



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR DIRIGIDA AL GEN CHD, PARA  
EL SEXAJE DE AVES DEL ORDEN PSITTACIFORME  
COMERCIALIZADAS COMO MASCOTAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**TANIA PATRICIA GUERRERO ALTAMIRANO**

**ASESORA: DRA. MARÍA LEONOR QUINTERO MORA**

**COASESOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Índice

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>Índice</b>             | <b>1</b>  |
| <b>Resumen</b>            | <b>2</b>  |
| <b>Introducción</b>       | <b>3</b>  |
| <b>Marco teórico</b>      | <b>5</b>  |
| <b>Justificación</b>      | <b>28</b> |
| <b>Objetivos</b>          | <b>29</b> |
| <b>Hipótesis</b>          | <b>30</b> |
| <b>Material y métodos</b> | <b>31</b> |
| <b>Resultados</b>         | <b>39</b> |
| <b>Discusión</b>          | <b>51</b> |
| <b>Conclusiones</b>       | <b>56</b> |
| <b>Bibliografía</b>       | <b>57</b> |
| <b>Anexo</b>              | <b>64</b> |

## Resumen

La búsqueda actual de herramientas para conocer el sexo de las aves monomórficas se ha enfocado en el desarrollo de métodos moleculares eficaces, ganándole terreno a las prácticas convencionalmente utilizadas, como: la morfometría, ultrasonografía, análisis de esteroides y los métodos quirúrgicos. Dichos procedimientos pueden tornarse ambiguos e invasivos, por lo que carecen de capacidad para aplicarse a poblaciones silvestres. Herramientas como el análisis de cariotipo, la citometría de flujo, las técnicas de hibridación del DNA y el uso de enzimas de restricción para el sexaje, son eficaces a nivel experimental, pero presentan mayor complejidad y difícilmente se pueden reproducir a gran escala.

La amplificación por PCR de una región del gen CHD1 resulta ideal para identificar el sexo de las aves, debido a las diferencias intrónicas entre el cromosoma W (único de hembras) y el cromosoma Z (del cual los machos presentan 2 copias). Los iniciadores CHD1F/CHD1R han sido empleados para la identificación del sexo de 144 aves de 58 especies distintas, obteniendo mejores resultados que con otros iniciadores previamente reportados, sin embargo, estos iniciadores no han sido probados en especies del orden Psittaciforme.

Debido a que los psitácidos son de las aves más comercializadas en muchos países, en el presente trabajo se estandarizó y aplicó la técnica de PCR para la amplificación del gen CHD1 empleando los iniciadores CHD1F/CHD1R para realizar el sexaje de aves del orden Psittaciforme. La metodología propuesta es poco invasiva debido a que la obtención de DNA se lleva a cabo a partir de plumas y se realizó por el método de fenol cloroformo y con Chelex. Determinamos que las plumas de la región torácica son las más adecuadas para este fin y el mejor método de conservación de las mismas es con etanol al 70%.

Realizamos el sexaje de 9 especies de psitácidos, pertenecientes a dos familias diferentes.

Esta técnica de sexaje molecular pone al alcance de los criaderos de aves una herramienta eficaz para conocer el sexo de sus ejemplares, lo cual favorecerá sus programas de reproducción y promoverá la cría en cautiverio, de especies tanto de compañía como en alguna categoría de riesgo.

## Introducción

Los Psittaciformes comparten características anatómicas como, ser zigodáctilos, tener pico en forma de gancho, lengua gruesa y prensil, cabeza grande con cuello corto y fosas nasales localizadas en una zona gruesa desprovista de plumas. México cuenta con 24 especies de psitácidos, de éstas, seis son endémicas y desde hace décadas han disminuido su distribución debido principalmente a su extracción del medio silvestre y a la fragmentación de su hábitat. Actualmente, a nivel mundial, los psitácidos habitan dentro de un rango de latitud de 30°N-54°S (Cantú, *et al.* 2007; Franco, 2013).

La distinción de los sexos en las aves permite obtener información biológica relevante para poblaciones en peligro de extinción, que se encuentran sujetas a programas de reproducción en cautiverio. Sin embargo, en algunas familias de aves se ha vuelto un reto debido a la ausencia de dimorfismo sexual, es decir, que hembras y machos son indistinguibles externamente unos de otros. Entre los psitácidos americanos, la mayor parte no presenta un dimorfismo sexual secundario apreciable, de hecho, se considera que el 75% de las especies de psitácidos son monomórficas (Bonilla *et al.* 2011). Debido a ello, a través de los años se ha diseñado una variedad de herramientas para conocer el sexo de este tipo de aves, las cuáles se pueden clasificar como métodos invasivos y métodos no invasivos. Los métodos invasivos son referidos casi siempre como técnicas convencionales. Entre éstos últimos se encuentran las técnicas quirúrgicas de laparoscopia y laparotomía, el examen de cloaca y el análisis morfométrico. Dichos procedimientos representan un riesgo para la vida del ave, se pueden tornar ambiguos, requieren mayor inversión de tiempo y son difíciles de aplicar a grandes poblaciones. (Miyaki *et al.* 1998; Rusello y Amato 2001; Vucicevic *et al.* 2012). Otra opción es la ultrasonografía, que por su parte, presenta el problema del manejo y la complicada visualización de los órganos reproductivos, debida a la presencia de los sacos aéreos (Breeding *et al.* 2012; Jensen y Durrant, 2003).

Un método considerado menos invasivo es el análisis de esteroides en suero o heces, el cual se basa en la relación de estrógenos:testosterona, de modo que, en hembras se espera una mayor relación que en machos. Aunque, eventualmente se obtienen resultados influenciados por otros factores, y existe la dificultad de diferenciar entre las heces de cada individuo (Lee *et al.* 1999; Penfold *et al.* 2003).

El análisis del cariotipo o exploración cromosómica y la citometría de flujo son aplicables en casi todas las especies de aves por las diferencias esperadas entre los cromosomas sexuales de hembras y machos, además, cuentan con mayor sensibilidad y especificidad, pero son potencialmente invasivas ya que se requiere de sangre o células vivas de una pluma en crecimiento. Otra limitante de estos métodos a nivel experimental, deriva de la mayor complejidad en su realización. (Miyaki *et al.* 1998; Fridolfsson y Ellegren, 2000).

En los últimos años, los estudios para conocer el sexo de las aves monomórficas se han enfocado en el desarrollo de métodos moleculares eficaces y confiables, desplazando las prácticas mencionadas anteriormente. Algunas técnicas moleculares que se han probado son la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), minisatélites, la PCR dirigida a marcadores relacionados con el sexo, y el uso de enzimas de restricción para determinar los nucleótidos que pertenecen a cada cromosoma sexual (Bermúdez *et al.* 2002; Matta, 2009).

El gen CHD1, ha resultado un marcador ideal para identificar el sexo de las aves. Codifica para la proteína cromohelicasa de unión al DNA (*Chromodomain helicase DNA binding protein*) que está relacionada con la regulación de la expresión genética. Además de que se encuentra altamente conservado entre las especies, su utilidad radica en las diferencias intrónicas presentes entre el cromosoma W (único de hembras) y el cromosoma Z (del cual los machos presentan 2 copias) El sexaje por medio de la amplificación de este gen, implica una metodología simple y rápida, comparada con la otras técnicas moleculares, además de requerir pequeñas cantidades de DNA, que pueden obtenerse de gotas de sangre e incluso de una pluma (Fridolfsson y Ellegren, 2000; Bello *et al.* 2001; Vucicevic *et al.* 2012; ).

## Marco teórico

### 1. Características generales de los psitácidos

#### 1.1 Historia natural y ecología

Los psitácidos son un grupo que ha vivido en la Tierra por un largo tiempo. Su ancestro más antiguo, *Palaepsittacus georgei* vivió durante el Eoceno medio, hace aproximadamente 40 millones de años (Juniper y Parr, 2010). El estudio de los caminos evolutivos que determinaron la formación de la increíble diversidad del orden Psittaciforme que vemos hoy en día, se ha visto complicado debido a la escasez de registros fósiles adecuados, pues éstas aves evolucionaron en ambientes tropicales muy húmedos, que evitaron la fosilización adecuada. A esta dificultad se ha sumado la marcada homogeneidad estructural que exhiben, pues obstaculiza la comparación con sus ancestros y con otras familias que viven en la actualidad. Los estudios basados en el DNA y la filogenética, demuestran que los psitácidos no tienen ningún pariente cercano viviente en otras familias de aves. (Del Valle, 2008; Juniper y Parr, 2010).

Los psitácidos están principalmente distribuidos en los trópicos y los subtropicos desde una latitud de 32° 46' 06" N. Aunque, algunos llegan hasta latitudes templadas. Ejemplo de ello es la Cotorra Austral (*Encinognathus ferrogineus*), en Sudamérica que abarca desde Tierra de Fuego en la parte sur de la zona templada hasta 54°S. En el Nuevo Mundo y Australia, encontramos 145 y 59 especies representando 25 y 26 géneros respectivamente. Por razones aún sin comprender, en África, existe una variedad relativamente pobre de ésta familia, con solo 23 especies de 5 géneros. (Juniper y Parr, 2010; Franco, 2013)

La mayoría de los psitácidos son exclusivamente arbóreos, aunque existen algunas excepciones como el Perico de Suelo (*Pezoporus wallicus*) y el Kakapo (*Strigops habroptilus*). Ciertas especies se localizan en la costa durante al menos una parte de su ciclo anual, por ejemplo el Periquito Ventrinaranja (*Neophema chrisogaster*) de Australia. Son aves de hábitos crepusculares, con mayor actividad en la mañana y al atardecer. Pasan las primeras horas de su día alimentándose, tienen un segundo período de alimentación por la tarde antes de reunirse en grupos para volver a sus perchas de noche. Es común, que previo a acomodarse para la noche realicen

vocalizaciones muy ruidosas y tengan una intensa interacción entre los miembros del grupo. El silencio en que permanecen durante la mayoría de las horas luz, se asocia a un comportamiento anti-depredadores, al igual que su comportamiento social. Lo más común es hallarlos en parvadas, desde 4 hasta 200 individuos, o mínimo en parejas. (Robaldo, 2001; Juniper y Parr, 2010; Franco, 2013)

## 1.2 Taxonomía y morfología

Los psittaciformes conforman un orden de 350 especies aproximadamente, que presentan un diseño tan exitoso que se conserva en prácticamente todas sus familias. La mayoría de los autores, los dividen en 3 super familias, 3 a 4 familias, 5 a 8 subfamilias y alrededor de 86 géneros. Las tres familias más aceptadas actualmente son: Strigopidae, Cacatuidae y Psittacidae. En base a los estudios genéticos, se ha considerado que sería pertinente clasificarles también por su distribución geográfica. Tentativamente sugiriendo que los agrupamientos se basen en la Región Africana, Nuevo Mundo y Región Australiana (O'Malley, 2007; Harcourt y Chitty, 2005; Del Valle, 2008; Cracraft, 2013).

Como ya se ha mencionado, comparten patrones morfológicos muy marcados como, colores brillantes, cabeza grande, cuello corto, pico grande y fuerte con forma de gancho. Los ojos son relativamente pequeños, frecuentemente rodeados de piel desnuda, siendo más marcado en especies grandes. Presentan un opérculo desarrollado (cera) sobre la nariz, que además está descubierto de pluma. El maxilar es móvil y flexible, debido a que la articulación craneofacial tiene forma de bisagra. Su lengua es larga y musculosa, lo que confiere la capacidad realizar vocalizaciones tan características. La región de la tibia es corta y emplumada, con un tarsometatarso relativamente largo y cubierto con escamas pequeñas y granulares. Son especies zigodáctilas, es decir que tienen los dedos II y III, dirigidos cranealmente y el I y IV caudalmente, lo que les permite percharse y desplazarse por los árboles. Además esto, le permite a la mayoría de los psitácidos arbóreos manipular su comida con los miembros pelvianos (Baumel *et al.* 1979; O'Malley, 2007; Franco, 2013). Los colores del plumaje son variados, predominando el verde, especialmente en las especies sudamericanas. Podemos encontrar también, las combinaciones de verde con rojo, amarillo y azul. En especies asiáticas y africanas es común el color blanco, gris, negro y parches rojos, amarillos o azules en cabeza, alas y cola. El plumaje adulto

aparece generalmente entre el primero y segundo año de vida. Cada año los psitácidos atraviesan una muda total, los jóvenes reemplazan su plumaje juvenil hasta cumplir el año o más. Los adultos pueden experimentar una muda tras el apareamiento (Tejera y De Tejera, 2001; Harcourt y Chitty, 2005; Juniper y Parr, 2010).

### *1.3 Reproducción y longevidad*

Su período de vida es largo, de hecho son animales conocidos por su longevidad. Existen especies que pueden llegar a los 86 años, como los loros del género *Amazona* o más de 90 años como el Kakapo (*Habrotilus strigops*). Se ha observado que alcanzan la madurez sexual entre los 3 a 4 años de edad (Spoon, 2006; Franco, 2013).

La mayoría son especies monógamas, el período reproductivo lo inician en los días más cortos (con menor cantidad de horas luz). Esto lo hacen para que los polluelos nazcan en los días con más horas luz y por lo tanto, haya mayor disponibilidad de alimento. El lugar de anidación varía de acuerdo a la especie, la mayoría anidan en huecos o cavidades de los árboles. La Cotorra Serrana Oriental (*Rhynchopsitta terrisi*), anida en barrancas o acantilados y el Perico Atolero (*Aratinga canicularis*), anida exclusivamente en termiteros (Cantú *et al.* 2007; Franco, 2013).

El cortejo en este grupo de aves, puede implicar una variedad de caracteres. En la mayoría de las especies de la familia Cacatuidae, resulta especialmente notorio, pues envuelve el levantamiento de sus crestas. En general exhiben comportamientos de pavoneo, inclinan la cabeza, extienden las alas y también realizan vocalizaciones, pero no en forma de melodías. Otro ritual de apareamiento observado en estas especies, es el cortejo con alimento, que consiste en regurgitar alimento para la pareja. En la mayoría de las especies que exhiben monomorfismo sexual, ha resultado más difícil el entendimiento cabal de su comportamiento reproductivo (Spoon, 2006).

Pueden poner de 1 a 8 huevos, las especies pequeñas ponen mayor número y las grandes, menos. Al nacer, los polluelos son dependientes de los padres, es decir que son *nidícolas* o *altriciales*. Por ejemplo, los polluelos de *Anodorhynchus hyacinthinus*, en promedio permanecen 107 días en el nido (Spoon, 2006; Franco, 2013).

