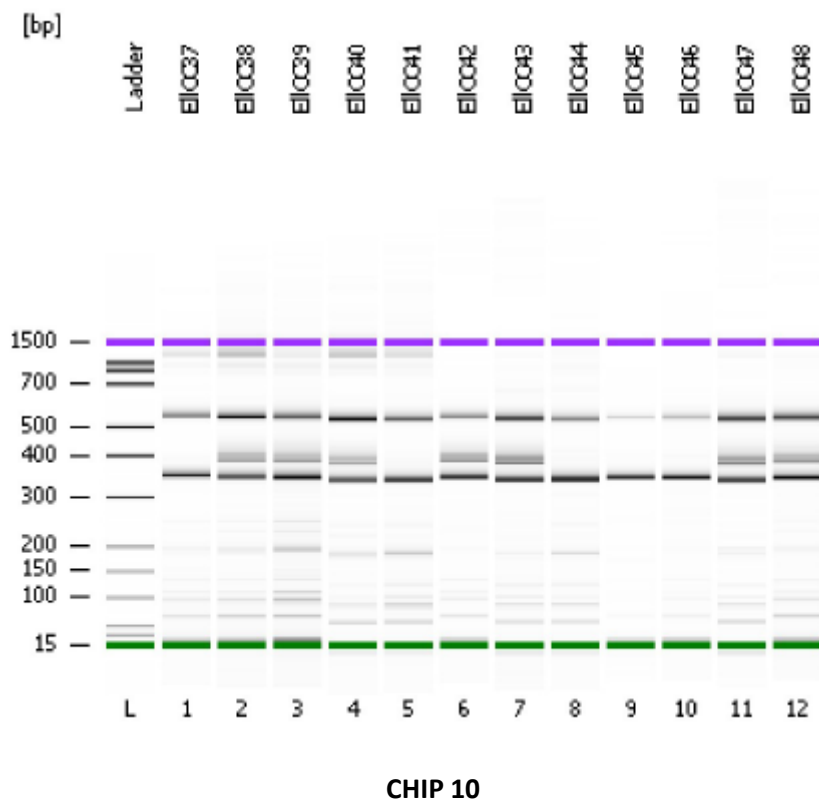
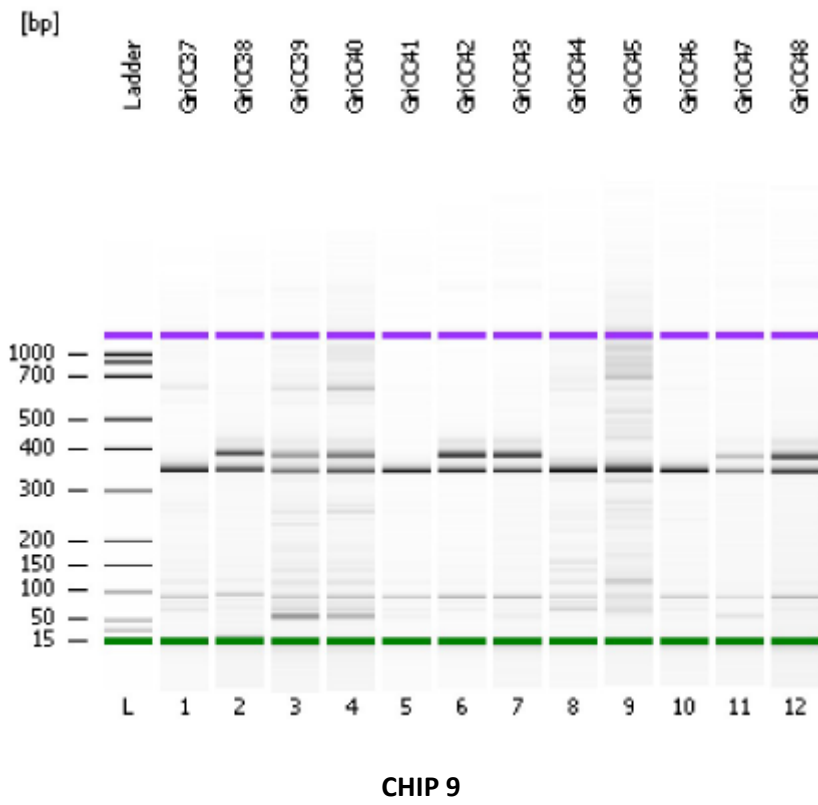
CHIP 6

