



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía
Áreas de Xenética e Zooloxía

Determinación sexual de aves mediante métodos moleculares

Sexual determination in birds by molecular methods



Trabajo Fin de Grado

Iván Pousada Linares

2018

Directores

Dr. Andrés Martínez Lage y Dr. Ramón José Muiño Boedo

Resumen

En el presente TFG, los primers P2/P8 propuestos por Griffiths *et al.* (1998) se han utilizado para tratar de sexar muestras de mosquitero ibérico (*Phylloscopus ibericus*). Se han encontrado una serie de dificultades motivadas por la antigüedad de algunas de las muestras. Una vez superadas, aparecen nuevos problemas derivados del uso de los primers anteriormente mencionados combinados con el uso de gel de agarosa. Para tratar de aportar luz se toman una serie de muestras de aves domésticas, entre ellas de gallinas de la variedad Brahma (*Gallus gallus domesticus*) y faisán común (*Phasianus colchicus*), y se tratan de sexar, obteniendo los mismos resultados. Finalmente, tras una búsqueda bibliográfica se llega a la causa, que no es otra que el uso de primers que aportan muy poca diferencia entre las secuencias amplificadas.

Abstract

In the present TFG, the P2/P8 primers proposed by Griffiths *et al.* (1998) have been used to treat to determine the sex of iberian chiffchaff samples (*Phylloscopus ibericus*). A series of difficulties have been found due to the age of some of the samples. Once overcome, new problems arise from the use of the previously mentioned primers combined with the use of the agarose gel. In order to shed some light on, a series of samples of domestic birds, hens of the Brahma variety (*Gallus gallus domesticus*) and common pheasant (*Phasianus colchicus*) are taken and tried to determine sex, obtaining the same results. Finally, after a bibliographic search, the cause is reached, which is nothing else than the use of primers that provide very little difference between the amplified sequences.

Índice

Introducción	2
El sexado molecular en aves	2
La problemática del mosquitero ibérico	3
Objetivos	7
Material y métodos	8
Extracción y comprobación del ADN	8
Amplificación del gen CHD y análisis	9
Toma de muestras	10
Resultados	11
Calidad del ADN	11
Geles de electroforesis	13
Discusión	17
Conclusiones	20
Bibliografía	21

Introducción

El sexado molecular en aves

El sexado de aves es un proceso importante para estudios de diverso tipo, como etológicos, ecológicos, de biología evolutiva y genéticos, y cobra especial importancia en proyectos de conservación de especies en peligro (Ito *et al.*, 2003). La asignación del sexo en aves dimórficas es una tarea sencilla, pero puede complicarse cuando nos enfrentamos a polluelos, que no suelen mostrar las características morfológicas sexuales de los adultos, o a especies monomórficas, las cuales se estima que representan más del 50% de las especies existentes (Griffiths *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2004; Dubiec y Zagalska, 2005).

Las aves presentan en general un elevado número de cromosomas ($2n > 70$ en la mayoría de las especies) divididos en unos cuantos pares de macrocromosomas y muchos pares de microcromosomas, perteneciendo los cromosomas sexuales al grupo de los macrocromosomas. Éstos son cromosomas sexuales no homólogos, denominados Z y W, siendo los machos el sexo homogamético (ZZ) y las hembras el heterogamético (ZW). Aunque este sistema de determinación sexual puede recordarnos al de los mamíferos (XX-XY) la propia nomenclatura nos indica que no están relacionados, y es que aunque comparten varias características los dos conjuntos de cromosomas sexuales han evolucionado a partir de distintos pares de cromosomas autosómicos de sus antepasados reptilianos (Ellegren, 2000; Smith *et al.*, 2010). El cromosoma W es un cromosoma sexual degenerado con muy poco material genético (menos de 20 genes) y rico en secuencias satélites, mientras que el cromosoma Z se encuentra muy conservado. En la vasta mayoría de las especies el cromosoma W es mucho menor que el Z, confundándose en ocasiones con alguno de los microcromosomas (Matta-Camacho *et al.*, 2012). La excepción a esta regla son varias especies de falconiformes y gruiformes, que pueden presentar cromosomas sexuales más largos de lo normal (Ellegren, 2000) y las ratites, donde ambos cromosomas son de tamaño similar, aparentemente debido a un estado evolutivo primitivo, aunque no está del todo claro (Smith *et al.*, 2010). El mecanismo exacto por el que se determina el sexo en las aves todavía es desconocido, pero existen dos hipótesis. La primera de ellas es la hipótesis de la dosis del Z, según la cual el sexo se determinaría en función del número de cromosomas Z presentes, dos para un macho y uno para una hembra. La otra se conoce como la hipótesis del W dominante, y según esta el sexo dependería de la presencia de un gen femenino dominante en el cromosoma W. Ambas hipótesis no son excluyentes, pero no han podido ser comprobadas debido a que no se han documentado los individuos aneuploides necesarios para ello (esto es, individuos con un número anormal de cromosomas sexuales). Se ha sugerido que este tipo de desórdenes cromosómicos podrían ser letales (Ellegren, 2000; Smith *et al.*, 2004; Ellegren *et al.*, 2007; Smith *et al.* 2010).

Los métodos empleados tradicionalmente incluyen procesos como la observación del comportamiento o la búsqueda del parche de cría (limitados a las épocas de reproducción), análisis morfométrico, sexado acústico, examen cloacal, sexado por esteroides fecales, laparoscopia y laparatomía, análisis citogenéticos o citometría de flujo. La mayoría de estos métodos son costosos en términos de esfuerzo o monetarios, y pueden resultar invasivos y dañinos para el animal, particularmente la laparoscopia y la laparatomía, que son procedimientos quirúrgicos muy invasivos y con los característicos riesgos asociados (Morinha *et al.*, 2008; Matta-Camacho *et al.*, 2012). Como respuesta a estas dificultades en los últimos años se han desarrollado diversos métodos basados en herramientas moleculares. Éstos métodos se dividen en dos tipos, por un lado tenemos las técnicas basadas en la hibridación de ADN, y por otro las basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction). Las primeras se basan en la búsqueda de secuencias de ADN específicas del sexo en el genoma mediante el uso de sondas de ADN complementarias, y engloba procedimientos como la búsqueda de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), minisatélites o microsátélites. Entre los sistemas basados en la PCR encontramos los polimorfismos de ADN amplificados al azar, los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (una combinación de RFLP y PCR) y las diferencias en el tamaño de intrones por amplificación del gen CHD (cromohelicase-DNA binding). Es éste último el que vamos a emplear en el presente Trabajo de Fin de Grado (TFG), debido principalmente a su aparente universalidad (Griffiths *et al.* 1998) y sencillez.

El gen CHD codifica para la proteína cromohelicasa de unión a ADN, y ha sido propuesto como un regulador negativo de la expresión génica, que favorece la heterocromatinización y restringe por tanto el acceso de la maquinaria transcripcional a la información genética (Woodage *et al.*, 1997). El fundamento del sexado por amplificación del gen CHD se basa en dos características del mismo: es uno de los pocos genes que ha sido aislado tanto en el cromosoma Z como en el W, y está muy conservado entre los distintos órdenes evolutivos (con excepción de las ratites) (Griffiths *et al.* 1998). Esto permite amplificar regiones conservadas de los exones mediante el uso de primers específicos, y junto con ellas intrones que difieren en el tamaño entre los dos cromosomas sexuales. Así, al separar el producto de PCR en un gel de electroforesis obtendremos dos bandas de distinto peso molecular en las hembras (entre 10 y 250pb, en función de los primers empleados), correspondientes al producto amplificado de los genes CHD-Z y CHD-W; y una única banda en los machos, correspondiente a los dos productos de CHD-Z de igual peso (Griffiths *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2004; Matta-Camacho *et al.*, 2012). Los primers más usados para este procedimiento son P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) y 2550F/2718R (Fridolfsson y Ellegren, 1999), aunque existen otros.