No todas las aves del orden Psittaciformes se reproducen anualmente, algunas tardan 2 a 5 años. El éxito reproductivo de los psitácidos es bajo, debido principalmente a su longevidad, la cual va relacionada con la cantidad de huevos que depositan. Las especies más longevas, como las guacamayas y los loros del género *Amazona* ovipositan de 1 a 4 huevos y su éxito de eclosión es de 0.82 en promedio. El éxito reproductivo se ha visto aún más mermado por causas relacionadas a la actividad humana, como la captura ilegal y la destrucción de su hábitat y sitios de anidación (Cantú *et al.* 2007; Franco, 2013).

#### *1.4 Los psitácidos como aves de compañía*

El humano siempre se ha sentido atraído a las aves de ornato, especialmente a los psitácidos por su habilidad para imitar sonidos y por sus coloridos plumajes. Los pericos, loros y guacamayas son las aves más caras en las tiendas de mascotas. El comercio de pericos es una actividad que se ha realizado en México desde hace siglos. Para los pueblos prehispánicos fueron desde alimento, mascotas, hasta piezas artísticas y de tributo. Ésta actividad incrementó con la colonización española. Desafortunadamente con la demanda internacional vino el contrabando; éste alcanzó su punto más alto en la década de 1980's. Se estima que en éste período se contrabandeaban anualmente, entre 50,000 y 150,000 pericos neotropicales hacia los Estados Unidos. De las especies nacionales que han estado presentes en el comercio por décadas, las más comunes son el Perico atolero (*Aratinga canicularis*), el Perico frente blanca o guayabero (*Amazona albifrons*) y la Cotorra cuchá (*Amazona autumnalis*) (Cantú *et al.* 2007; Cerit y Avanus, 2007).

Entre las especies internacionales que más se importan a México como mascotas, encontramos; del Nuevo Mundo, la Guacamaya azul y oro (*Ara ararauna*), el Loro Maitaca Verde (*Pionus maximiliani*), el Papagayo frente azul (*Amazona aestiva*), y la Cotorra Monje (*Myiopsitta monachus*). Del continente africano, el famoso Fischer o Periquito del Amor (*Agapornis fischeri*), La Cotorra de Kramer (*Psittacula krameri*), que se distribuye naturalmente desde Senegal hasta China. De Oceanía, se listan sobre todo el Periquito Australiano (*Melopsittacus undulatus*) y la Ninfa (*Nymphicus hollandicus*) (Rusello y Amato, 2001; Franco, 2013).

El gobierno mexicano permitió el comercio legal de ciertas especies de psittaciformes hasta el año 2002. Sin embargo, entre una normativa pobremente gestionada y

aplicada, y la demanda de dichas especies, la veda quedó lejos de detener su captura y comercialización ilegal. Se formó un mercado negro, que a la fecha ha provocado estragos irremediables sobre las especies nativas de psitácidos. Se estima que cada año se capturan entre 65,000 a 78,500 ejemplares de especies nacionales (Cantú *et al.* 2007).

El comercio indiscriminado de ésta familia de aves ha desencadenado una serie de hechos que, rápidamente se han salido de las manos de las autoridades. Un ejemplo de ello, es que la importación legal de especies no nativas (exóticas), provenientes de todo el mundo, se ha incrementado tanto, que algunas de éstas especies ya se encuentran dentro del tráfico ilegal e incluso son decomisadas en mayores volúmenes que las especies mexicanas. Desafortunadamente, el incremento de la importación de especies exóticas, no ha frenado la captura ilegal de psitácidos nativos. La cría en cautiverio de especies exóticas más comunes, a pesar de ser una de las soluciones propuestas para reducir el comercio ilegal de especies amenazadas, ha tenido la desventaja de que, sus aves alcanzan muy altos costos en el mercado legal, por lo que no representan competencia para el comercio ilícito. Además, la cría en cautiverio en México se encuentra en una etapa temprana y carece de muchas herramientas, para, por un lado poder abastecer la alta demanda de éstas especies a costos accesibles y por el otro poder reproducir a las especies mexicanas amenazadas (Cantú *et al.* 2007, Gálvez s/a).

Otra consecuencia del comercio ilegal es que, debido a su mal manejo, muchas de las especies que se importan para sustituir las especies amenazadas, se han vuelto especies invasoras, que compiten por un nicho ecológico, trayendo como consecuencia la disminución aún más dramática de las poblaciones nativas. Por ejemplo, se estima que hay más de 27 especies de aves invasoras tan solo en Norte América. Ejemplo de una especie de psitácido considerada invasora es el Perico de Collar o Cotorra de Kramer (*Psittacula krameri*), que fuera de su distribución natural en África y Sur de Asia, se encuentra en la Península Arábiga, Reino Unido, Holanda y España. (Forshaw, 2010). Por ello, es considerado por muchos estudiosos del tema que, la veda del aprovechamiento extractivo de psitácidos silvestres debe ir acompañada de una campaña de educación integral, entre los países que así competa, para hacer consciente a la población, e integrarse con el apoyo a la cría en cautiverio regulada y responsable (Cantú *et al.* 2007).

## 2. Importancia del sexaje en aves

### 2.1 La ausencia de dimorfismo sexual.

Cierta proporción de las aves del mundo pueden ser diferenciadas sexualmente por sus características morfológicas, no obstante, aproximadamente el 50% de las especies de aves carecen de dichas características, y por lo tanto se requieren otros métodos para conocer su sexo. Se considera que el 75% de las especies de psitácidos son monomórficas (Bonilla *et al.* 2011). Las especies sudamericanas, en general, no presentan dimorfismo sexual externo. Algunas excepciones a la regla son; el Loro Cica (*Triclaria malachitacea*) y algunos individuos de los géneros *Pionopsitta*, *Touit*, *Psilopsiagon* y *Forpus* (Robaldo *et al.* 2001; Donohue y Dufty, 2006; Moreno *et al.* 2011; Vucicevic *et al.* 2012).

Galvez A. (s/a), realizó una revisión de las posibles causas de la ausencia de dimorfismo sexual, resaltando principalmente los siguientes puntos: los psitácidos que la presentan pueden haberla desarrollado como estrategia de sobrevivencia entre machos y hembras, ya que, tanto en mamíferos como aves se ha demostrado que los machos juveniles presentan mayor índice de mortalidad que las hembras. Otro factor es el comportamiento monógamo, lo que conduce a un elección mutua de la pareja en ambos sexos. El esfuerzo equitativo en los cuidados parentales, también se ha postulado como posible agente que favoreció, que la selección natural y sexual hayan ido en sentido opuesto que en otras especies. Caso opuesto de las aves migratorias, territoriales o polígamas (González y Estados, 2009; Lemons *et al.* 2012).

### 2.2 Aplicaciones del sexaje

Conocer el sexo de las aves tiene un impacto tanto en Medicina Veterinaria como en Biología de la Conservación, pues es un punto esencial para el manejo reproductivo y se considera parte del diagnóstico en la práctica clínica del Médico Veterinario (Franco, 2013).

Como ya se mencionó, los pericos, loros y guacamayas son aves muy demandadas como mascotas y es muy común que en las tiendas de mascotas sean las aves más caras y que los clientes quieran conocer el sexo de su futura mascota. Desafortunadamente, en la mayoría de las tiendas los vendedores desconocen ésta información y suelen dar explicaciones incorrectas (Cerit y Avanus, 2007).

Los criaderos de especies comercializadas como mascotas, se ven frecuentemente orillados a adquirir polluelos del mercado negro, pues tienen poco o nulo éxito reproductivo con las especies monomórficas, por ello, es importante contar con una herramienta que les permita conocer de manera certera el sexo de sus aves reproductoras, implicando esto no solo el abasto de las tiendas de mascotas, sino también, un punto a favor para la protección de poblaciones silvestres (Cantú *et al.* 2007; Cerit y Avanus, 2007).

En la actualidad el número de especies de aves que se encuentran en alguna categoría de riesgo, es alarmante y va en aumento, por ello la mayoría de éstas, entre las que figuran muchos psitácidos, se encuentran sometidas a programas de reproducción y recuperación de poblaciones. Esto implica entre otras cosas, identificar con certeza el sexo de todos los ejemplares dentro del programa. En algunas especies es necesario incluso, definir el número de individuos y la proporción de sexos opuestos (parejas potenciales), en un espacio determinado. Tal es el caso de los zoológicos, reservas y centros de reproducción (Stevanov, 2013).

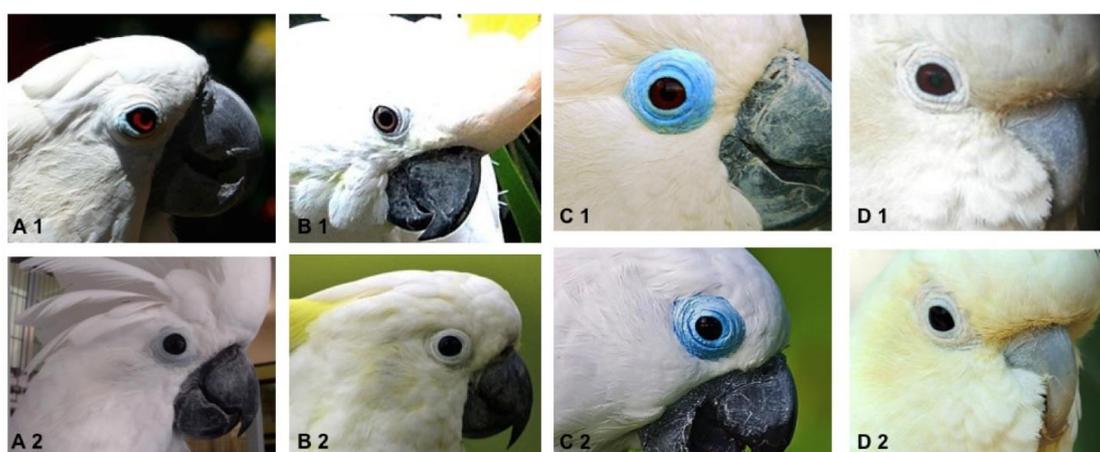
En polluelos y en embriones, la determinación del sexo basado en la morfología externa es imposible y para la mayoría de los criaderos, la capacidad de obtener esta información oportunamente, sería invaluable. En la ornitología, también es muy importante conocer el sexo de las aves de manera rápida y confiable, para investigaciones sobre el comportamiento de forrajeo o búsqueda de alimento, en el entendimiento de los patrones de dispersión y migración, para la determinación del éxito reproductivo en vida libre, así como la proporción de hembras y machos, cambios evolutivos y selección sexual, entre muchas otras aplicaciones (Donohue y Dufty, 2006; Jensen *et al.* 2012; Stevanov, 2013).

### **3. Métodos convencionales para el sexaje de aves**

Con el fin de conocer el sexo en especies monomórficas, se han diseñado y probado una gran variedad de técnicas, que pueden clasificarse por ser invasivas y no invasivas, o convencionales y no convencionales.

Uno de los métodos convencionales más socorridos, por ser relativamente sencillo y por la posibilidad de realizarse en campo, es el examen morfométrico. Ésta técnica se basa en comparar y medir diferentes características morfológicas. Los parámetros que

toman en cuenta son el peso, largo de la cola, tamaño, color del plumaje, el tamaño de la cabeza y el pico, y en psitácidos específicamente, se utiliza el color del iris y de las plumas, la abertura del hueso del pubis, y se complementan con el comportamiento sexual específico. Los análisis morfométricos han sido utilizados con éxito para definir el dimorfismo sexual en familias como los Hirundínidos, los Córvidos y los Colúmbidos. En psitácidos se aplica fácilmente en la familia Cacatuidae, debido a la diferencia en el color del iris entre hembras, que presentan coloración rojiza oscura y los machos que la presentan café oscuro, casi negro, aunque, estas características solo se pueden apreciar en aves mayores de 3 años (Fig. 1).



**Figura 1** Determinación del sexo en base al color del iris en la familia Cacatuidae. Se observan las diferencias en el color del iris entre hembras y machos de 4 especies diferentes. Las imágenes superiores, con el iris café claro a rojizo corresponden a hembras y las inferiores, con iris de color café oscuro a negro, son machos. A1,A2: *Cacatua alba*; B1,B2: *Cacatua galerita*; C1,C2: *Cacatua ophthalmica*; D1,D2: *Cacatua haematuropygia*. Fuente: fotografías A1, B1, C1, C2 y D1: wildscienceblog.tumblr.com; fotografías A2, B2 y D2: colección personal.

Otro ejemplo, es la presencia de colores más brillantes en las hembras de Kananga (*Ecletus roratus*), o el color de las plumas bajo la cola en el Loro de Senegal (*Piocephalus senegalus*). En el famoso Periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), se diferencian hembras de machos, ya que éstos últimos presentan la cera de color azul durante la vida adulta. Entre las especies mexicanas que pueden ser sexadas por ésta técnica está el Loro frente blanca (*Amazona albifrons*), donde las hembras presentan un parche rojo en las alas de menor dimensión que en machos y el Periquito enano (*Forpus cyanopygius*), en el cual los machos que tienen color azul turquesa en las plumas cobertoras e internas de alas y en la región de la grupa (regiones sinsacral, iliaca preacetabular e iliaca postacetabular) mientras que las

hembras carecen de ésta coloración (Juniper y Parr, 2010; Bonilla *et al.* 2011; Gálvez, s/a).

Otra técnica utilizada desde hace décadas para conocer el sexo de las aves, es el análisis de esteroides fecales. El examen de metabolitos en heces u orina ha sido muy exitoso en especies silvestres por no ser invasivo y por la gran cantidad de información que proporciona. En psitácidos, ha demostrado ser una gran herramienta para evaluar la actividad de las gónadas, los cambios estacionales, el estatus reproductivo e incluso los cambios fisiológicos asociados al estrés. El análisis de esteroides fecales para identificar el sexo de las aves, se fundamenta en la medición de los metabolitos del estrógeno y la testosterona y en la relación de ambas hormonas durante determinados períodos de tiempo, de modo que en hembras se espera una mayor relación que en machos. Sin embargo, eventualmente estas relaciones pueden verse alteradas por otros factores desligados al sexo, como los cambios estacionales, el estrés y la edad. Otras desventajas que presenta son, la dificultad de evitar la degradación de hormonas en las muestras por congelamiento y el poder diferenciar las heces de cada ejemplar, cuando se encuentran varias aves juntas (Penfold *et al.* 2003; Fuller *et al.* 2011; Lee *et al.* 1999).

La ultrasonografía como herramienta para el sexaje de aves, se realiza por medio de la visualización de los órganos sexuales. Para ello usualmente se utiliza un transductor de 5 o 7.5 MHz, pudiendo acceder por las regiones craneoventral (caudal al esternón) y caudoventral de la región abdominal, lateral paraesternal (inadecuada para psitácidos) o transrectal con transductores de muy alta frecuencia. La obtención de una imagen clara de las gónadas requiere de experiencia y de sortear el obstáculo que representan los sacos aéreos de las aves (Meredith y Redrobe, 2002; Vucicevic *et al.* 2012).