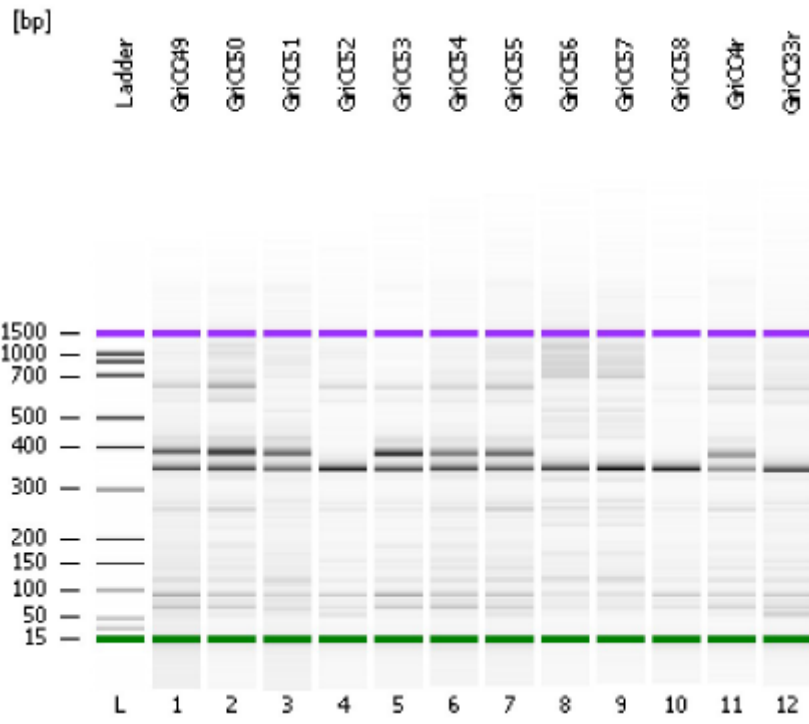


CHIP 7

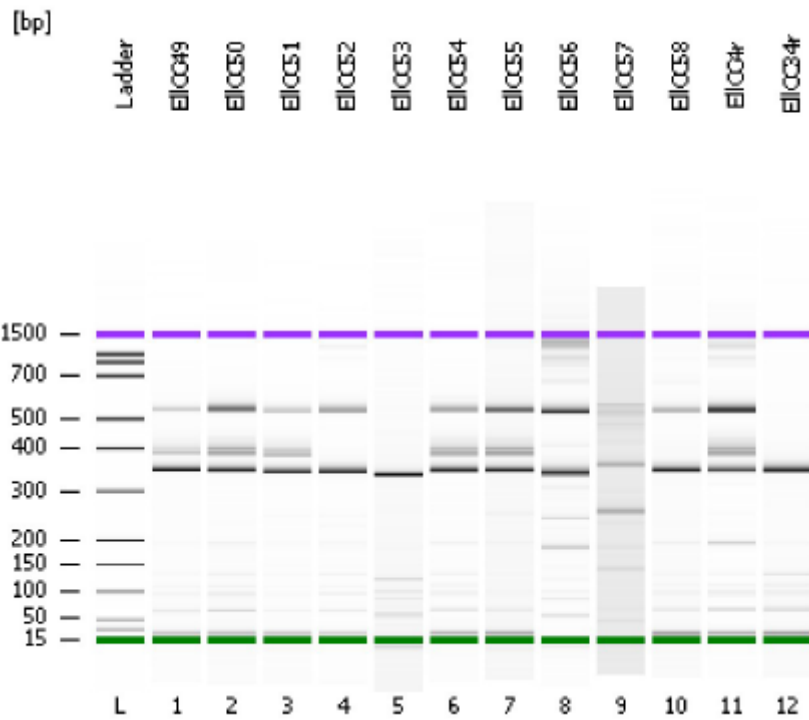


CHIP 8

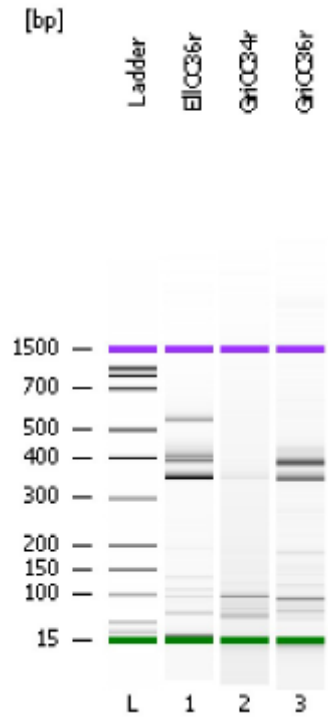




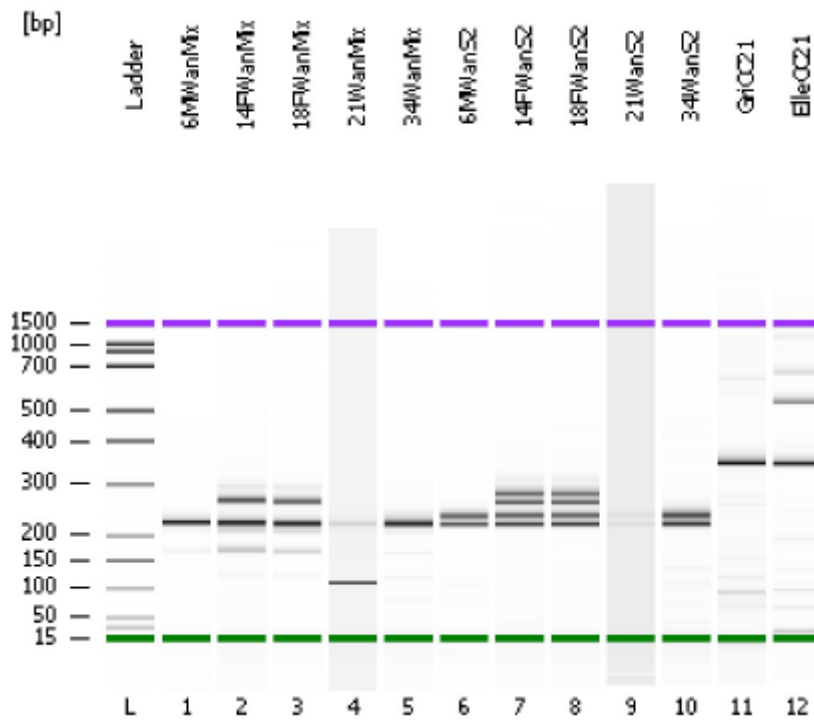
CHIP 11



CHIP 12



CHIP 13



CHIP 14