La problemática del mosquitero ibérico

Los mosquiteros (género *Phylloscopus*) son un grupo de aves de la familia Phylloscopidae, orden Passeriformes (Älstrom *et al.*, 2006). Se trata de animales de

pequeño tamaño (10-11cm de longitud y 15-21cm de envergadura) y peso (8-12g), de tonos verdes o pardos en el dorso y blanquecinos en el abdomen, como se puede observar en la Figura 1 (SEO, Sociedad Española de Ornitología). Presentan un pico pequeño y afilado que emplean para cazar insectos, ya que, como su propio nombre indica, se trata de aves insectívoras.



Figura 1: Mosquitero. Foto tomada en Rúa Nova, Marín, y cedida por S.Castilla.

El mosquitero ibérico *Phylloscopus ibericus* (Ticehurst 1937) era considerado hasta hace poco una subespecie del mosquitero común *Phylloscopus collybita* (Vieillot 1817), conocido como *P. c. ibericus* o *P. c. brehmii* (Homeyer 1871). El debate existente desde hacía décadas entorno a su categoría taxonómica ha sido recientemente resuelto gracias a análisis moleculares y al descubrimiento de que existe aislamiento reproductivo, al menos parcial, entre ambas especies (Helbig *et al.*, 2001). Así, se confirma el mosquitero ibérico no solamente como especie, sino como el arquetipo más antiguo conocido de este grupo. En cuanto a su distribución, se limita a la zona oeste peninsular, como se puede apreciar en la Figura 2, y ocasionalmente al norte del continente africano, siendo un nidificante habitual. Por su parte, el mosquitero común se distribuye por toda Europa y Asia, y dentro de España por todo el territorio y particularmente en el arco mediterráneo.



Figura 2: Distribución en la península ibérica de *Phylloscopus ibericus* (verde). Imagen retirada de El Escribano Digital nº37 (Marzo, 2003).

Y aunque no están confirmadas por el *Taxonomic Advisory Committee* de la *Association of European Records and Rarities Committees* (AERC TAC WP Bird List 2015), el mosquitero ibérico presenta dos subespecies morfológicamente distintas: *Phylloscopus ibericus biscayensis*, que se distribuye por todo el norte peninsular y *Phylloscopus ibericus ibericus*, distribuyéndose en el suroeste peninsular. Biométricamente las subpoblaciones norteñas presentan mayor longitud en el ala, la 10ª primaria y el tarso, y el pico de menor tamaño en los machos (Balmori y Cuesta, 2003; Onrubia *et al.* 2003; Salomon *et al.*, 2003; Monteagudo *et al.* 2013).

Para el mosquitero ibérico la determinación del sexo puede realizarse de forma fiable mediante la observación de la placa incubatriz o la cloaca, pero es un método limitado al periodo de apareamiento, desde mediados de marzo hasta finales de septiembre (Onrubia *et al.* 2013). Otra variante propuesta son los criterios morfométricos, que no estarían limitados temporalmente. Así, medidas del ala entre 56,0-64,0mm se corresponderían con machos y entre 52,5-60,0mm con hembras (Svensson, 2001). Atendiendo a este criterio, y en ausencia de otras características, no se puede concluir el sexo de los individuos con alas entre 56,0-60,0mm de longitud. Para paliar este rango de solapamiento, Onrubia *et al.* (2003) propone el uso de medidas del ala y la cola, siendo machos aquellos individuos con alas que superen los 63,0mm y colas mayores de 52,0mm, y hembras si las alas son inferiores a 59,0mm y las colas menores de 45,0mm. Al igual que en el caso anterior, no encontramos con un elevado rango de solapamiento. Y no es el único problema que presentan estos métodos, ya que las medidas pueden variar debido a las capturas de individuos migrantes, al aislamiento poblacional, a la existencia dos subespecies, la presencia de híbridos, etc. Es por ello que Monteagudo *et al.* (2013) propone el uso de funciones discriminantes basadas en la longitud del ala (A) y el tarso (T):

$$P.i. machos = -1314,267 + 27,193 * A + 46,219 * T$$

$$P.i. hembras = -1125,746 + 24,907 * A + 43,566 * T$$

Asigna a cada individuo analizado el sexo correspondiente a la función en la que obtiene mayor valor discriminante al sustituir las medidas correspondiente. Con este método, afirma poder sexar un 95% de los especímenes estudiados.

En cuanto a la identificación de la especie, el mosquitero ibérico tendría las alas más largas y puntiagudas, el pico y el tarso más largos y la cola más corta que el mosquitero común, además de pequeñas variaciones en el color. Estas diferencias son particularmente notables en una zona del noreste peninsular en donde ambas especies conviven, y no tanto en otras debido a la variación geográfica que, siguiendo las reglas de Allen y Bergmann, parece generar una convergencia ecomorfológica (Solomon *et al.*, 2003). Partiendo de estos datos, se proponen varias fórmulas para diferenciar entre las dos especies (Solomon *et al.*, 1997; Svensson, 2001), cuyo fundamento consiste en la suma de variables biométricas que tienden a ser mayores en el mosquitero ibérico y la resta de aquellas en las que destaca el mosquitero común, para obtener un valor

discriminante con el que se determinará la especie. Con con la fórmula de Svensson (2001) se puede identificar la especie a la que perteneces los machos con un rango de solapamiento del 10% ($v > 73,2 = P. ibericus$ y $v < 71,9 = P. collybita$), y la de las hembras con un rango de solapamiento del 60% ($v > 70,9 = P. ibericus$ y $v < 61,0 = P. collybita$) (Onrubia *et al.*, 2003). Es por tanto interesante la determinación precisa del sexo a la vista de que la especie a la que pertenecen las hembras podría ser muy fácilmente confundida.

A la vista de los datos aportados entorno a la determinación sexual e identificación del mosquitero ibérico y a los elevados rangos de solapamiento existentes en muchos casos, se hace patente la necesidad de un estudio que analice el sexo con métodos moleculares fiables para confirmar la adecuación de estos criterios biométricos.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo de fin de grado es sexar mediante métodos moleculares (amplificación del gen CHD) una serie de muestras de aves con particularidad al mosquitero ibérico (*Phylloscopus ibericus*) tomadas por diversos anilladores, para posteriores adecuaciones de los métodos biométricos empleados para el sexado e identificación.

Material y Métodos

Extracción y comprobación del ADN

Para la extracción del ADN se emplea el kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech). Se cortan 3-5mm de la punta del cálamo de las plumas, que es la zona donde se insertan en la piel y que por tanto contendrá restos de tejido, y se procede con el protocolo recomendado para tejidos (Figura 3). La única variación adoptada es una reducción del volumen de buffer de extracción a 50µl con el fin de concentrar más la muestra.