Los métodos quirúrgicos son definitivos en la determinación del sexo, pero han caído en desuso por ser invasivos y no poder utilizarse en especies pequeñas. Éstos comprenden la laparoscopia y laparotomía y deben ser realizados por un Médico Veterinario especializado en cirugía de aves y bajo anestesia. En la endoscopia de aves se utilizan los endoscopios largos y rígidos para mejores resultados. Para visualizar las gónadas, se realiza una incisión entre las últimas dos costillas del lado izquierdo (Samour, 2000; Meredith y Redrobe, 2002; Harcourt y Chitty, 2005).

La exploración de la cloaca es una de las técnicas más antiguas para el sexaje de las aves, al igual que otras técnicas, se utilizó primero en especies domésticas y luego en especies no convencionales. Se basa en obtener la medida de la cloaca y su grado de dilatación, con ayuda de un vernier. Si se tiene experiencia y conocimiento de sus limitantes, es útil a nivel campo. Sus principales desventajas son, que solo es confiable en hembras que han puesto huevos y sus posibles parejas, también puede perder su precisión por diferencias entre especies y la temporada en que se realice (Boersma y Davies, 1987; Cerit y Avanus, 2007, 2).

Por medio de la citogenética o exploración cromosómica es posible inferir el sexo realizando un análisis de los cromosomas. Para aplicar ésta técnica se requieren células provenientes de una pluma en crecimiento, lo que se traduce en la necesidad de manejar el ave al menos en dos ocasiones más, una para encontrar los sitios donde mudará una pluma y una segunda vez a los 20-25 días para recolectar la pluma nueva. Otra opción es la obtención de sangre en cantidad suficiente para un cultivo celular. Una vez que se tiene el cultivo, se realizan diversas coloraciones y el ordenamiento de los cromosomas. El procedimiento es complejo debido a los factores inherentes al uso de cultivos celulares. Además, la cariotipificación en aves es un proceso escrupuloso, debido a la presencia de microcromosomas, la ausencia de dimorfismo sexual cromosómico en algunas especies y un rango de 40 a 126 cromosomas, muchos de ellos del mismo tamaño y disposición del centrómero (Miyaki *et al.* 1998; Griffiths y Phil, 2000; Cerit y Avanus, 2007, 2).

La citometría de flujo por su parte, implica el pase de células marcadas con fluorocromos que son excitados por un rayo láser y las señales generadas son detectadas por sensores ópticos. La información obtenida incluye el tamaño, complejidad intracelular y marcadores de membrana de la población celular analizada. Permite también, la cuantificación del contenido de DNA en miles de interfases celulares, dando a conocer el sexo del sujeto sometido al estudio, pues el tamaño del cromosoma Z es superior al W, entonces, en machos se espera un contenido mayor de DNA que en hembras. Pese a ser una técnica rápida y específica, el equipo que requiere no está al alcance de todos los laboratorios y su uso requiere personal entrenado (Cammack *et al.* 2007; Cerit y Avanus, 2007, 2; Matta, 2009).

#### 4. Métodos moleculares para el sexaje de aves

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, es evidente que, las técnicas convencionales, tienen ciertas ventajas bajo diferentes situaciones, pero en su mayoría representan un riesgo para la vida del ave y/o resultados ambiguos. Es por ello, que los estudios más recientes en el sexaje de aves se han orientado al desarrollo de métodos moleculares más eficientes y seguros. Incluso, varios autores han comparado los resultados obtenidos con técnicas moleculares y aquellas derivadas del análisis morfométrico y otras técnicas convencionales, encontrando que el sexaje por técnicas moleculares requiere menos manejo e inversión de tiempo (Jensen y Durrant, 2003; Stevanov *et al.* 2013).

Las herramientas moleculares podemos dividir las en aquellas que utilizan la hibridación del DNA y las que aplican la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Dentro de las técnicas de hibridación encontramos el denominado polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), que se define como el polimorfismo observado en la longitud de los fragmentos obtenidos por el corte con enzimas de restricción. Se basa en la comparación de perfiles de bandas, generados después de su digestión con diversas enzimas de restricción en individuos diferentes. Las bandas se obtienen por hibridación de fragmentos de DNA con secuencias homólogas radiomarcadas y el sexo puede determinarse por una asociación de los cromosomas sexuales con la sonda radiactiva. El problema con ésta técnica es la manipulación del material radiactivo y que difícilmente se podría automatizar (Cerit y Avanus, 2007, 2; Matta, 2009).

Los minisatélites, son regiones no codificantes del genoma de aproximadamente 100 pb que se encuentran organizadas en *tandem*. Generalmente presentan un polimorfismo conocido como número variable de repeticiones en *tandem* (VNTR, por sus siglas en inglés). A partir de estos elementos ha sido posible desarrollar sondas de DNA que identifiquen gran cantidad de minisatélites e hibridar fragmentos de DNA digeridos para su posterior electroforesis, produciendo bandas únicas para cada individuo. Se menciona el uso de fragmentos digeridos con las enzimas *MboI* y *HaeIII* para la identificación del sexo en aves pertenecientes a los géneros *Ara*, *Anodorhynchus*, *Cyanopsitta*, *Aratinga* y *Nandayus*. Los microsátélites, por su parte,

consisten en secuencias cortas de 1 a 4 nucleótidos repetidos entre 10 y 50 veces a lo largo del genoma, rodeados por regiones altamente conservadas. Existen siete marcadores polimórficos de microsátélites enriquecidos con la repetición nucleotídica GATA. Dos de los alelos pueden ser usados para la identificación del sexo en aves. Lo curioso en ésta técnica es que los machos presentan bandas de heterocigotos y las hembras homocigotas. Por otra parte, se han descrito dos marcadores de microsátélite para su uso en halcones (Miyaki *et al.* 1997; Cammack *et al.* 2007; Matta, 2009). Estas metodologías representan un nivel más complejo en su realización y poca capacidad para estandarizarse, pero son importantes ya que dieron pie al descubrimiento de otros marcadores moleculares potencialmente universales, como se verá a continuación.

La *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* fue concebida por Kary Mullis en 1983 y desde entonces revolucionó la aplicación de la Biología molecular. Se trata de un procedimiento rápido y sencillo, basado en la amplificación enzimática *in vitro* de una secuencia específica de DNA. Durante ésta reacción el DNA es desnaturalizado por medio de calor para permitir la hibridación de los iniciadores de interés, que en presencia de la Taq polimerasa (aislada inicialmente a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*) y de dNTP's llevan a cabo la síntesis de una nueva cadena. El primer ciclo está caracterizado por un producto de longitud indeterminada, sin embargo en el segundo ciclo se obtiene un producto de menor tamaño que se acumula de forma exponencial con cada ciclo de amplificación. De modo que, tras 20 a 30 ciclos se tienen millones de *amplicones*, que pueden visualizarse por electroforesis (Quintero *et al.* 2012; Karp, 2013).

Las técnicas PCR para realizar el sexaje de aves monomórficas incluyen la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD), que emplean iniciadores cortos (10 nucleótidos) de secuencia arbitraria y permiten amplificar sin la necesidad de conocer las secuencias blanco, resultando en una metodología simple y de bajo costo. La aplicación de esta técnica ha permitido generar huellas genéticas que facilitan la identificación del sexo en aves de diferentes familias como: *Parus major*, *Haematopus ostrrelagus*, *Jacana spinosa*, *Merops apiaster* y otros. En otro estudio se emplearon 160 iniciadores construidos a partir de RAPD-PCR que permitieron identificar una banda de 902 pb propia de hembras y ausente en machos. Desgraciadamente éstas metodologías tienen baja reproducibilidad debido a las

condiciones de la reacción y la competencia entre el DNA de diferentes fragmentos (Ogawa *et al.* 1997; Matta, 2009).

Los polimorfismos en la longitud del fragmento amplificado (AFLP, por sus siglas en inglés) son una combinación de las técnicas RFLP y PCR; con la ventaja de ser reproducible y analizar gran cantidad de *loci*, detectando polimorfismos en una muestra mínima. Consta de 4 etapas: se somete el DNA a una digestión con dos enzimas de restricción; se incorporan adaptadores específicos a los extremos generados por la digestión; en la tercera fase, una fracción de éstos son amplificados por PCR y finalmente los fragmentos se visualizan en gel de agarosa o poliacrilamida. Se han utilizado para identificar individuos, estimar el análisis de parentesco y determinación del sexo en aves estrutioniformes como la Avestruz (*Struthio camelos*) y en pelecaniformes como el Carmoran moñudo (*Phalacrocorax aristotelis*) (Matta, 2009; Karp, 2013).

Las técnicas moleculares que se han mencionado hasta éste momento, se han utilizado exitosamente para ciertas especies y por medio de éstas se realizaron importantes hallazgos en lo que concierne al sexaje molecular de aves. Sin embargo, no permiten su aplicación en la mayoría de las especies y por ello la búsqueda siguió hasta que, eventualmente se enfocó en una secuencia de DNA que estuviera ligada a los cromosomas sexuales Z y W de las aves, que se conservara entre especies y que por lo tanto fuera una secuencia exónica, que codificara para proteínas con funciones específicas en el organismo. Es así que se comenzó el estudio y uso del genes ligados al sexo.

Se han probado diferentes genes ligados al sexo en aves, Itoh *et al.*, (2001) utilizaron un fragmento de 0.6 kb de *EcoRI* clonado del cromosoma W en pollos e identificaron su contraparte en el cromosoma Z. Eligiendo diferentes combinaciones de iniciadores para el gen EE0.6 y un set de iniciadores para secuencias en común entre los cromosomas Z/W como control interno, lograron sexar 36 especies de 16 órdenes diferentes del grupo *Carinatae* por PCR y utilizando hibridación por Southern blot y ET15 como sonda identificaron dos especies de Ratites, el Emu (*Dromaius novaehollandiae*) y la Avestruz (*S. camelus*).

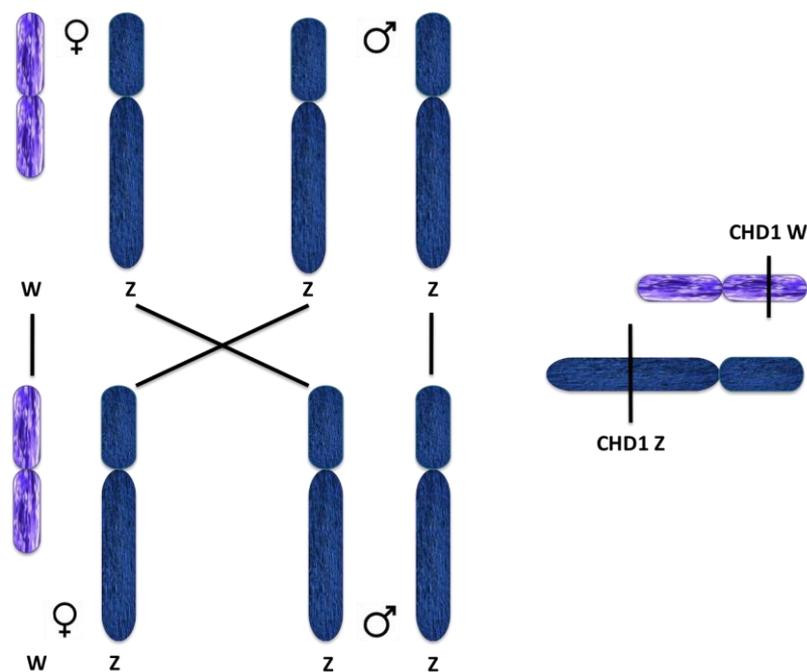
Por otra parte O'Neill *et al.*, (2000) por medio de RT-PCR y clonación del gen ASW (Avian Sex-specific W-linked), lograron identificar el sexo de 17 especies, de nueve

familias diferentes. El gen ASW es un gen codificante, relacionado con la familia de proteínas HIT (Triada de Histidina) y funciona con la mayoría de las especies del superorden Neognathae, no así en los ratites.

#### 4.1. El Gen CHD como marcador molecular para conocer el sexo de las aves

##### 4.1.1 El Gen CHD-1

Se piensa que los cromosomas sexuales evolucionaron de un par de autosomas ancestrales, y tras la falta de recombinación, uno de los cromosomas gradualmente se degradó y perdió la mayoría de sus genes. Sin embargo, ésta pérdida de genes fue parcial, permitiendo la presencia de algunos genes en ambos cromosomas sexuales. En las aves, la hembra es heterogamética, presentando un cromosoma Z y un cromosoma W, mientras que el macho tiene dos copias del cromosoma Z. El cromosoma Z, asemeja al cromosoma Y de los mamíferos en ciertas características como ser pequeño, con pocos genes y en su mayoría compuesto de heterocromatina. El gen CHD1 corresponde a éste pequeño grupo de genes que se encuentran conservados en ambos cromosomas sexuales, en la forma de CHD1Z y CHD1W (Fig. 2) (Fridolfsson y Ellegren, 2000; Cheng *et al.* 2005).



**Figura 2** Esquematación de los cromosomas sexuales de las aves (Z y W) y la localización del gen CHD1 en los mismos, ejemplificado en la especie *Platalea minor* (Espátula menor). Adaptado de Cheng *et al.* (2005).

*El gen CHD1* en aves pertenece a una familia de genes que se componen por un dominio modificador de la cromatina (C, *chromo* o cromodominios), un dominio SNF2 de tipo helicasa/ATPasa (H) y un dominio de unión de DNA (D) y a la proteína que codifica se le ha dado el mismo nombre para denotar estos dominios. Los estudios de su función en los organismos modelo indican que el CHD1 se relaciona con la regulación de la expresión genética. Por ejemplo, se piensa que el cromodominio (C), modifica la estructura y organización de la cromatina durante la transcripción, compactando la cromatina y reprimiendo la expresión. Por otra parte, el dominio helicasa/ATPasa (H) se encuentra asociado a un amplio grupo de proteínas que interactúan con el DNA y RNA. También se considera que el CHD1, presenta características de la familia global de activadores transcripcionales, como el SNF/SWI de la levadura. El dominio D, contiene secuencias cortas, similares a aquellas ligadas con la compactación y organización de la cromatina, como H1 (Histona 1) (Ellegren, 1996; Fridolfsson y Ellegren, 2000).

Debido a las características y localización del gen CHD1 en los cromosomas sexuales, podría pensarse que tuvo algún papel en la diferenciación sexual, sin embargo aún no se conoce si el CHD1Z y el CHD1W se han diferenciado en cuanto a función. Lo que si se sabe, es que el gen CHD1 se encuentra altamente conservado entre las especies, incluso entre mamíferos y aves, para CHDW en el pollo y el ratón el grado de similitud a nivel de nucleótidos y aminoácidos, es de 82.9% y 95.6% respectivamente (Ellegren, 1996; Fridolfsson y Ellegren, 2000; Hori *et al.* 2000; Schroeder *et al.* 2010).

Griffiths *et al.*, (2000) describen como, al realizar la secuenciación del DNA de una banda ligada al sexo, parte del producto de RAPD del Carbonero común (*Parus major*), encontraron una porción que guardaba increíble similitud con una secuencia del gen CHD1 del ratón, ésta secuencia pertenecía a DNA asociado con el cromosoma W de una sola especie, lo siguiente que realizaron fue comprobar que estuviera conservado entre especies, con lo que establecieron que las diferencias eran del 5 % entre aves con parentesco alejado, como las guacamayas y el pollo. Posteriormente descubrieron que el cromosoma Z también presentaba una copia. Finalmente, explotando la capacidad de los intrones para evolucionar rápidamente y por lo tanto sus diferencias entre ambos cromosomas sexuales, diseñaron iniciadores que complementaran partes con exones conservados, flanqueando regiones intrónicas de

diferentes tamaños, de modo que, los productos de amplificación serían dos para hembras y uno para machos, y serían distinguibles en gel de agarosa o poliacrilamida.

#### 4.1.2 Iniciadores que amplifican el gen CHD1 para el sexaje de aves.

Griffiths y Tiwari (1995) en la necesidad de determinar el sexo del último ejemplar en vida libre de la Guacamaya de Spix (*Cyanopsitta spixii*), diseñaron los iniciadores P2 y P3. Los productos de P2 y P3 eran reamplificados con los iniciadores P1 y P2, y posteriormente se realizaba una digestión con la enzima de restricción *Dde I*, para obtener la banda distintiva de las hembras, con un tamaño de 73 pb. (Miyaki *et al.* 1998; Griffiths *et al.* 2000). Bermúdez y Humarán (2002), los utilizaron con éxito para conocer el sexo de las especies *Ara ararauna*, *A. chloropterus*, *A. couloni*, *A. macao* y *A. militaris*. y a partir del amplificado de *A. militaris* realizaron la secuenciación parcial de CHD1 en el género *Ara*.

Más tarde Griffiths (1996) notó que 2 productos de amplificación de P2 y P3 eran distinguibles tras la digestión con *Hae III*, lo que permitió la identificación de 13 especies de aves y a su vez el diseño del primer P8. (Miyaki *et al.* 1998). Desde entonces el set P2 y P8 se ha utilizado exitosamente para el sexaje de diversas especies de aves, con diferencias entre sus productos de 10 a 80 pb. Sin embargo, tiene ciertas limitaciones, pues en algunas especies la diferencia de tamaño entre los intrones amplificados es muy pequeña, dificultando la asignación del sexo. Tal ha sido el caso, en las alcitas (*Aethia spp.* orden Charadriiformes) y algunos psitácidos como, *Amazona aestiva* y *Ara ararauna*. Aunado a ello, la posibilidad de polimorfismos en el gen CHD-Z puede anular la efectividad de P2/P8. Otra desventaja del uso de P2/P8 es que el producto de PCR del alelo del gen CHD-Z es menor que el de W y puede amplificarse de manera preferencial, provocando que las hembras sean confundidas con machos (Vucicevic *et al.*, 2012; Matta, 2009). No obstante, estos iniciadores, han sido utilizados por gran cantidad de autores para identificar el sexo de más de 60 especies de psitácidos, como; *Cyanopsitta spixii* (Miyaki, 1998); *Nymphicus hollandicus* (Cerit y Avanus, 2006); varias especies de los géneros *Ara* y *Amazona* (Gálavez, s/a; Miyaki, 1998; Mongé, 2009; Rusello y Amato, 2001), entre muchas otras.

Se ha postulado que, debido a las diferencias interespecíficas, algunos iniciadores funcionan mejor con determinadas especies. Por lo tanto probar diversos juegos de

iniciadores en varias especies de aves resulta valioso. Jensen *et al.* (2003) compararon la eficacia de dos sets que amplifican para el mismo intrón, el par P2/P8 antes referido y 1237L/1272H descritos previamente por Kahn *et al.* (1998). Entre los resultados reportados, se puede resaltar que los iniciadores 1237L/1272H generaron mayor número de bandas inespecíficas, lo cual explican, pudo ser resultado de la falta de degeneración de los iniciadores y de una mayor variabilidad entre especies, en la secuencia que amplifican. También mencionan que las diferencias entre los productos de Z y W fueron significativamente mayores en aves paseriformes que en cualquier otro orden.

Ellegren (1996), utilizando RFLP y dos PCR alternativos al uso de P2/P8, exploró las posibles diferencias de tamaño entre las dos copias del gen CHD1, utilizando los iniciadores 2917F/3088R. Además diseñó los iniciadores 2945F, cfR y 3224R para amplificar alelos específicos. Realizó diferentes combinaciones de éstos juegos por ejemplo, con 2945F/cfR amplificó un fragmento específico de 210 pb a partir del cromosoma W en hembras, mientras que con 2945F/3224R obtuvo un producto de 630 pb para ambos sexos.

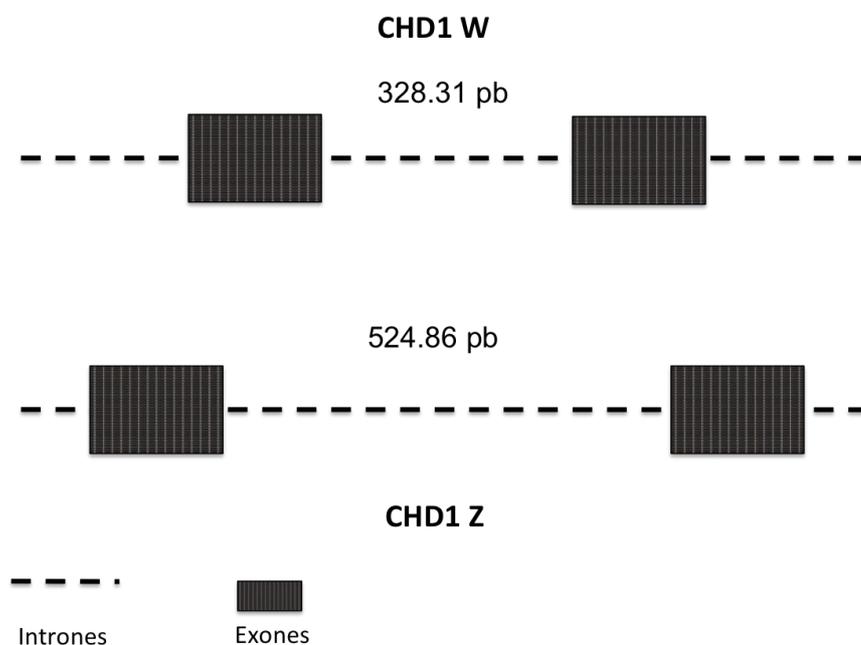
Tras la búsqueda de mejorar la prueba de sexaje, Fridolfsson y Ellegren (1999), propusieron el uso de los iniciadores 2550F/2718R, los cuáles amplifican productos de 400-1,050 pb para el cromosoma Z y otra de 400 a 680 pb en el caso del W, y obtienen diferencias con un rango de 150 a 250 pb entre los productos amplificados (Ong y Vellayan, 2008; Matta, 2009).

Vucicevic *et al.* (2012) lograron sexar 50 especies, incluidas 21 especies de psitácidos, utilizando 6 protocolos diferentes. Uno de sus objetivos fue comparar el set de iniciadores 2550F/2718R y el set P2/P8 y verificar la universalidad del gen CHD1 como marcador para determinar el género en aves. En sus resultados reportaron que la amplificación con P2/P8 resultó en una sola banda para todas las muestras. Mientras que, con 2550F/2718R obtuvieron buenos resultados para la mayoría de las especies, excepto en ratites y algunas especies del orden Anseriforme, Strigiforme y Piciforme.

Los iniciadores CDH1F/CHD1R fueron diseñados por Lee *et al.* (2010) por alineamiento de secuencias con 2250F/2718R (Fridolfsson y Ellegren, 1999). Fueron utilizados para amplificar 144 muestras de 58 especies diferentes, solo una de ellas

del orden Psittaciforme, la cual correspondía a un Loro real amazónico (*Amazona ochrocephala*). El juego CDH1F/CHD1R amplificó productos de CHD-Z de 389.32 pb el más pequeño (presente solo en la especie *Pitta nympha*, del orden passeriforme) hasta 553.72 pb, en el caso CHD-W, el rango fue de 316.00 pb a 497.46 pb. En la figura 3, se ejemplifica como funciona éste juego y el tamaño esperado para la especie *Columba livia*. En su estudio Lee *et al.* (2010), tuvieron un caso excepcional con la especie *Urocissa caerulea*, en la cual obtuvieron un solo producto (con tamaño de 533.83 pb), en lugar de dos bandas, tratándose de una hembra, lo cual se atribuyó a variaciones en los sitios de unión de los iniciadores o a que el DNA se pudo haber encontrado parcialmente degradado.

Los iniciadores CHD1F/CHD1R (figura 3), presentaron mejores resultados que el par P2/P8, así como la ventaja de amplificar productos de menor tamaño que 2250F/2718R, y por lo tanto la posibilidad de trabajar con DNA degradado y electroforesis capilar. Además de exhibir mayor diferencia de tamaño entre las bandas, lo que permite su fácil visualización gel de agarosa. Debido a éstas características, el par CDH1F/CHD1R resulta ideal para probarse en una mayor gama de especies.



**Figura 3** Esquema de las regiones amplificadas del gen CHD1 empleando los iniciadores CHD1F/CHD1R. Se observa que debido a las diferencias intrónicas de cada cromosoma, el producto de CHD1W, es menor que CHD1Z. En este caso se ejemplifica la especie *Columba livia* (Paloma común), mostrando los tamaños obtenidos para cada producto en base a lo publicado por Lee *et al.*, (2010).

## 5. Obtención de DNA a partir de pluma

### 5.1 Antecedentes del uso de pluma como fuente de DNA

Sabemos que prácticamente todas las células del cuerpo son fuentes potenciales de DNA genómico, aunque tejidos como el músculo y la sangre han resultado los más exitosos al compararse con otras muestras. Sin embargo, el músculo sólo puede tomarse durante la necropsia o bajo anestesia general por medio de una biopsia, lo que descarta este tipo de muestra para fines pocos invasivos. Por otra parte, la sangre, requiere personal experimentado en el manejo y toma de muestra, así como la estabilización de las aves tras la toma de muestra (Samour, 2000; Wang *et al.* 2006).

Con la nuevas técnicas de sexaje molecular se abre la posibilidad de tomar muestras de manera más rápida y práctica a partir de plumas, hisopados orales o cloacales e incluso de orina y heces, ya que requieren de una pequeña cantidad de DNA genómico. El uso de heces y orina, pueden confundirse cuando las aves se encuentran en grupos grandes y las células que contienen, suelen ser células epiteliales envejecidas y descamadas del tracto intestinal o urogenital, por lo que pueden contener cantidades de gDNA insuficientes para la determinación del sexo (Nota y Takenaka, 1999; Russello y Amato, 2001; Jensen *et al.* 2003; Ong y Vellayan, 2008).

Por su parte Bello *et al.* (2001), demostró la eficacia de utilizar la pluma como fuente de gDNA. Con DNA aislado de más de 800 aves, de 120 especies diferentes obtuvieron suficiente calidad y cantidad (1-100 µg) para ser visualizado en gel de agarosa y realizar Southern blot, así como para realizar reacciones de PCR para determinación del sexo y pruebas de paternidad.

Wang *et al.* (2006) trabajando con Gallos japoneses, compararon las muestras con convenientes para aplicarse en aves silvestres, cómo las plumas, hisopados orales y sangre y analizaron específicamente qué partes de la pluma son las más ricas en gDNA. En sus resultados demostraron que todos lo especímenes dieron gDNA de buena calidad, aunque, el muestreo de plumas aparentó ser el menos estresante para las aves. Concluyeron que el segmento del raquis y en general la parte más proximal de la pluma, contenían el gDNA de mejor calidad. Ello puede explicarse por la anatomía de la pluma, dónde la parte proximal contiene la médula del folículo con

células de la dermis, y el axis del raquis tiene un remanente de vasos y células dérmicas (Meredith, 2002). En otros estudios para detectar la Leucosis aviar y la Enfermedad de Marek, las puntas de las plumas que contienen un segmento del raquis, han resultado una buena fuente de DNA (Davidson y Borenshtain, 2002; Samour Jaime, 2000). De hecho, se ha sugerido que podría no ser necesario arrancar la pluma del ave para obtener el gDNA, y que en lugar de ello bastaría realizar un corte de la misma, que contenga el axis del raquis. De este modo se reduciría el estrés y el dolor en cada ejemplar que sea muestreado, sin descuidar la calidad de la muestra (Wang *et al.* 2006). Respecto al tipo de muestreo, en cada trabajo se han planteado métodos muy diversos, en el cuadro 1, se resumen los más comúnmente utilizados.

| Autores  | Tipo de muestreo de pluma   | Medio de transporte y/o conservación      |                                   |  |  |
|--|---|---|-----------------------------------|--|--|
|  |   | Recipiente estéril a temperatura ambiente | Recipiente limpio o estéril a 4°C | Tubos eppendorf ó criotubos en nitrógeno líquido | Recipiente con etanol absoluto o al 70% a temperatura ambiente |
| Davidson y Borenshtain, 2002; Moreno López <i>et al.</i> 2011  | Arrancadas: 2 a 7 remeras primarias y/o réctrices (timoneras).                                    | √   | √                                 |  | √  |
| Taberlet y Bouvet, 1991; Cerit y Avanus, 2007; Vucicevic <i>et al.</i> 2012  | Arrancadas: 5 a 6 plumas de contorno.   | √   |                                   | √  | √  |
| Miyaki <i>et al.</i> 1998; Bello <i>et al.</i> 2001; Rusello y Amato, 2001; Jensen <i>et al.</i> 2003; Ong y Subramaniam, 2008 | Arrancadas: 1 a 10 plumas de cualquier región utilizando el raquis o la región terminal de cálamo | √   | √                                 |  | √  |
| Morin <i>et al.</i> 1994; Bayard de Volo <i>et al.</i> 2008; Maurer <i>et al.</i> 2010   | Plumas de muda (secundarias réctrices, alulares, remeras, cobertoras, del contorno general)       | √   | √                                 |  |  |
| Wang <i>et al.</i> 2006; Wang <i>et al.</i> 2007   | Plumas cortadas al ras, dejando el folículo (raquis).   | No se menciona                            | No se menciona                    | No se menciona                                   | No se menciona   |

**Cuadro 1. Métodos de recolección y conservación de plumas para la obtención de DNA empleados por diversos autores.**

En lo que respecta a la calidad del DNA obtenido de plumas, existe una clara diferencia dependiendo del protocolo que se siga y pocos trabajos reportan valores exactos en cuanto a los parámetros de pureza, cuantificación e integridad. Dos casos excepcionales son los estudios de Cerit y Avanus (2006) que midieron el grado de pureza del DNA por espectrofotometría y reportan purezas por arriba de 1.6, sugiriendo que su método de extracción puede ser utilizado incluso para la clonación de genes y RFLP's entre otros análisis más demandantes, y el de Bello et al. (2001), donde la cantidad de DNA obtenido a partir de plumas de diferentes tamaños y especies, fue de 1 a 100 µg y se visualizó de manera íntegra por medio de electroforesis.