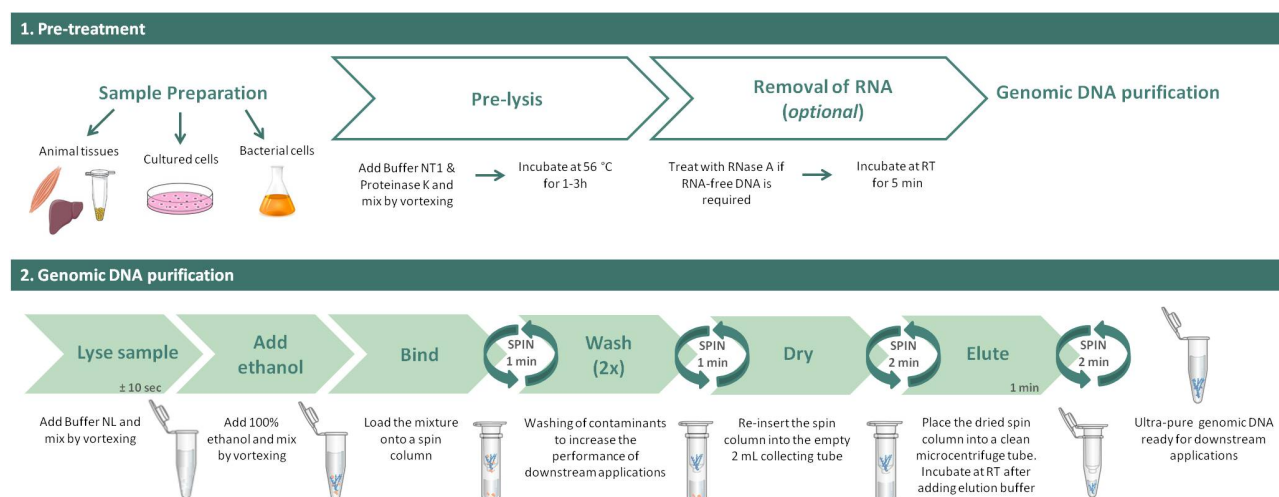


Figura 3: Protocolo general de extracción de ADN proporcionado por NZYTech.

Tras la extracción se procede a comprobar la calidad de la muestra, empleando para ello el *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific), verificándose mediante el coeficiente de absorbancia A260/A280, que determina la cantidad de impurezas proteicas. Una muestra con un coeficiente entorno a 1,8 se considera pura (Thermo Fisher Scientific Inc., 2010).

Para las concentraciones de ADN muy bajas se realizan precipitaciones. Para ello se añade sobre el volumen final de cada muestra 1/10 parte de acetato sódico 3M y 2,5 veces de etanol absoluto frío y se deja reposar 24 horas en el congelador. Al día siguiente, se centrifugan a 12000 rpm (16250g) durante 20 min en frío, se elimina el sobrenadante, y se resuspenden en agua milliQ, dejándolas reposar otras 24 horas antes de pasar a la PCR. Aquí surge un problema ya que al trabajar con concentraciones de ADN muy bajas el rendimiento de las precipitaciones era también bajo. Para mejorarlo se añadió ADN de mejillón a las muestras para facilitar la precipitación y la posterior resuspensión. Se emplea ADN de un molusco bivalvo ya que estos no presentan el gen CHD en su genoma y por lo tanto no interferirán en la posterior PCR.

Amplificación del gen CHD y análisis

Para realizar la PCR en primer lugar se hace un preparado con *NZYTaq II 2x Colourless Master Mix* (*NZYTech*), $MgCl_2$ 50mM (*NZYTech*) y los primers P2 (5'-TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT-3') y P8 (5'-CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG-3') (*Isogen Life Science*). Luego se añaden a un tubo de pcr 8,75µl de la mezcla y 6,25µl de ADN, obteniéndose un volumen final de 15µl. Originalmente conseguíamos un volumen final de 25µl, con tan solo 2,5µl de ADN y añadiendo agua milliQ, pero a tenor de la poca concentración de ADN y los malos resultados de las primeras amplificaciones se decide disminuir el volumen final, eliminar el agua milliQ y aumentar la concentración de ADN. A continuación se envía el preparado al termociclador *MyCycler* (*BIO-RAD*), bajo un programa consistente en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5min, 30 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 48°C y 45s a 72°C, y una extensión final de 5min a 72°C (Figura 4).

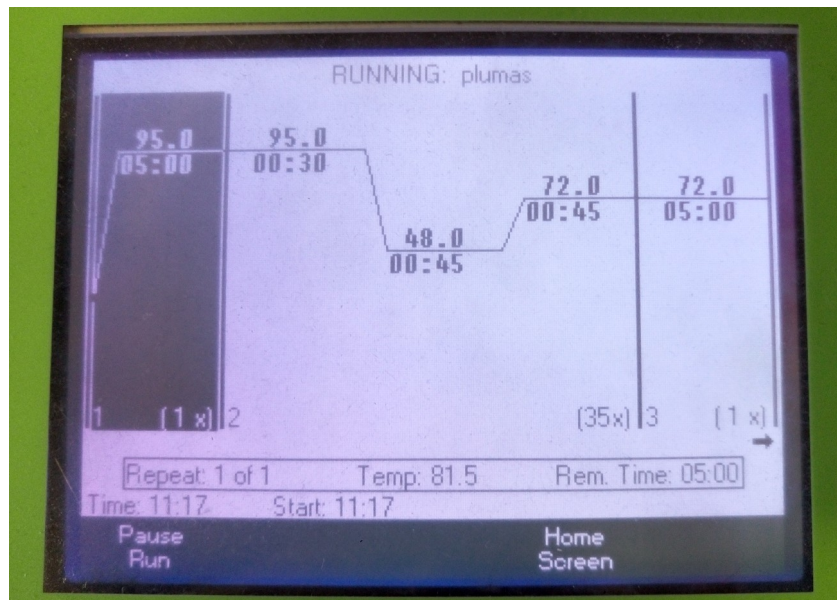


Figura 4: Detalle del programa del termociclador en funcionamiento.

Para la visualización de los productos de PCR obtenidos se realiza una electroforesis en gel de agarosa. Empezamos con un gel al 1,5% pero debido a los resultados negativos pasamos al 3%. Para prepararlo utilizamos tampón TAE 1x y agarosa, y añadimos 1,5µl de RedSafe por cada 30ml de gel para posteriormente poder visualizar los resultados. Una vez listo el gel, se cargan las muestras. En primer lugar se añade el marcador elegido, en este caso *NZYDNA Ladder VI* (*NZYTech*), consistente en 1µl de marcador y 5µl de agua milliQ. A continuación las muestras, consistentes en 1µl de tampón de carga y 5µl de producto de PCR. El tampón de carga estaba formado por azul de bromofenol y azul de xienol. Para la electroforesis (Figura 5) se ensayaron varias combinaciones de voltaje (75-100V) y tiempo (45-120min). Una vez finalizada los gels eran observados en el RedSafe Visualizer.