Existen autores que han señalado desventajas en la utilización de plumas como fuente de DNA, como la menor cantidad de material genético que se obtiene en comparación con muestras de sangre u otros tejidos, la presencia de inhibidores de la PCR como melanina y keratina, la afectación al vuelo, la muda o incluso la capacidad de atraer una pareja en la época reproductiva (McDonald y Griffith, 2011). En respuesta a dicha polémica, Katzner *et al.* (2012), realizaron una revisión de las ventajas y las desventajas del uso de plumas, y resaltan que las variantes que puede implicar su uso son inherentes a cualquier otro tipo de muestreo, como para el caso de isótopos estables, hormonas del estrés, contaminantes ambientales, etc. También mencionan que conforme avancen las técnicas de laboratorio, las diferencias obtenidas entre el DNA de plumas y otros tejidos, serán mínimas. Finalmente concluyen que, las plumas como fuente de gDNA son lo suficientemente valiosas como para ser ignoradas, que representan una alternativa cuando el muestreo de otros tejidos no es posible y que la metodología seguida debe ser determinada por las características y objetivos específicos de cada investigación.

### *5.2 Métodos de extracción de DNA a partir de plumas*

El uso de kits comerciales para la extracción del DNA a partir de plumas, suponen la obtención de material con buena calidad, sin embargo no siempre se encuentran al alcance de los laboratorios y limitan la experimentación con diferentes variables, que pudieran en determinado momento economizar el proceso de extracción. Algunos autores que los han utilizado con éxito son: Donohue y Dufty, 2006; Constantini, 2008; Lee *et al.* 2010; Santamaría, 2010; Stevanov *et al.* 2012, entre otros.

El método de fenol cloroformo es una extracción líquido-líquido, que separa las moléculas por sus diferentes solubilidades, en dos líquidos inmiscibles (Zumbo, 2006). Éste método, con sus diversas adaptaciones, ha sido exitoso para gran cantidad de estudios moleculares, y representa grandes importantes ventajas como ser económico, sencillo y que proporciona DNA de buena calidad. Sus inconvenientes radican en la manipulación de sustancias agresivas, las posibilidades de contaminación durante el proceso y los tiempos de incubación, que en ciertos casos, pueden ser muy largos, desde 4 horas, hasta 7 días (Taberlet y Bouvet, 1991; Bello *et al.* 2001; Huynen Leon *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007; Monge, 2008; Bayard de Volo *et al.* 2008; Moreno *et al.* 2011; Gálvez, s/a).

Otro método que ha sido utilizado por su capacidad de purificar DNA a partir de muestras contaminadas y/o mínimas, es el método Chelex. Se trata de una resina de propiedades quelantes con fuerte afinidad por el  $Mg^{2+}$ , que fue desarrollada para su uso en estudios forenses, desde la extracción de DNA a partir de semen, cabello, rastros de sangre y todo tipo de muestras altamente contaminadas o muy antiguas. Ahorra una serie de pasos y equipo, como el uso de químicos peligrosos, pasos de precipitación y posible contaminación orgánica, congeladores de ultrabaja temperatura, etc. (Russello y Amato, 2001; Jensen *et al.* 2012; Cattaneo *et al.* 2006; White *et al.* 2012).

El método de ebullición en hidróxido de sodio propuesto por Ong y Vellayan (2008), al ser comparado con el método de Fenol cloroformo y Chelex, pareció proveer de mejores resultados y a un menor costo. Aunque a la fecha, no se ha vuelto a reportar otro trabajo que lo utilice, puede representar una alternativa a los otros métodos.

Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos optan por la extracción con un paso de lisis que puede incluir proteinasa K o con menos frecuencia colagenasa para digerir la mayor parte del cálamo de la pluma (Taberlet y Bouvet, 1991; Morin *et al.* 1994; Bello *et al.* 2001; Davidson y Borenshtain 2002; Wang *et al.* 2007; Monge, 2008; Maurer *et al.* 2010, White *et al.* 2012, etc.).

## Justificación

La técnica de sexaje molecular por medio del gen CHD1, que se encuentra conservado en la mayoría de las aves del superorden *neognathae*, ha sido ampliamente utilizada, y sin embargo no se ha logrado estandarizar, debido principalmente, al uso de diferentes muestras, métodos de obtención de DNA y diversos iniciadores, que amplifican secuencias del mismo gen, pero en regiones diferentes que por lo tanto requieren diferentes condiciones de PCR.

En el presente trabajo se propone una técnica poco invasiva, que utiliza el par de iniciadores CHD1F/CHD1R (Lee et al. 2010), los cuales presentan ciertas ventajas sobre los que se usan de manera convencional.

Los iniciadores empleados, no han sido probados ampliamente en psitácidos, a pesar de ser un grupo de gran importancia, y en la mayoría de las especies incluidas en este estudio donde además no se ha realizado la secuenciación de su genoma, por lo que de funcionar, éste juego de iniciadores, podría representar una herramienta para secuenciar las regiones que amplifica.

Aunado a lo anterior, la estandarización de la técnica, pone al alcance de los criaderos de aves exóticas y de ornato, una herramienta rápida, sencilla y segura para conocer el sexo de las aves, lo cual favorecerá sus programas de reproducción y promoverá el uso de aves criadas en cautiverio, en lugar de su extracción ilegal del medio silvestre. Además de que, se podrá fomentar la compra responsable de dichos ejemplares.

### **Objetivo general**

- ◆ Aplicar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) dirigida a la amplificación del gen CHD para el sexaje de aves del Orden Psittaciforme ubicadas en una tienda de mascotas.

### **Objetivos particulares**

- ◆ Estandarización del método de extracción de DNA a partir de plumas.
- ◆ Evaluación de la utilidad de diferentes tipos de plumas y sus métodos de conservación, para la obtención de DNA con un buen grado de pureza e integridad.
- ◆ Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación del gen CHD1, empleando los iniciadores CHD1F/CHD1R.
- ◆ Empleo de la PCR para el sexaje de los miembros de la familia Psittaciforme incluidos en éste estudio.

### **Hipótesis**

Los iniciadores CHD1F/CHD1R pueden amplificar fragmentos del gen CHD1 permitiendo la identificación del sexo de las aves Psittaciformes ubicadas en una tienda de mascotas.

## **Material y métodos**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, de la FES Cuautitlán, UNAM (Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 2.5, Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México).

### *1. Animales de experimentación*

Se trabajó/utilizó un grupo de 20 individuos de los géneros *Ara*, *Cacatua*, *Nymphicus*, *Psittacus*, *Psittacula*, *Platycercus*, *Myiopsitta* y *Pyrrhura* (Cuadro 2 y 3), localizados en una tienda de mascotas de la Ciudad de México. Los ejemplares se encontraron durante el desarrollo del trabajo bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación y medicina preventiva. Los criterios de selección fueron los siguientes: especies comúnmente comercializadas como aves de compañía, de cualquier edad y clínicamente sanos. Los individuos del género *Cacatua*, funcionaron como controles de la prueba, por su dimorfismo sexual en el color del iris.

El manejo se realizó por parte de los encargados de las especies de la tienda durante la tarde. En el caso de las guacamayas (Géneros *Ara*) y cacatúas (Géneros *Cacatua*), los encargados realizaron primero la captura con la técnica de la toalla. Para las especies medianas y pequeñas procedieron al manejo físico utilizando la técnica de tres puntos.

| Nombre científico          | Nombre común                      | No. anillo | Sexo conocido <sup>a</sup> | Subfamilia                  | Apéndice CITES <sup>c</sup> | Clasificación IUCN <sup>d</sup> |
|----------------------------|-----------------------------------|------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>Ara ararauna</i>        | Guacamaya azul dorado             | 1          | No                         | Arinae                      | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Ara ararauna</i>        | Guacamaya azul dorado             | 2          | No                         | Arinae                      | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Ara chloropterus</i>    | Guacamaya aliverde                | s/a        | No                         | Arinae                      | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Ara severa</i>          | Guacamaya severa                  | COS 3392   | No                         | Arinae                      | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Pyrrhura molinae</i>    | Cotorra de molina                 | COS 1100   | No                         | Arinae                      | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Pyrrhura molinae</i>    | Cotorra de molina                 | COS 1110   | No                         | Arinae                      | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Myiopsitta monachus</i> | Cotorra monje, Cotorra de Uruguay | PMC 343    | No                         | Incertae sedis <sup>b</sup> | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Myiopsitta monachus</i> | Cotorra monje, Cotorra de Uruguay | PMC 350    | No                         | Incertae sedis <sup>b</sup> | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Psittacus erithacus</i> | Loro gris africano                | MARY C964  | No                         | Psittacinae                 | II                          | Vulnerable                      |
| <i>Platycercus eximius</i> | Rosella común                     | PMC 304    | No                         | Platycercinae               | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Psittacula krameri</i>  | Perico de collar                  | s/a        | Hembra <sup>a</sup>        | Psittaculinae               | No incluida                 | Preocupación menor              |
| <i>Psittacula krameri</i>  | Perico de collar                  | COTE 219 A | Macho <sup>a</sup>         | Psittaculinae               | No incluida                 | Preocupación menor              |

**Cuadro 2. Animales de experimentación: Familia Psittacidae**<sup>a</sup> Ejemplares en los que sus características morfológicas permitieron la asignación de sexo; <sup>b</sup> El término del latín *Incertae sedis* se utiliza para definir un taxón que no se ha podido identificar con certeza, que sus relaciones cercanas son desconocidas o indefinidas; <sup>c</sup> Los apéndices de CITES (Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres) son listas de especies que ofrecen diferentes niveles y tipos de protección ante el comercio; <sup>d</sup> La IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), provee y clasifica la información taxonómica, el estatus de conservación y la distribución de las especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo; s/a: Ejemplares que no presentan anillo como método de identificación.

| Nombre científico             | Nombre común             | No. anillo | Sexo conocido <sup>a</sup> | Subfamilia                                     | Apéndice CITES <sup>c</sup> | Clasificación IUCN <sup>d</sup> |
|-------------------------------|--------------------------|------------|----------------------------|--|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>Cacatua alba</i>           | Cacatúa blanca           | 1          | macho <sup>a</sup>         | <i>Cacatuinae</i>                              | II                          | Amenazado vulnerable            |
| <i>Cacatua alba</i>           | Cacatúa blanca           | PALMAS 738 | macho <sup>a</sup>         | <i>Cacatuinae</i>                              | II                          | Amenazado vulnerable            |
| <i>Cacatua alba</i>           | Cacatúa blanca           | FEM 428    | macho <sup>a</sup>         | <i>Cacatuinae</i>                              | II                          | Amenazado vulnerable            |
| <i>Cacatua galerita</i>       | Cacatúa de moño amarillo | PALMAS 966 | macho <sup>a</sup>         | <i>Cacatuinae</i>                              | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Cacatua galerita</i>       | Cacatúa de moño amarillo | PALMAS 719 | macho <sup>a</sup>         | <i>Cacatuinae</i>                              | II                          | Preocupación menor              |
| <i>Cacatua haematuropygia</i> | Cacatúa filipina         | AVIX 674   | macho <sup>a</sup>         | <i>Cacatuinae</i><br><i>Subgénero Licmetis</i> | I                           | Críticamente amenazada          |
| <i>Nymphicus holldicus</i>    | Cacatúa ninfa            | 241        | hembra <sup>a</sup>        | <i>Nymphicinae</i>                             | No incluida                 | Preocupación menor              |
| <i>Nymphicus holldicus</i>    | Cacatúa ninfa            | 325        | hembra <sup>a</sup>        | <i>Nymphicinae</i>                             | No incluida                 | Preocupación menor              |

**Cuadro 3. Animales de experimentación: Familia Cacatuidae** <sup>a</sup> Ejemplares en los que sus características morfológicas permitieron la asignación de sexo; <sup>b</sup> El término del latín *Incertae sedis* se utiliza para definir un taxón que no se ha podido identificar con certeza, que sus relaciones cercanas son desconocidas o indefinidas; <sup>c</sup> Los apéndices de CITES (Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres) son listas de especies que ofrecen diferentes niveles y tipos de protección ante el comercio; <sup>d</sup> La IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), provee y clasifica la información taxonómica, el estatus de conservación y la distribución de las especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo; s/a: Ejemplares que no presentan anillo como método de identificación.

## 2. Toma de muestra

### 2.1 Recolección de las plumas

La recolección de las muestras también fue realizada por el personal de la tienda, bajo las indicaciones del presente trabajo. Se solicitaron inicialmente de 2 a 4 plumas de la región torácica (del contorno general), 1 a 2 plumas remeras secundarias y 1 a 2 plumas timoneras, de individuos elegidos al azar, con el objetivo de determinar el tipo de pluma más adecuado para la prueba de sexaje, para ello se utilizó el método de extracción fenol cloroformo modificado y se compararon sus características en cuanto a cantidad, grado de pureza e integridad de DNA.

Se determinó que las plumas de contorno de la región torácica eran las más adecuadas para el presente trabajo, por lo que se utilizaron para el resto del grupo. Todas las muestras fueron tomadas de una sola intención con ayuda de fórceps estériles y cuidando no tocar la punta del cálamo.

### 2.2 Selección del método de conservación

Para definir el método de conservación más adecuado para las plumas, una porción de las muestras se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml vacío y el resto en un tubo Falcon de 15 ml con etanol al 70% ambas que se almacenaron a temperatura ambiente y partir de ese momento, fueron procesadas del mismo modo.

## 3. Extracción DNA

### 3.1 Método de fenol cloroformo

Para la purificación del DNA se siguió el procedimiento descrito por Bello *et al.* (2001) con algunas modificaciones (cuadro 4). Se realizó un pre-tratamiento de las muestras que involucra 2 lavados con dH<sub>2</sub>O. Posteriormente, utilizando fórceps, bisturí y navaja estéril, se cortan 3-5 pedazos de 0.2-0.5 cm de la base del cálamo y se colocan en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, al cual se le agregan 500 µl de Buffer de Lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 2 mM EDTA, pH 8; 10 mM NaCl; 1% SDS; 20 µl DTT 1 M), con 20 µl de proteinasa K (5mg/ml). La lisis de las muestras se realiza durante 4 horas a 37°C en agitación continua. El paso siguiente es la extracción con fenol cloroformo para lo cual se agrega 1 volumen (500 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1 Sigma<sup>®</sup>) que se mezcla con la muestra por inversión gentil durante 10 segundos y posteriormente se centrifuga a 12,000 rpm durante 2

minutos. La fase acuosa es recuperada por medio de pipeteo, evitando tomar la interfase. El material se coloca en un tubo limpio y se adicionan 1/10 de NaCl más 2.5 volúmenes de etanol al 95%. Se deja precipitar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras son centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se decanta el etanol al 95%. Después se realiza un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se vuelven a centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El etanol al 70% se desecha por decantación y el resto se deja evaporar a temperatura ambiente. La pastilla de DNA ubicada al fondo del tubo Eppendorf, se resuspende en 1X TE (Tris 10 mM EDTA 1 mM, pH 7.4), con un volumen correspondiente a su tamaño y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

| Variante                          | Condiciones originales  | Condiciones modificadas   |
|-----------------------------------|---|---|
| Método de conservación            | 2 semanas a temperatura ambiente o hasta 1 mes a $4^{\circ}\text{C}$  | En tubo falcon con EtOH al 70% a temperatura ambiente, en lugar oscuro: 1 semana para plumas chicas y hasta 2 meses para plumas grandes.                          |
| Preparación de la muestra         | Cortar la sección del cálamo y colocar en tubo eppendorf de 1.5 ml  | Realizar dos lavados con agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) a la punta del cálamo, realizar los cortes y colocar en tubo eppendorf de 1.5 ml.               |
| Buffer de lisis                   | 50 mM Tris-HCl, pH 8<br>20 mM EDTA, pH 8<br>2% SDS<br><br>Proteinasa K 175 $\mu\text{g}/\text{ml}$  | 10 mM Tris-HCl, pH 7.4<br>2 mM EDTA, pH 8<br>1% SDS<br>+<br>10 mM NaCl<br>20 $\mu\text{l}$ DTT 1M<br>Proteinasa K 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$                     |
| Tiempo de digestión de la muestra | Plumas grandes y con tejido como sangre: $37^{\circ}\text{C}$ toda la noche en agitación gentil<br><br>Plumas chicas: $56^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas sin agitación. | Plumas grandes y chicas: $37^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas en agitación continua<br><br>Plumas con tejido (sangre): No son necesarias las 4 horas de digestión |
| Temperatura durante la extracción | No se especifica  | Cadena fría<br><br>Centrífuga a $4^{\circ}\text{C}$   |

**Cuadro 4. Modificaciones realizadas al método de Bello *et al.* 2001**

### *3.2 Método de extracción Chelex*

Para realizar la extracción de DNA de aquellas muestras en las que los resultados con el método de fenol cloroformo no fueron favorables, se recurrió a la metodología descrita por White *et al.* (2012), la cual consiste en cortar 2 a 3 puntas del cálamo, colocarlas en un tubo eppendorf de 1.5 ml, agregarles 250  $\mu$ l de Chelex (6% Chelex InstaGene<sup>TM</sup> Matrix, Bio-Rad), con 0.01 mg de proteinasa K (5 mg/ml) y mezclar con vortex durante 5 segundos. Las muestras, se incuban a 56°C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo se mezclan nuevamente con vortex y se incuban a 95°C por 15 minutos. Se remueven los tubos del calor, se vuelven a mezclar y se centrifugan a 14,000 rpm durante 10 minutos para sedimentar el Chelex. El sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se almacena a -20°C.

### *3.3 Cuantificación y análisis de pureza e integridad del DNA obtenido*

Para la cuantificación ( $\mu$ g/ml) y medición del grado de pureza del DNA por medio de espectrofotometría se realizó una dilución 1:50, esto es colocar 4  $\mu$ l de la muestra en 196  $\mu$ l de TE y se leyó la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda.

Con la finalidad de evaluar la integridad del DNA se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, y se deja correr a 90 volts durante una hora en buffer TBE 1X (TBE sol. madre 5X: Tris base 54 g, ácido bórico 27.5 g, EDTA dihidratada 3.72 g, agua destilada cbp 1000 ml). Transcurrido el tiempo, el gel se sumerge en una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante 30 minutos, se enjuaga con agua corriente y se coloca en el transiluminador UV (Wise UV<sup>®</sup>, Wisd. WUV-L50) para realizar el registro fotográfico.

#### *4. Amplificación del gen CHD 1 por PCR*

Para llevar a cabo la reacción de PCR se emplea un volumen de 25 µl para lo cual en un tubo eppendorf de 0.2 ml se colocan: Buffer de PCR 1X, dNTP's 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, iniciadores CHD1F/CHD1R 0.5 µM de cada uno, DNA 2.5 µl, Taq polimerasa 1.5 U/µl y 16.45 µl de agua grado inyectable. Se programa el termociclador (Techgene TC-3000), con un perfil térmico que consta de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C, 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos, alineamiento de 48°C, 30 segundos y extensión a 72°C, 1 minuto, con un ciclo final de elongación de 72°C de 5 minutos. Los productos del PCR se mantienen a -20°C. <sup>1</sup>

#### *5. Análisis de resultados*

Los resultados de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio y posteriormente se visualizó en el transiluminador UV (Wise UV<sup>®</sup>, Wisd. WUV-L50) llevando a cabo el registro fotográfico. Se caracterizan como machos aquellos con productos de una sola banda con un tamaño aproximado de 517 pb, que corresponda a CHD1Z y como hembras a los productos de amplificación con una banda de CHD1Z (517 pb) y una banda CHD1W de 316.00 pb a 497.46 pb.

---

<sup>1</sup> Se partió de las condiciones de amplificación estandarizadas previamente en el laboratorio, para tejidos de gallina y paloma, modificando el número de ciclos de 28 a 35.

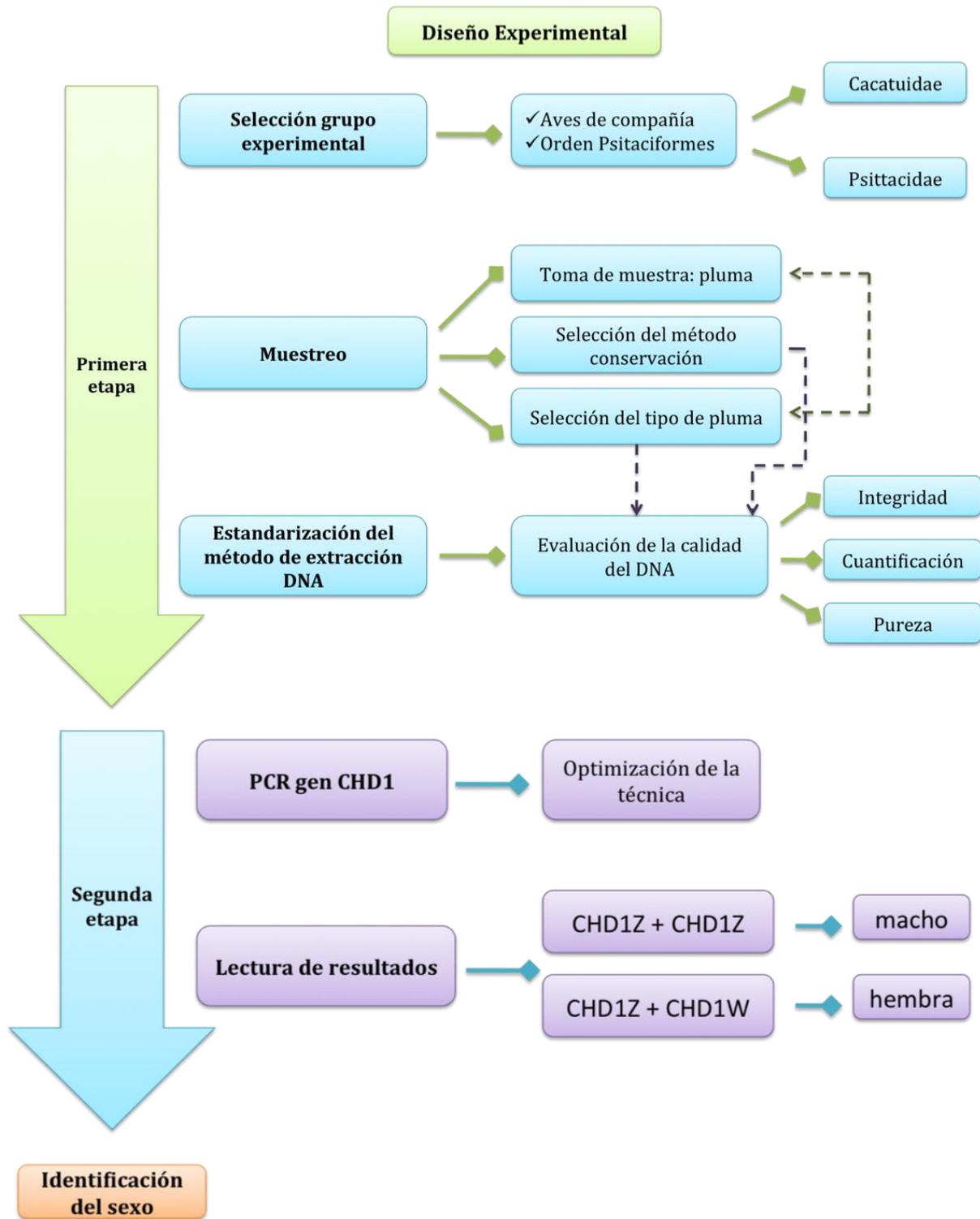


Figura 4. Diseño experimental. Se muestra un diagrama de flujo de los pasos que se llevaron a cabo para lograr los objetivos del presente trabajo.

## Resultados

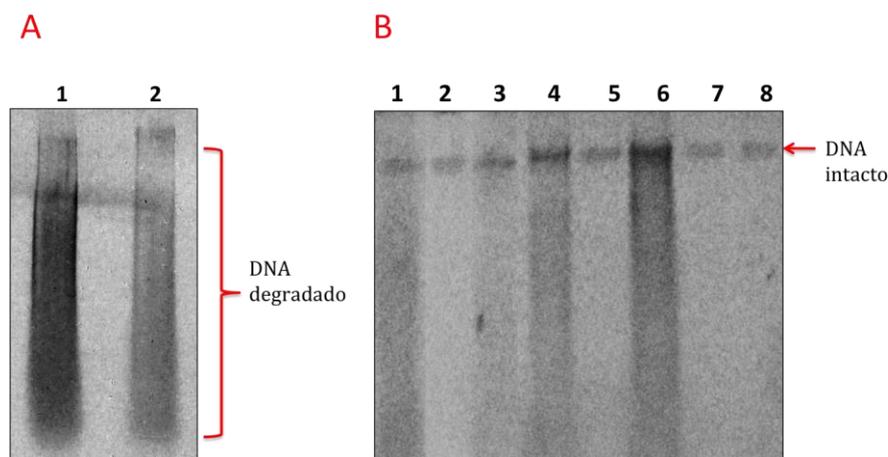
En el presente trabajo se empleó exitosamente la pluma como muestra para la obtención de DNA, resultando un método seguro para las aves, ya que volvieron a su comportamiento normal pocos segundos después de liberarlas y en los días subsecuentes a la toma de muestra, no se nos reportaron signos de alguna alteración, como falta o disminución del apetito, heridas o comportamientos anormales.

Para estandarizar la extracción de DNA a partir de pluma se partió de la técnica reportada por Bello *et al.* (2001) a la cual se le realizaron las modificaciones antes mencionadas y con la cual se pudo obtener DNA de buena calidad para la mayoría de las muestras, como se verá más adelante.

Los resultados de los dos métodos de conservación, muestran diferencias entre ambos, tal y como se muestra en la tabla 1; las plumas conservadas en etanol al 70% presentaron mayor grado de pureza mientras que, aquellas muestras mantenidas a temperatura ambiente, fueron superiores en la cantidad de DNA obtenido. Sin embargo, la principal diferencia observada fue en la integridad del DNA, ya que al realizar las electroforesis en aquellas que provenían de las muestras conservadas a temperatura ambiente no se visualizó la banda de alto peso molecular que caracteriza al DNA intacto (figura 5). Por lo que se consideró que el etanol al 70% fue un método más confiable y que, además, prolonga el tiempo de almacenamiento de las plumas grandes hasta por dos meses y es un reactivo barato y fácil de preparar.

| Nombre científico             | Número de anillo | Muestras conservadas con EtOH 70% |        | Muestras conservadas a temperatura ambiente en tubo eppendorf 1.5 ml |        |
|-------------------------------|------------------|-----------------------------------|--------|--|--------|
|                               |                  | Cuantificación                    | Pureza | Cuantificación   | Pureza |
| <i>Cacatua alba</i>           | 1                | 2 µg/ml                           | 1.26   | 9 µg/ml  | 1.12   |
| <i>Cacatua haematuropygia</i> | AVIX 674         | 2 µg/ml                           | 1.13   | 2 µg/ml  | 1.05   |
| <i>Psittacus erithacus</i>    | COS 3394         | 1 µg/ml                           | 1.08   | 3 µg/ml  | 1.09   |
| <i>Psittacula krameri</i>     | s/a              | 1 µg/ml                           | 1.25   | 3 µg/ml  | 1.07   |
| <i>Psittacula krameri</i>     | COTE 219         | 4 µg/ml                           | 1.20   | 13 µg/ml   | 1.27   |
| <i>Platycercus eximius</i>    | PMC 304          | 1 mg/ml                           | 1.07   | 1 µg/ml  | 0.94   |
| <i>Pyrrhura molinae</i>       | COS 1100         | 1 µg/ml                           | 1.32   | 3 µg/ml  | 1.05   |
| <i>Pyrrhura molinae</i>       | COS 1110         | 1 µg/ml                           | 1.32   | 2 µg/ml  | 1.02   |

**Tabla 1. Resultados de la espectrofotetría para cuantificación y grado de pureza del DNA obtenido a partir de plumas conservadas en etanol al 70% y a temperatura ambiente. s/a:** ejemplares que no presentaban anillo.