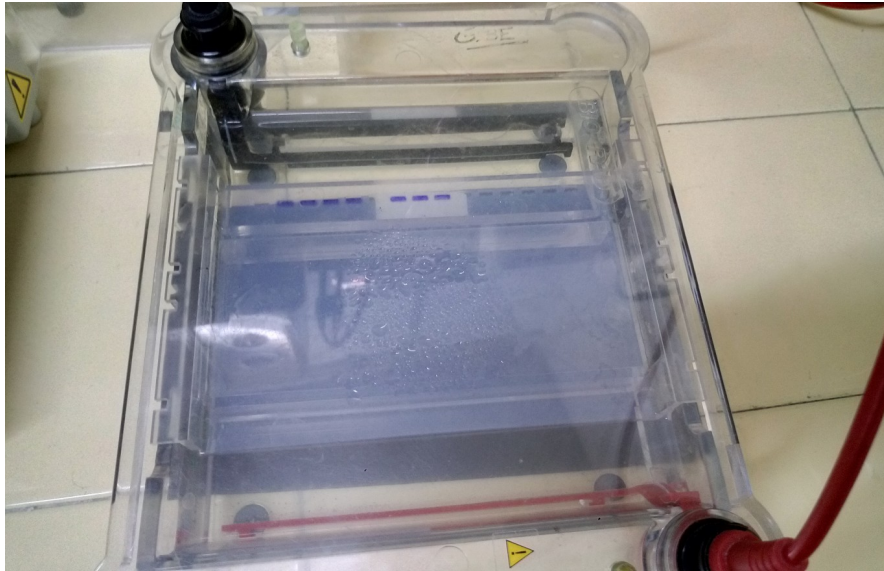


Figura 5: Detalle de un gel de electroforesis corriendo.

Toma de muestras

Las muestras de *Phylloscopus ibericus* son proporcionadas por uno de los directores del TFG. Se presentan en sobres individuales identificados con el código de la anilla y la fecha de recogida, conteniendo dos plumas de cada espécimen.

Se obtienen una serie de muestras de aves domésticas: canarios (*Serinus canaria domestica*), codornices (*Coturnix coturnix*), faisanes (*Phasianus colchicus*) y gallinas (*Gallus gallus domesticus*). Para la tomarlas se recurre a los procedimientos indicados por distintos laboratorios de sexado comercial, en los que se aconseja arrancar plumas de la zona circundante a la cloaca (Figura 6) sin acercarse demasiado a esta para evitar una posible contaminación. Tras la obtención, se almacenaron en sobres individuales identificados y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su utilización.



Figura 6: Detalle de la toma de muestras. Ceditas por Daniel Rodríguez Torviso.

Resultados

Calidad del ADN

En la Tabla 1 incluida a continuación se muestran los datos de cada muestra de mosquitero empleada y la calidad del ADN tras la extracción. En ellas se puede observar el número asignado a cada muestra, el código de la anilla que identifica a cada individuo, la fecha de obtención de las plumas, el sexo confirmado si fué posible (1 para machos, 2 para hembras y 0 para indeterminados), la absorbancia A260/280 y la concentración en ng/ μ l. La calidad y concentración del ADN extraído no era la adecuada en la mayoría de los casos, imposibilitando la obtención de resultados concluyentes. Sin embargo, al seleccionar una serie de muestras del 2016 se obtienen mejores valores, como se puede observar al fijarse en las muestras 45-51.

Seguidamente, en la Tabla 2 se pueden observar los mismos datos de una serie de aves domésticas de mayor tamaño. La única variación es un cambio en la columna del código de la anilla, en la que ahora se especifica la especie. Se aprecia como en los canarios, codornices y faisanes las absorbancias y concentraciones de ADN son similares a las muestras más recientes de los mosquiteros de la tabla 2. En el caso de las gallinas y el pollo de faisán los resultados son óptimos.

Tabla 1: Muestras de mosquitero ibérico y resultados de calidad obtenidos.

N.º	MUESTRA	FECHA	SEXO	A260/280	(ng/µl)
1	FP9355	20/06/2010	2	-0,13	-0,35
2	FP9357	20/06/2010	0	0,31	0,65
3	FP9410	25/07/2010	0	-0,09	0,97
4	MH8300	04/06/2011	2	0,59	0,65
5	FP9409	04/06/2011	2	-0,06	0,14
6	FP9364	04/06/2011	0	-5,83	2,78
7	FP9363	04/06/2011	1	0,06	-0,09
8	FP9362	10/07/2011	1	-0,59	1,06
9	FP9361	04/06/2011	1	1,73	2,94
10	FP9439	04/06/2011	1	0,44	-1,50
11	FP9365	04/06/2011	0	-0,36	0,78
12	FP9372	04/06/2011	0	0,67	-0,95
13	FP9371	04/06/2011	0	-0,74	1,11
14	FP9369	04/06/2011	2	0,38	-0,71
15	FP9370	04/06/2011	2	0,23	-0,45
16	FP9368	04/06/2011	0	0,57	-0,99
17	FP9374	04/06/2011	0	0,37	-0,62
18	FP9378	04/06/2011	2	0,4	-0,58
19	FP9379	04/06/2011	0	0,03	-0,02
20	FP9380	04/06/2011	0	-0,80	0,78
21	EJ5768	04/06/2011	1	0,34	-0,63
22	EJ5770	04/06/2011	1	0,36	-0,88
23	EJ5769	04/06/2011	1	0,51	-1,68
24	EJ5758	04/06/2011	2	3,29	6,12
25	EJ5765	20/06/2010	0	0,29	-0,82
26	EJ5766	20/06/2010	2	1,65	2,43
27	EJ5767	27/06/2010	0	0,40	-1,10
28	EJ5735	27/06/2010	1	73,51	2,89
29	EJ5706	27/06/2010	1	0,47	-1,77
30	EJ5730	27/06/2010	0	13,37	2,29
31	EJ5782	27/06/2010	2	3,27	-0,82
32	EJ5781	27/06/2010	2	0,80	1,01
33	EJ5771	27/06/2010	2	-1,21	-0,33
34	EJ5780	27/06/2010	1	-31,52	-1,63
35	EJ5772	27/06/2010	1	1,38	5,71
36	EJ5774	27/06/2010	0	9,98	-2,28
37	EJ5776	27/06/2010	2	4,31	-2,15
38	EJ5777	27/06/2010	2	-4,34	-1,42
39	EJ5778	27/06/2010	2	-4,94	-1,42
40	EJ5779	27/06/2010	0	6,44	-2,07
41	EJ5789	25/07/2010	2	0,48	1,07
42	EJ5783	25/07/2010	1	-0,54	-0,42
43	EJ5788	17/10/2010	1	-0,01	-0,01
44	EJ5785	23/05/2015	1	0,66	0,53
45	MY7695	23/06/2012	0	2,84	2,96
46	MY7694	07/05/2016	2	7,07	1,01
47	MY7792	21/05/2016	1	2,12	3,24
48	MY7837	25/04/2015	1	1,69	2,96
49	MC4192	13/06/2015	1	1,95	3,59
50	RD3207	21/05/2016	2	1,26	2,12
51	RD3212	21/05/2016	1	1,54	3,37

Tabla 2: Muestras de aves domésticas y resultados de calidad tras la extracción.

N.º	MUESTRA	FECHA	SEXO	A260/280	(ng/µl)
C1	Canario	24/06/18	0	2,24	1,89
C2	Canario	24/06/18	0	1,49	1,24
C3	Canario	24/06/18	0	2,49	1,66
C4	Canario	24/06/18	0	1,09	1,1
CO1	Codorniz	24/06/18	2	1,9	2,26
CO2	Codorniz	24/06/18	1	1,61	2,65
PF	Pollo Faisán	24/06/18	0	2,07	89,78
FV	Faisán Verde	24/06/18	1	1,72	1,82
FL1	Faisán Lady	24/06/18	2	1,51	2,12
FL2	Faisán Lady	24/06/18	1	0,89	0,6
PW1	Pollo Wyandotte	24/06/18	0	2,1	127,04
PW2	Pollo Wyandotte	24/06/18	0	2,11	119,92
PA1	Pollo Araucana	24/06/18	0	2,05	126,23
PA2	Pollo Araucana	24/06/18	0	2,06	130,21
GB1	Gallina Brahma	24/06/18	2	2,06	72,52
GB2	Gallina Brahma	24/06/18	1	2,06	103,75

Geles de electroforesis

En la gran mayoría de los casos los resultados obtenidos en los geles fueron similares a la Figura 7, no siendo aceptables al no visulizarse bandas.

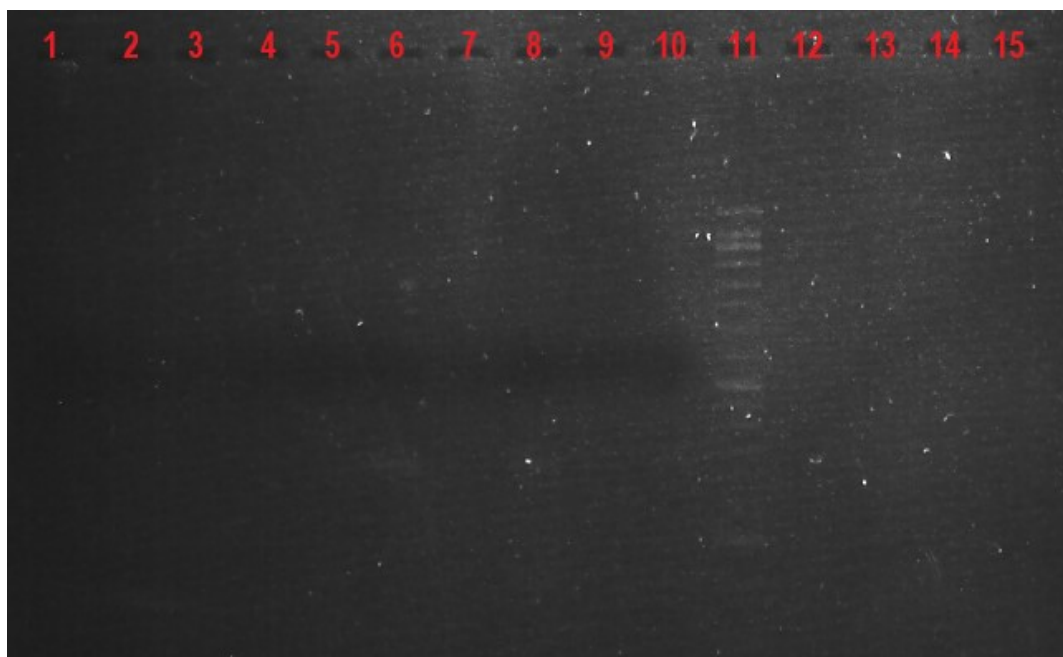


Figura 7: Gel de electroforesis mantenido a 100V durante 1:30h. En el pocillo 11 se observa el Marker IV (NZYTech), en los pocillos 2-15 se cargan las muestras 10-23 respectivamente.

Seguidamente se muestran una serie de geles en los que los que se obtuvieron mejores rendimientos. Cuando se precipitaron las muestras previamente al proceso de PCR, se obtuvieron algunos fragmentos de amplificación pero estos seguían siendo tenues (Figura 8).

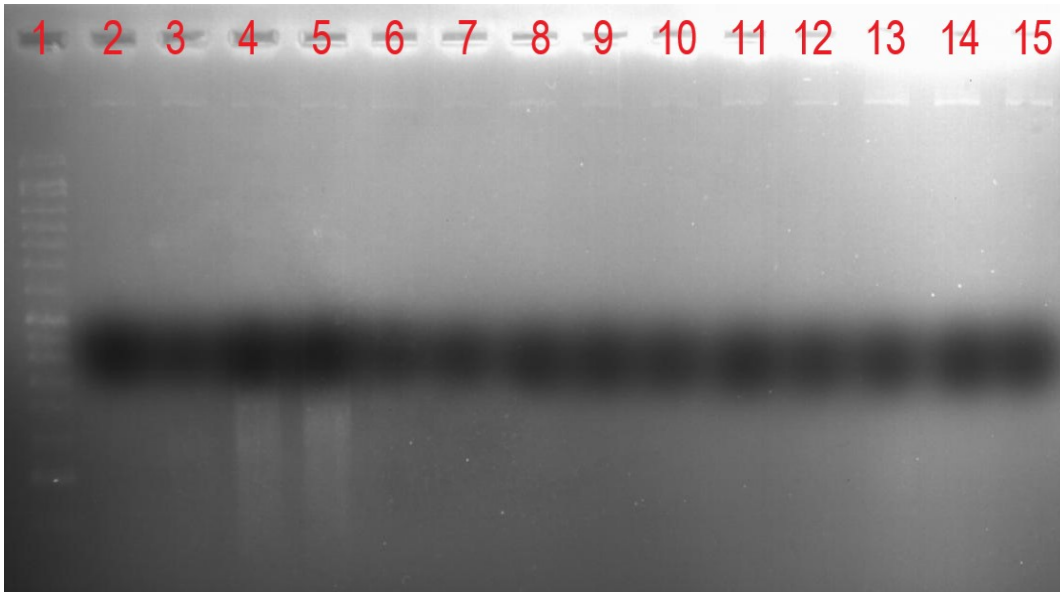


Figura 8: Gel de electroforesis mantenido durante 1:30h a 70V. En el pocillo 1 se puede observar el Marker VI (NZYTech), en los pocillos 2-15 se cargan las muestras 24-37 respectivamente. Las muestras 24-30 (pocillos 2-8) habían sido precipitadas. En los pocillos 4 y 5 (muestras 26 y 27) se observa una gran banda difusa.

A continuación, en la Figura 9, podemos ver como al precipitar las muestras en presencia de ADN de mejillón se logra una mejora sustancial, especialmente en la muestra 50 que parece ser un macho.

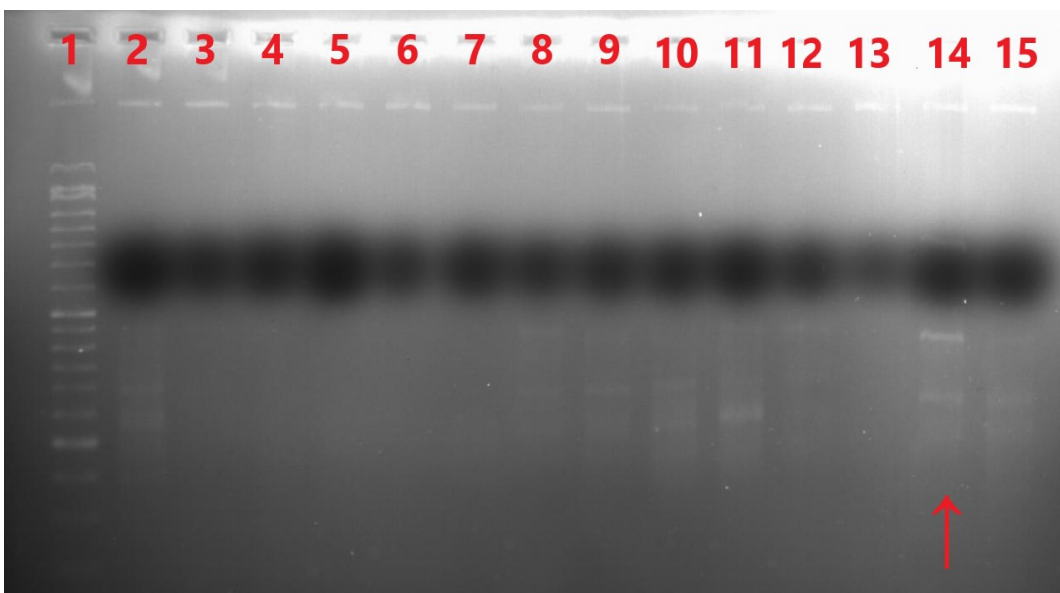


Figura 9: Gel de electroforesis mantenido a 70V durante 1:30h. En el pocillo 1 puede observarse el Marker VI (NZYTech), en los 2-15 se cargan las muestras 38-51, respectivamente. El pocillo 14 señalado (muestra 50) parece ser un macho. Todas las muestras habían sido precipitadas.