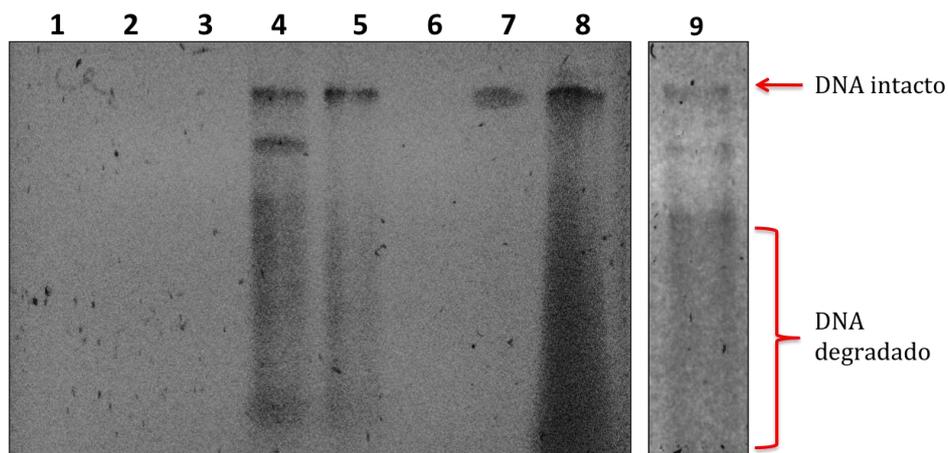


**Figura 5** Evaluación de la integridad del DNA empleando dos métodos de conservación de las plumas. A. Muestras conservadas a temperatura ambiente. Carril 1: *Cacatua alba* 1; Carril 2: *Pyrrhura molinae* COS 1100. B. Muestras conservadas en etanol al 70%. Carril 1: *Ara ararauna* 1; Carril 2: *Ara severa* Carril 3: *Cacatua alba* 738; Carril 4: *C. alba* 1; Carril 5: *C. alba* 428; Carril 6: *Platycercus eximius*; Carril 7: *Cacatua haematuropygia*; Carril 8: *Ara ararauna* 2. Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

En cuanto a la evaluación del tipo de pluma, los resultados obtenidos demuestran que de los tres tipos se obtiene suficiente cantidad de DNA (1µg/ml a 13 µg/ml). Sin embargo, se consiguió mejor grado de pureza con las plumas de contorno de la región torácica, con valores por arriba de 1.00 en todos los casos, mientras que con las plumas remeras y timoneras los valores fueron más bajos (tabla 2). Respecto a la integridad observamos que es muy buena en las remeras y las de contorno, a pesar de que no en todas las muestras fue posible la observación a nivel del gel (Figura 6).

|                       | Tipo de pluma |       |       |         |       |       |                             |       |       |
|-----------------------|---------------|-------|-------|---------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|
|                       | Timoneras     |       |       | Remeras |       |       | Contorno de región torácica |       |       |
|                       | 1             | 2     | 3     | 4       | 5     | 6     | 7                           | 8     | 9     |
| Cuantificación de DNA | 6             | 2     | 3     | 4       | 1     | 7     | 13                          | 2     | 2     |
|                       | µg/ml         | µg/ml | µg/ml | µg/ml   | µg/ml | µg/ml | µg/ml                       | µg/ml | µg/ml |
| Pureza                | 0.97          | 0.98  | 0.98  | 0.96    | 0.99  | 0.95  | 1.39                        | 1.38  | 1.15  |

**Tabla 2. Cuantificación y grado de pureza del DNA obtenido a partir de tres diferentes tipos de pluma, empleando el método de fenol cloroformo.**

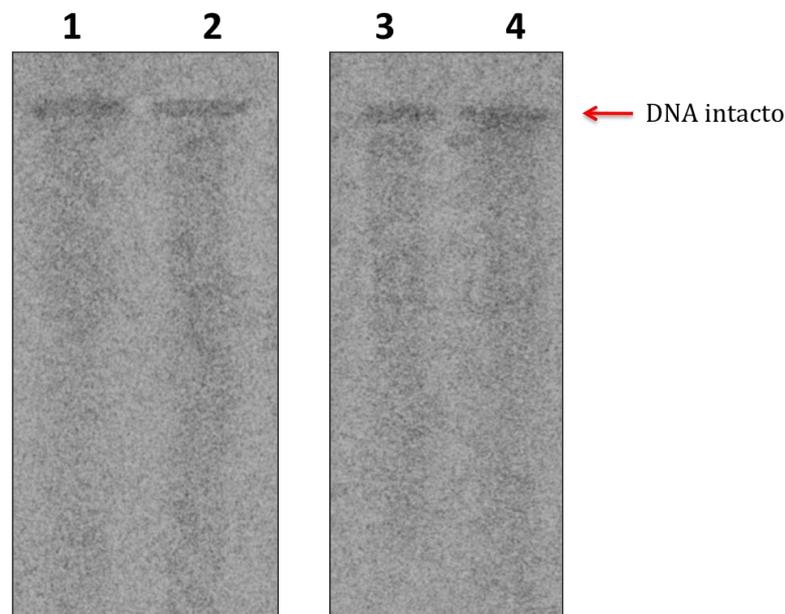


**Figura 6** Evaluación de la integridad del DNA obtenido a partir de diferentes tipos de plumas. Carriles 1-3: Plumás timoneras, que no se visualizan en el gel; Carriles 4-6: Plumás remeras; Carriles 7-9: Plumás de contorno de la región torácica. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Por lo anterior, se definió que las plumas remeras y de contorno de la región torácica son las más adecuadas. Aunque se optó por emplear las plumas de contorno, debido a sus características morfológicas.

Como se mencionó en el presente trabajo, se emplearon dos métodos de extracción de DNA, el método de fenol cloroformo, modificado a partir de lo propuesto por Bello *et al.*, (2001) y el método Chelex siguiendo las condiciones de White *et al.*, (2012). En las tablas 3 y 4 se muestran los valores de cuantificación y grado de pureza obtenidos por ambos métodos. Los ejemplares en los que no se realizó la extracción por el método Chelex, se encuentran marcados con *n/a* (no aplica). Con el método Chelex, se observó mayor grado de pureza y cantidad de DNA, incluso en plumas pequeñas y de individuos en los que con el método fenol cloroformo no se había logrado.

A continuación, en la figura 7, se observan muestras de DNA con buena integridad, obtenidas por el método de Chelex, las cuáles fueron una excepción, ya que el resto de las muestras procesadas por éste método no fueron visualizadas en el gel de agarosa.



**Figura 7** Evaluación de la integridad del DNA empleando el método Chelex. Carril 1: *Pyrrhura molinae* 1100; Carril 2: *P. molinae* 1110; Carril 3: *N. hollandicus* 325; Carril 4: *Psittacus erithacus* 964. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

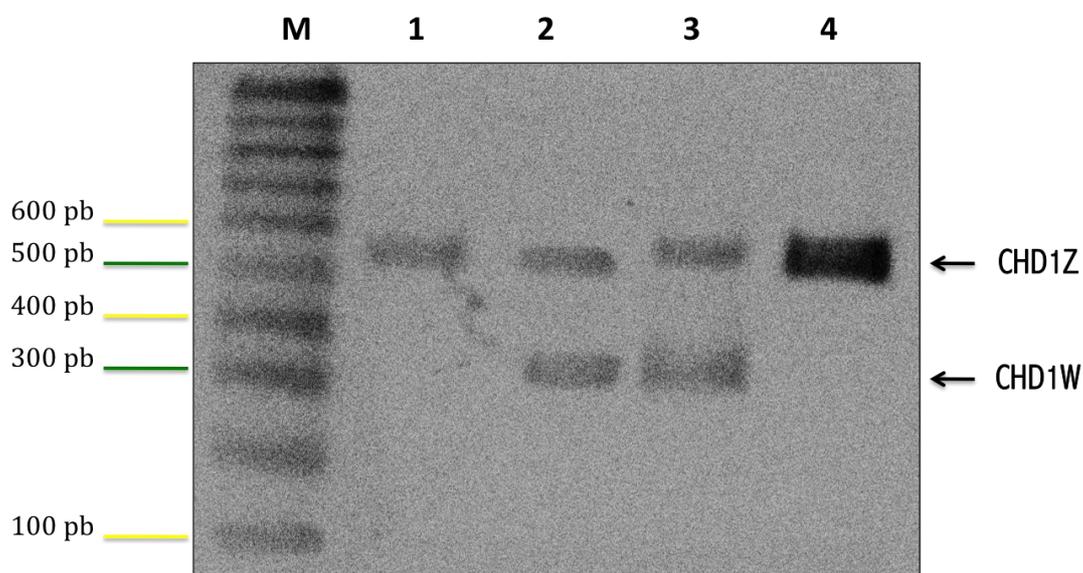
| Nombre científico          | No. anillo | Cuantificación<br>DNA<br>(fenol cloroformo) | Grado de Pureza<br>(fenol cloroformo) | Cuantificación<br>DNA<br>(Chelex) | Grado de Pureza<br>(Chelex) |
|----------------------------|------------|---|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Ara arauna</i>          | s/a        | 1 µg/ml                                     | 1.19                                  | 2 µg/ml                           | 1.35                        |
| <i>Ara ararauna</i>        | s/a        | 6 µg/ml                                     | 1.23                                  | 4 µg/ml                           | 1.28                        |
| <i>Ara chloropterus</i>    | s/a        | 3 µg/ml                                     | 1.21                                  | 2 µg/ml                           | 2.00                        |
| <i>Ara severa</i>          | COS 3392   | 1 µg/ml                                     | 1.13                                  | 1 µg/ml                           | 1.50                        |
| <i>Pyrrhura molinae</i>    | COS 1100   | 1 µg/ml                                     | 1.25                                  | 3 µg/ml                           | 1.64                        |
| <i>Pyrrhura molinae</i>    | COS 1110   | 1 µg/ml                                     | 1.32                                  | 2 µg/ml                           | 1.09                        |
| <i>Myiopsitta monachus</i> | PMC 343    | 2 µg/ml                                     | 1.14                                  | n/a                               | n/a                         |
| <i>Myiopsitta monachus</i> | PMC 350    | 1 µg/ml                                     | 1.24                                  | 7µg/ml                            | 2.00                        |
| <i>Psittacus erithacus</i> | MARY C964  | 2 µg/ml                                     | 1.35                                  | 1 µg/ml                           | 1.25                        |
| <i>Platycercus eximius</i> | PMC 304    | 1 mg/ml                                     | 1.07                                  | n/a                               | n/a                         |
| <i>Psittacula krameri</i>  | s/a        | 1 µg/ml (A)                                 | -0.54                                 | 3 µg/ml                           | 2.03                        |
| <i>Psittacula krameri</i>  | COTE 219 A | 4 µg/ml (A)                                 | 1.20                                  | 2 µg/ml                           | 1.49                        |

**Tabla 3. Resultados de la cuantificación y grado pureza del DNA obtenido a partir de los dos métodos de extracción utilizados en el presente trabajo en la familia Psittacidae.** s/a: Ejemplares que no presentan anillo como método de identificación.; n/a: No aplica, ejemplares en los que no se realizó la extracción de DNA por el método de Chelex.

| Nombre científico             | No. anillo | Cuantificación DNA (fenol cloroformo) | Grado de Pureza (fenol cloroformo) | Cuantificación DNA (Chelex) | Grado de Pureza (Chelex) |
|-------------------------------|------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Cacatua alba</i>           | 1          | 2 µg/ml                               | 1.26                               | n/a                         | n/a                      |
| <i>Cacatua alba</i>           | PALMAS 738 | 10 µg/ml                              | 1.28                               | 7 µg/ml                     | 1.56                     |
| <i>Cacatua alba</i>           | FEM 428    | 5 µg/ml                               | 1.31                               | n/a                         | n/a                      |
| <i>Cacatua galerita</i>       | PALMAS 966 | 2 µg/ml                               | 1.20                               | 1 µg/ml                     | 1.30                     |
| <i>Cacatua galerita</i>       | PALMAS 719 | 2 µg/ml                               | 1.37                               | n/a                         | n/a                      |
| <i>Cacatua haematuropygia</i> | AVIX 674   | 2 µg/ml                               | 1.13                               | 3 µg/ml                     | 1.47                     |
| <i>Nymphicus holIndicus</i>   | 241        | 1 µg/ml                               | 1.18                               | 2 µg/ml                     | 1.42                     |
| <i>Nymphicus holIndicus</i>   | 325        | 2 µg/ml                               | 1.27                               | 2 µg/ml                     | 1.58                     |

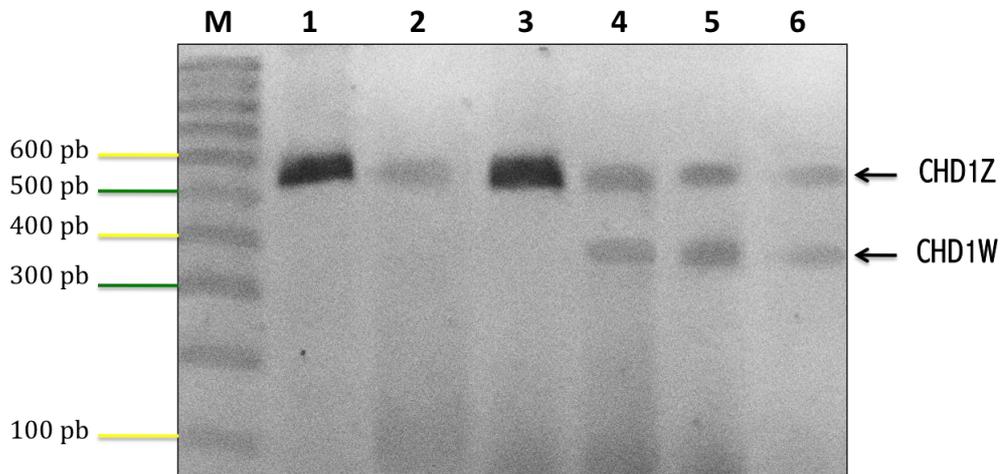
**Tabla 4. Resultados de la cuantificación y grado pureza del DNA obtenido a partir de los dos métodos de extracción utilizados en el presente trabajo en la familia *Cacatuidae*** n/a: No aplica, ejemplares en los que no se realizó la extracción de DNA por el método de Chelex.

Utilizando los iniciadores CHD1F y CHD1R, y las condiciones mencionadas anteriormente, se realizó con éxito el sexaje de 14 de los 20 ejemplares con los que se trabajó. Las figuras 8 a la 10 muestran los productos de amplificación que permitieron llevar a cabo el sexaje de las diferentes especies y familias con las que se trabajó. La figura 8, además incluye los controles de la reacción, uno de hembra y uno de macho, ambos obtenidos a partir de muestras de sangre de palomas (*Columba livia*) que, como se mencionó ya habían sido previamente caracterizados y en los cuales se encuentran señaladas las bandas CHD1Z y CHD1W y se aprecia como en el caso de hembras ambas están presentes y en machos únicamente CHD1Z.