Para terminar con los mosquiteros, en la Figura 10 se muestra el mejor de los geles obtenidos con dichas muestras, apreciándose 4 pocillos con bandas bien definidas.

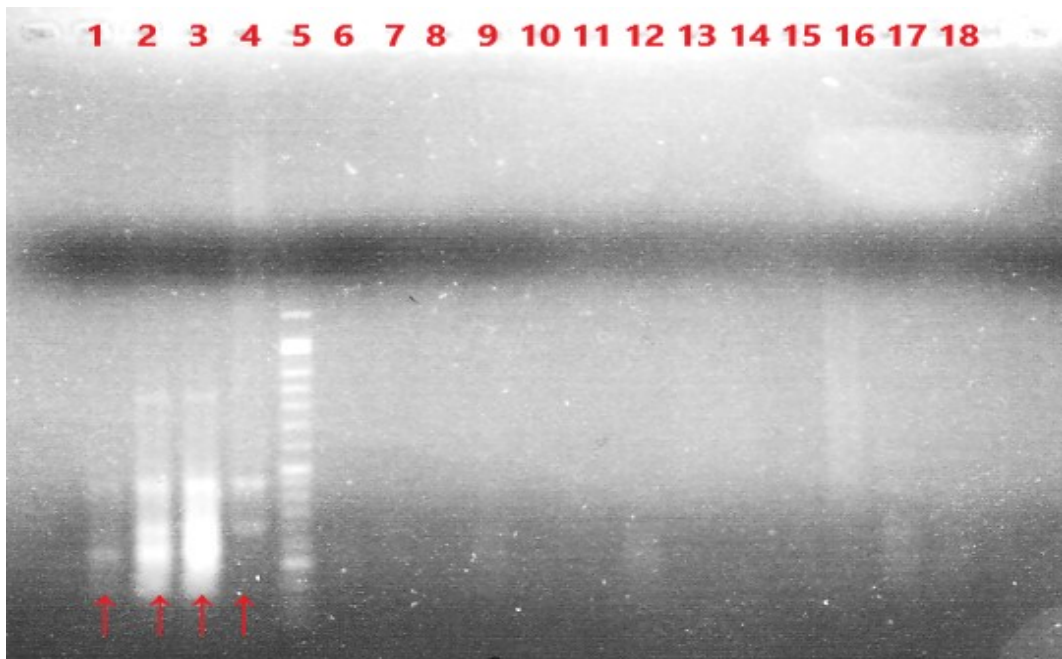


Figura 10: Gel de electroforesis mantenido durante 2h a 70V. En los pocillos 1-4 se cargan las muestras 39-42, en el pocillo 5 se puede observar el Marker VI (NZYTech), en los pocillos 6-11 aparecen las muestras 46-51, en los 12-17 se cargan las muestras 31-36, y finalmente en el pocillo 18 se carga la muestra 20. En este caso todas las muestras salvo la número 20 habían precipitadas junto con ADN de mejillón. La 20 se precipitó sola. Los pocillos 1-4 señalados, correspondientes a las muestras 39-42 parecen arrojar buenos resultados.

Finalmente, en la Figura 11 se presentan los resultados de las muestras de pollos y faisán mencionadas en la Tabla 2. En este caso los canarios, codornices y faisanes adultos no arrojaron resultados en el primer gel realizado, por lo que se presenta otro gel sin dichos individuos. En cualquier caso, el resultado parece positivo, apreciándose bandas bien definidas.

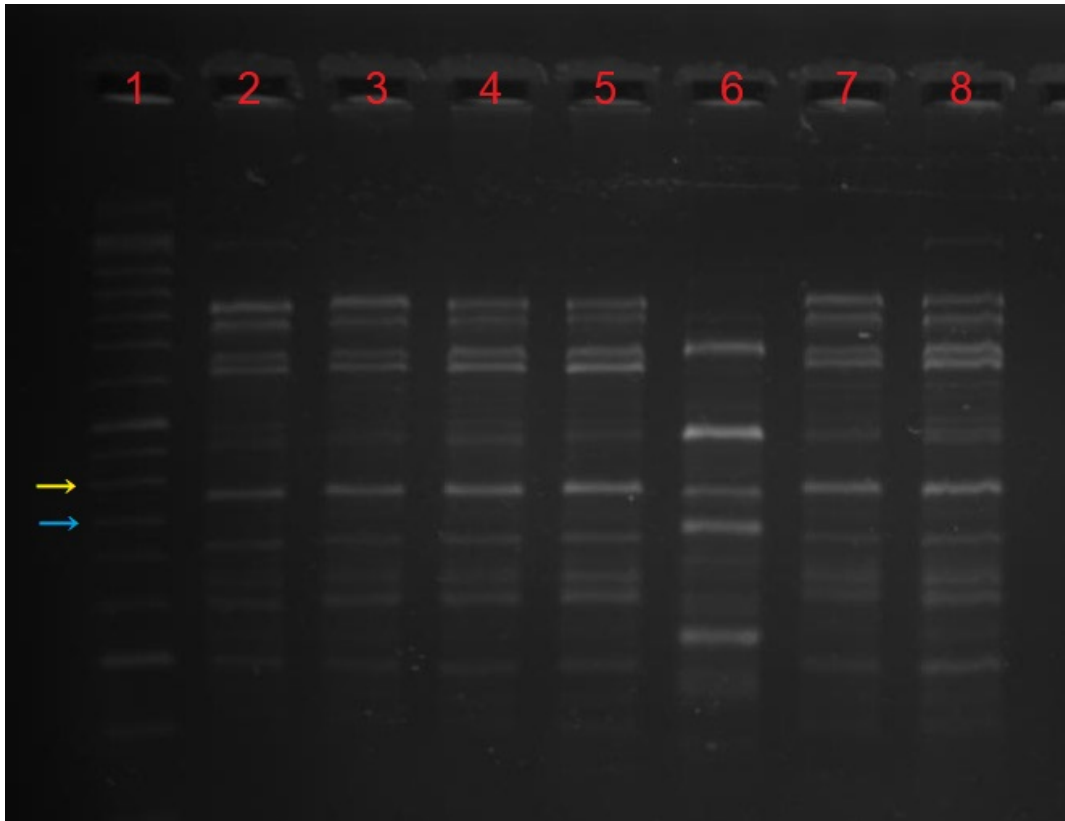


Figura 11:Gel de electroforesis mantenido durante 2h a 70V. En el pocillo 1 se observa el Marker VI (NZYTech) y a continuación se cargan las muestras PW (pocillo 2), PW2 (pocillo 3), PA (pocillo 4), PA2 (pocillo 5), PF (pocillo 6), GB (pocillo 7) y GB2 (pocillo 8). En el marcador la flecha amarilla indica la banda de 400pb y la azul la banda de 350pb.

Discusión

Mientras se trabajó con las muestras de mosquitero los resultados no fueron buenos, tanto en las medidas de calidad al NanoDrop 1000 como en los geles de electroforesis. En un primer momento se atribuyen estos resultados a un error en el procedimiento de extracción por parte del alumno, pero se confirma en presencia del tutor que no es así. A continuación, se especula con que algún componente del ensayo pueda estar en malas condiciones, comprobándose el tampón TAE, el tampón de carga, los primers, etc. Una vez descartados estos elementos se vuelve a la hipótesis de los errores en el procedimiento, pero son descartados de nuevo al realizar una técnica de laboratorio profesional con experiencia en el sexado de aves la extracción de las muestras 42-45 en presencia del alumno, obteniendo los mismos resultados (Tabla 1).

La explicación más plausible era pues, una degradación de las plumas. Para comprobarlo se hace una selección de 7 plumas lo más actuales posibles, del 2016, y se repite el proceso. En este caso el rendimiento de la extracción mejora, obteniéndose una buena calidad de ADN aunque poca concentración, pero sin que estos resultados positivos se trasladen al gel. Debía influir por tanto el pequeño tamaño de estos animales (8-12g), que implica que las plumas son muy pequeñas se obtiene muy poco ADN de las mismas. Es entonces cuando se comienzan a precipitar las muestras. La primera vez se precipitan exclusivamente las muestras, obteniéndose una leve mejoría en el gel, pero en ningún caso suficiente (Figura 8). Para mejorar estos resultados se añade ADN de mejillón (que no contiene el gen CHD y por tanto no interferirá con la posterior amplificación) durante la precipitación, con el objetivo de visibilizar el precipitado y facilitar el paso de eliminación del sobrenadante. Como resultado, se obtuvieron geles con mejores resultados pero que tampoco permitían un correcto sexado de las muestras. En la Figura 9 se puede ver el primero de estos geles, en el que se obtiene una banda bien definida en el rango adecuado (350-400pb) para la muestra 50. Sin embargo, de acuerdo al gel ese individuo sería un macho y como se puede comprobar en la Tabla 1 corresponde a una hembra confirmada. A continuación, en la Figura 10 se muestra el gel que mejores resultados arrojó en el caso de las muestras de mosquitero, apareciendo bandas bien definidas en 4 de las muestras empleadas: 39, 40, 41 y 42. Pero de nuevo solo aparece una banda para todas esas muestras, con lo que se trataría de machos, y al igual que sucedió con el gel de la Figura 9, al contrastar estos resultados con la Tabla 1 podemos apreciar que al menos los individuos 39, 40 y 42 son hembras contrastadas. Por lo tanto, tampoco podemos concluir el sexo de la muestra 41, un individuo indeterminado.

Finalmente, y como el tiempo acuciaba, se decide tomar una serie de muestras de aves de mayor tamaño con el objetivo presentar al menos un evento de sexado exitoso que confirmase el procedimiento. Se muestrean por tanto una serie de aves domésticas y se procede con la extracción y amplificación. Al tratarse de animales de mayor tamaño y de plumas arrancadas recientemente la calidad del ADN es buena en general, y se obtienen concentraciones más que suficientes (Tabla 2), sobre todo en el caso de las gallinas, por lo que se prescinde de la precipitación. En el gel, las muestras de canarios, codornices y faisanes adultos no dieron buenos resultados. Estas presentaban

concentraciones similares a las muestras de mosquitero del 2016, por lo que este hecho podría haber influido negativamente a la hora de amplificar, y se decide prescindir de ellas para la realización de un segundo gel. Por el contrario, las muestras de polluelos de gallina y faisán y las gallinas adultas se amplifican y se puede observar un gel con numerosas bandas, en particular una serie de bandas bien definidas entorno al rango adecuado (Figura 11). El problema surge al comprobar que en las muestras GB y GB2 solo se observa una banda en dicho rango, con lo cual se trataría en ambos casos de machos, y sabemos que al menos la muestra GB2 se corresponde con una hembra confirmada. De nuevo, como ocurría en el caso de los mosquiteros, este hecho no permite concluir el sexo de los polluelos.

Extracción del ADN

Es posible que la antigüedad de las primeras muestras tratadas afectase negativamente al resultado, como se deduce de la mejoría de los mismos al seleccionar las plumas del 2016. Utilizando las muestras de aves domésticas se ha comprobado que el kit *NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech)* usado para la extracción del ADN es perfectamente válido para la extracción de ADN a partir de plumas, si bien no parece el más adecuado cuando se trabaja con aves de reducido tamaño con plumas pequeñas que contienen poco ADN, como es el caso del mosquitero ibérico. Una precipitación puede mejorar los resultados y la posterior amplificación, pero dada la poca concentración de ADN es altamente recomendable utilizar métodos que permitan una mejor visibilización del pellet. Sería recomendable ensayar otros kits de extracción que se sabe han dado mejores resultados, como *Chelex® (Bio-Rad)* o *Realpure Spin Kit (REAL®)* (González-Suurbach, 2014; Caeiro Aguado, 2015). En el presente TFG no fue posible por el coste y el tiempo.

Amplificación mediante PCR y electroforesis

Los primers propuestos por Griffiths *et al.* (1998) no han arrojado resultados concluyentes en ninguna de las especies ensayadas en el presente TFG, aunque observando las progresivas mejorías en el gel se puede confirmar la amplificación del ADN.

En el caso los mosquiteros, el objetivo principal del presente TFG, no se han conseguido sexar muestras utilizando los primers P2/P8. Una vez comprobada la degradación de las plumas más viejas y subsanado el error, el problema parece derivar de una combinación de varios factores. En primer lugar el reducido tamaño de los animales y las plumas junto con un kit de extracción que no parece el más adecuado en este caso particular, hace que las concentraciones de ADN obtenidas sean muy bajas. En segundo lugar, el uso de los primers P2/P8, que amplifican secuencias con poca diferencia de peso combinado con el uso de geles de agarosa, que no ofrecen buena resolución, puede dificultar en incluso imposibilitar la apreciación de dichas diferencias (Ong *et al.*, 2008; Khaerunnisa *et al.*, 2013; Vucicevic *et al.*, 2013). La

magnitud de dichas diferencias de peso se puede apreciar al observar los resultados obtenidos por Lee *et al.* (2010), que mediante electroforesis capilar y tinción fluorescente compara las obtenidas con los primers P2/P8 y 2550F/2718R. Así, con la pareja de primers P2/P8 obtiene diferencias mínimas de 2,78pb en *Balearica pavonina* y máximas de 50,77pb en *Balearica pavonina regulorum*. Al observar los fragmentos amplificados para esas mismas especies con los primers 2550F/2718R se aprecian 182,99pb de diferencia en *Balearica pavonina* y 182,03pb en *Balearica pavonina regulorum*.

En lo que respecta a las aves domésticas, de nuevo nos enfrentamos a la misma problemática. Se observa una amplificación del ADN pero la combinación de primers que amplifican fragmentos muy pequeños combinado con un gel con poca resolución no permite un sexado concluyente. En Khaerunnisa *et al.* (2013) puede observarse esta misma problemática, no habiendo sido capaz de sexar dos muestras de gallina en gel de agarosa con los primers P2/P8 pero si con 2550F/2718R. Estos resultados son consecuentes con los datos obtenidos por Lee *et al.* (2010) que para la gallina doméstica sitúa la diferencia de peso obtenida con los primers P2/P8 en 16,31pb y con el par 2550F/2718R en 144,13pb.

A la vista de los resultados obtenidos con los *Phylloscopus ibericus* y *Gallus gallus domesticus*, combinado con la bibliografía mencionada, sería recomendable realizar el presente ensayo utilizando los primers 2550F/2718R o derivados, en caso de seguir utilizando geles de agarosa. Esta parece ser la opción más sencilla y barata. Otras alternativas serían emplear geles con mayor resolución, como los basados en acrilamida, que ofreciesen mejores resultados al combinarlos con el uso de los primers P2/P8, o implementar el uso de métodos que permitan apreciar mejor las diferencias en las bandas, como por ejemplo un procesamiento con Agilent 2100 Bioanalyzer, que permite apreciar bandas de hasta 5pb de diferencia (Prieto López, 2016) o secuenciación capilar. De nuevo en el presente TFG no fué posible por el coste y el tiempo.

Conclusiones

No ha sido posible sexar ninguna de las muestras empleadas en el presente TFG. El motivo parece haber sido el uso de muestras con una baja concentración de ADN y el empleo de primers que aportan poca diferencia en el tamaño de las bandas combinado con el gel de agarosa, que tampoco contribuye a aportar la resolución necesaria.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos afirmar que los primers propuestos por Griffiths et al. (1998) son válidos, puesto se aprecia amplificación del material genético, pero no son los más adecuados para el sexado de *Phylloscopus ibericus*.

Conclusions

It was not possible to determine the sex of any of the samples used in this TFG. The reason seems to be the use of samples with a low concentration of DNA and the use of primers that provide little difference in the size of the bands combined with the agarose gel, which also does not contribute to the necessary resolution.

In view of the results obtained, we can affirm that the primers proposed by Griffiths *et al.* (1998) are valid, since amplification of the genetic material is appreciated, but they are not the most suitable for the sex determination of *Phylloscopus ibericus*.

Bibliografía

- Älstrom, P.; Ericson, P. G. P.; Olsson, U. & Sundberg, P. (2006). Phylogeny and classification of the avian superfamily Sylvioidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38:381–397.
- Balmori, A & Cuesta, M. A. (2003). Distribución del Mosquitero Ibérico (*Phylloscopus ibericus*) y el Mosquitero Común (*Phylloscopus collybita*) en la Península Ibérica. *El Escribano Digital*, marzo 2003, 37:6.
- Caeiro Aguado, M. (2015). Sexado molecular en aves rapaces. Trabajo de Fin de Grado, A Coruña, Universidade da Coruña.
- Crochet P.-A., Joynt G. (2015). AERC list of Western Palearctic birds. July 2015 version. [Consulta: 16 agosto 2018] <<http://www.aerc.eu/tac.html>>.
- Dubiec, A & Zągalska-Neubauer, M (2005). Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological Letters*, 2006, 43:3.12.
- Ellegren, H. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology & Evolution*, mayo 2000, 12:188-192.
- Ellegren, H.; Hultin-Rosenberg, L; Brunström, B.; Dencker, L.; Kultima, K. & Scholz, B. (2007). Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes. *BioMed Central Biology*, 2007, 5:40.
- Fridolfsson, A. K. & Ellegren, H. (2000). Molecular Evolution of the Avian *CHD1* Genes on the Z and W Sex Chromosomes. *Genetics Society of América*, 155:1903-1912.
- González-Suurbach, S. (2014). Determinación del sexo 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.
- Helbig, A. J.; Salomon, M; Bensch, S. & Seibold, I. (2001). Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. *Journal of Evolutionary Biology*, 14:277-287.
- Ito, H; Sudo-Yamaji, A.; Abe, M.; Murase, T. & Tsubota, T. (2003). Sex Identification by Alternative Polymerase Chain Reaction Methods in Falconiformes. *Zoological Science*, 20:339-344.
- Khaerunnisa, I.; Sari, E.; Ulfah, M.; Jakaria, y Sumantri, C. (2013). Avian Sex Determination Based on Chromo Helicase DNA-binding (CHD) Genes Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Media Peternakan*, 85-90.
- Lee, J. C.; Tsai, L.; Hwa, P.; Chan, C.; Huang, A; Chin, S.; Wang, L.; Lin, J.; Linacre, A.; Hsieh, H. (2013). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*, 24:27–31.

- Matta-Camacho, N. E.; Ramírez, N.; Zuñiga, B. C. & Vera, V. (2012). Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta Biológica Colombiana*, 14:25-38.
- Monteagudo, A.; Carregal, X. M.; Fernández, G. & Del Río, A. (2013). Caracterización biométrica del mosquitero ibérico *Phylloscopus ibericus* y su segregación del mosquitero común *Phylloscopus collybita* en una población del noroeste ibérico. En: Rodríguez, N., García, J. & Copete, J. L. (Coord.) *El mosquitero ibérico*. Grupo Ibérico de Anillamiento, León, 61-74.
- Morinha, F.; Cabral, J. A. & Bastos, E. (2008). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*, 78:703–714.
- NZYTech. NZY Tissue gDNA Isolation kit.
- Ong, A. H. K. & Vellayan, S. (2008). An Evaluation of CHD-Specific Primer Sets for Sex Typing of Birds from Feathers. *Zoo Biology*, 27:62–69.
- Onrubia, A.; Arroyo, J. L.; Andrés, T.; Gómez, J.; Unamuno, J. M. & Zufiaur, F. (2003). El mosquitero ibérico (*Phylloscopus ibericus*): identificación, biometría y apuntes sobre su migratología. *Revista de anillamiento*, diciembre 2003, 12:18-29.
- Prieto López, A. M. (2016). Sexado molecular en la corneja negra (*Corvus corone*). Trabajo de Fin de Grado, A Coruña, Universidade da Coruña.
- Sociedad Española de Ornitología. Mosquitero común (*Phylloscopus collybita*) [en línea]. [Consulta: 9 agosto 2018] <<https://www.seo.org/ave/mosquitero-comun/>>
- Sociedad Española de Ornitología. Mosquitero ibérico (*Phylloscopus ibericus*) [en línea]. [Consulta: 9 agosto 2018] <<https://www.seo.org/ave/mosquitero-iberico/>>
- Smith, C. A. & Sinclair, A. H. (2004). Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays*, 26:120–132.
- Smith, C. A. (2010). Sex determination in birds: a review. *Emu Austral Ornithology*, 110:364–377.
- Salomon, M.; Salomon, M., Bried, J., Helbig, A. J., & Riofrio, J. (1997). Morphometric differentiation between male common chiffchaffs, *Phylloscopus (c.) collybita* Vieillot, 1817, and iberian chiffchaffs, *P.(c.) brehmii* Homeyer, 1871, in a secondary contact zone. *Zoologischer Anzeiger*, 236:25-36.
- Solomon, M.; Voisin, J. & Bried, J. (2003). On the taxonomic status and denomination of the Iberian Chiffchaffs. *Ibis International Journal of Avian Science*, 145:87–97.
- Svensson, L. (2001). The correct name of the Iberian Chiffchaff *Phylloscopus ibericus* Ticehurst 1937, its identification and new evidence of its winter grounds. *Bulletin-British Ornithologists Club*, 121:281-296.

- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual.
- 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.; Basra, M. A.; Baxevanis, A. D.; Hieter, P. & Collins, F. S. (1997). Characterization of the CHD family of proteins. *Genetics*, 94:11472–11477.