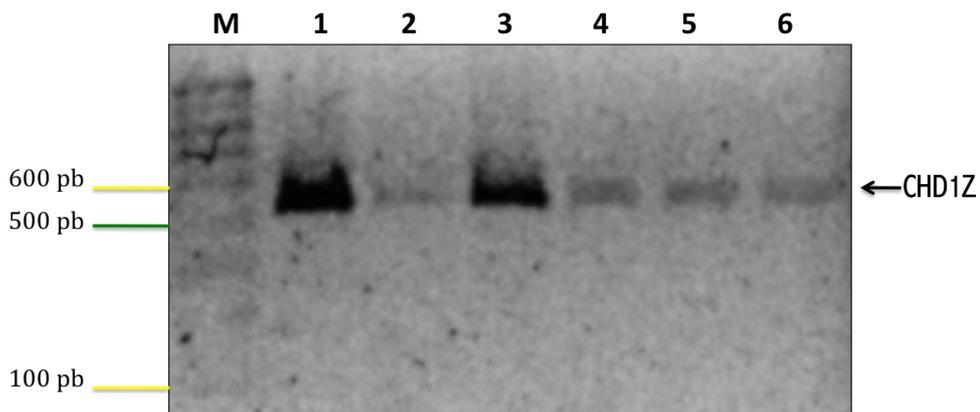
**Figura 8** Productos de amplificación del gen CHD1 correspondientes a la familia Psittacidae y controles de la especie *Columba livia*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 1: macho de la especie *P. eximius*, con una banda Z de aproximadamente 560 pb; Carril 2: hembra de la especie *P. erithacus*, con una banda Z de 530 pb aprox. y una banda W de 350 pb aprox.; Carriles 3 y 4: Control positivo hembra y macho respectivamente, obtenidos a partir de sangre de paloma (*Columba livia*), en los cuales la banda CHD1Z es de 530 pb aprox. y la banda CHD1W de 330 pb aprox. Gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.7

En la figura 9 se muestra el sexaje de los miembros de la familia Psittacidae (excepto *P. eximius* y *P. erithacus* que se encuentran en la figura anterior).



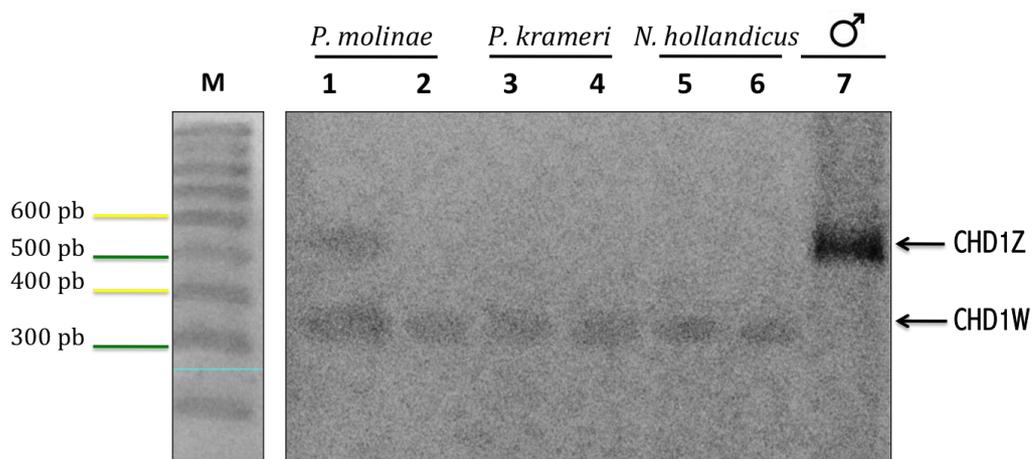
**Figura 9** Productos de amplificación del gen CHD1 correspondientes a la familia Psittacidae. M: Marcador 100 pb; Carril 1: macho, *Ara ararauna* 1; Carril 2: macho, *Ara ararauna* 2; Carril 3: macho, *Ara chloropterus*; Carril 4: hembra, *Ara severa* 3392; Carril 5: hembra *P. molinae* 1100; Carril 6: hembra, *P. molinae* 1110. Gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.

El sexaje obtenido por medio de la amplificación del gen CHD1 de la familia Cacatuidae, representado en la figura 10, concuerda con el sexo asignado previamente basado en el color del iris, y en ambos casos los individuos de este grupo son identificados como machos. La especie *N. hollandicus* se analizó por separado, debido a que su sexaje representó ciertas dificultades, como se muestra más adelante.



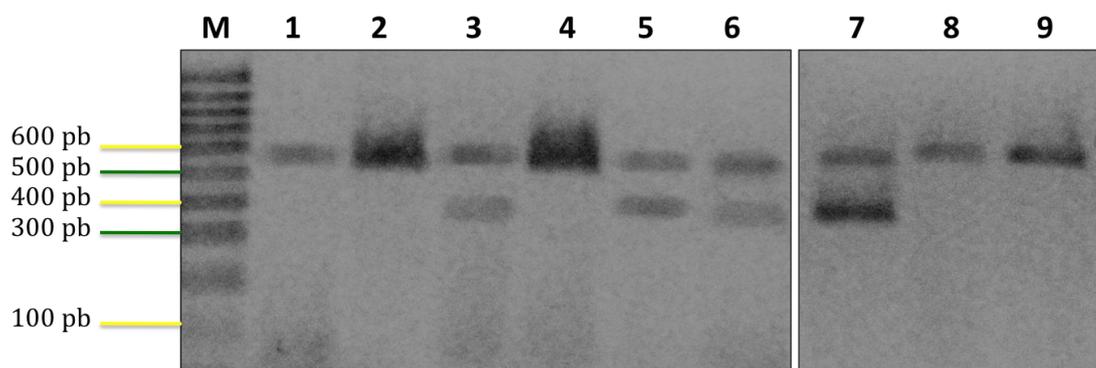
**Figura 10** Productos de amplificación del gen CHD1 correspondientes a la familia Cacatuidae (excepto *N. hollandicus*). M: marcador de peso molecular de 100 pb; Carril 1: macho, *C. alba* 738; Carril 2: macho, *C. alba* 1; Carril 3: macho, *C. alba* 428; Carril 4: macho, *C. galerita* 966; Carril 5: macho, *C. galerita* 719; Carril 6: macho, *C. haematuropygia* 674. Gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.

La figura 11, presenta tres especies del presente trabajo y un control de macho. Como se observa en la figura, el primer carril contiene la muestra de la especie *P. molinae*, y son evidentes las bandas CHD1Z y CHD1W, por lo que se trata de una hembra, en el segundo carril observamos un ejemplar de la misma especie, pero en el cual está ausente la banda CHD1Z y solo se visualiza la banda CHD1W. En los siguientes dos carriles se tienen dos individuos de la especie *P. krameri*, y en ambos se observa solo una banda de tamaño similar al producto de CHD1W. Finalmente, se muestran dos individuos de la especie *N. hollandicus*, los cuales nuevamente presentan un solo producto semejante a los anteriores, y ya que ambos habían sido identificados previamente por sus características morfológicas como hembras, se consideró que ésta efectivamente se trataba de CHD1W.



**Figura 11** Productos de amplificación del gen CHD1 correspondientes a tres especies diferentes. M: Marcador de peso molecular 100 pb.. Carril 1: bandas de CHD1Z (530 pb aprox.) y CHD1W (350 pb aprox.) de *P. molinae* 1100; Carril 2: banda CHD1W de *P. molinae* 1110; Carril 3: banda de 350 pb aprox. de *Psittacula krameri* 10; Carril 4: banda de 350 pb aprox. de *P. krameri* 11; Carril 5: banda de 350 pb aprox. de *N. hollandicus* 241; Carril 6: banda de 350 pb aprox. de *N. hollandicus* 325; Carril 7: control positivo, individuo macho (CHD1Z). Gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio

En la figura 12 se muestran algunos de los resultados obtenidos en la amplificación por el método Chelex. Se incluye un solo miembro de la familia Cacatuidae ya que, como se apreció en la figura 10, presentan tamaños muy similares entre sus diferentes especies.



**Figura 12** Productos de amplificación del gen CHD1 correspondientes al método Chelex. M: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1: macho, *Ara ararauna* 1; Carril 2: macho, *Ara ararauna* 2; Carril 3: hembra, *Ara severa* 3392; Carril 4: macho, *Ara chloropterus*; Carril 5: hembra, *P. molinae* 1100; Carril 6: hembra, *P. molinae* 1110; Carril 7: hembra, *Psittacus erithacus* 964; Carril 8: macho, *Platycercus eximius* 304; Carril 9: macho, *C. alba* 738. Gel de agarosa al 1.7% teñido con bromuro de etidio.

En base a los resultados obtenidos observamos que los productos de PCR oscilaron entre 510 a 570 pb para CHD1Z y 310-380 pb aproximadamente en el caso de CHD1W, lo que permitió una clara diferenciación entre ambas bandas. Los productos CHD1Z, de mayor tamaño se observaron en la familia Cacatuidae y en la especie *Platycercus eximius*, lo cuales fueron de 560 pb aproximadamente en ambos casos, y se puede apreciar claramente en la figura 12.

El caso de *Myiopsitta monachus*, fue la única especie en la que no se obtuvo ningún producto de amplificación y por lo tanto no se pudo conocer el sexo de sus ejemplares y no se muestra ninguna figura.

Los cuadros 5 y 6 presentan los resultados condensados del sexaje de la familia Psittacidae y Cacatuidae respectivamente, donde se identificó de manera precisa el sexo de 5 géneros, 9 especies y 14 individuos

| Nombre científico          | No. anillo    | Asignación de sexo por PCR del gen CHD1 |
|----------------------------|---------------|---|
| <i>Ara arauna</i>          | s/a           | macho                                   |
| <i>Ara ararauna</i>        | s/a           | macho                                   |
| <i>Ara chloropterus</i>    | s/a           | macho                                   |
| <i>Ara nobilis</i>         | COS 3392      | hembra                                  |
| <i>Pyrrhura molinae</i>    | COS 1100      | hembra                                  |
| <i>Pyrrhura molinae</i>    | COS 1110      | hembra                                  |
| <i>Myiopsitta monachus</i> | PMC 343       | No se determinó*                        |
| <i>Myiopsitta monachus</i> | PMC 350       | No se determinó*                        |
| <i>Psittacus erithacus</i> | MARY C964     | hembra                                  |
| <i>Platycercus eximius</i> | PMC 304       | macho                                   |
| <i>Psittacula krameri</i>  | VERDE         | No se determinó*                        |
| <i>Psittacula krameri</i>  | COTE 219 AZUL | No se determinó*                        |

**Cuadro 5. Resultados del sexaje por medio de la aplicación del PCR dirigido al gen CHD1. Familia *Psittacidae*.** s/a: Ejemplares que no presentan anillo como método de identificación.; \*: Los resultados del sexaje por medio de la amplificación del gen CHD1, resultaron ambiguos o fallidos, independientemente del sexo que se asignó por sus características morfológicas en las especies *P. krameri* y *N. hollandicus*.

| Nombre científico             | No. anillo | Asignación de sexo por PCR del gen CHD1 |
|-------------------------------|------------|---|
| <i>Cacatua alba</i>           | 1          | macho                                   |
| <i>Cacatua alba</i>           | PALMAS 738 | macho                                   |
| <i>Cacatua alba</i>           | FEM 428    | macho                                   |
| <i>Cacatua galerita</i>       | PALMAS 966 | macho                                   |
| <i>Cacatua galerita</i>       | PALMAS 719 | macho                                   |
| <i>Cacatua haematuropygia</i> | AVIX 674   | macho                                   |
| <i>Nymphicus holIndicus</i>   | 241        | No se determinó*                        |
| <i>Nymphicus holIndicus</i>   | 325        | No se determinó*                        |

**Cuadro 6. Resultados del sexaje por medio de la aplicación del PCR dirigido al gen CHD1. Familia *Cacatuidae*.** s/a: Ejemplares que no presentan anillo como método de identificación.; \*: Los resultados del sexaje por medio de la amplificación del gen CHD1, resultaron ambiguos o fallidos, independientemente del sexo que se asignó por sus características morfológicas en las especies *P. krameri* y *N. hollandicus*

## Discusión

Como se ha venido diciendo, contar con una herramienta eficaz para conocer el sexo de las aves bajo diversas circunstancias, resulta crucial. En el presente trabajo, se empleó una técnica molecular en dos familias del orden Psittaciforme, la cual probó ser poco invasiva, rápida y confiable

Utilizar la pluma como fuente de DNA, representó ciertas ventajas sobre otros tipos de muestras, como el fácil acceso y toma de la muestra, la disminución del estrés y el no requerir equipo especializado (Khaerunnisa *et al.* 2013). Aunque se observaron diferencias en cuanto a la calidad del DNA obtenido a partir de las plumas, éste fue adecuado para realizar la PCR. En éste trabajo la integridad del DNA obtenido fue buena, en especial por el método de fenol cloroformo y es importante considerar que, aunque se menciona que la degradación del DNA no necesariamente inhibe la amplificación en la PCR, principalmente cuando se amplifican fragmentos pequeños de entre 100 y 200 pb, ésta puede generar amplificaciones no específicas (Bello *et al.* 2001).

El grado de pureza, que también es un punto clave para que se pueda realizar la reacción de PCR, es considerado en la literatura como 1.75 el valor ideal, sin embargo, se ha reportado que debido a la composición de las plumas (90% de beta queratina, 8% de agua, 1% de lípidos y 1% de proteínas y pigmentos) es frecuente encontrar valores de pureza inferiores, por contaminación principalmente con queratina (Khaerunnisa *et al.* 2013). En éste trabajo, se obtuvieron valores diversos dependiendo el método de extracción, cuyos resultados se discuten mas adelante.

La evaluación del método de conservación fue un paso importante ya que, aunque se ha reportado que una de las ventajas de emplear plumas es que la conservación de las mismas resulta muy sencilla, y que incluso se pueden mantener a temperatura ambiente por periodos de tiempo prolongados, no se había valorado como esto podría afectar la calidad del DNA. Contrario a lo reportado previamente (Davidson y Borenshtain, 2002; Wang *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2010; Moreno López *et al.*, 2011; Vucicevic *et al.*, 2012, etc.), en éste caso se observó que existe mayor degradación en las plumas conservadas a temperatura ambiente y se demostró que conservar las muestras en etanol al 70% no solo mantiene el DNA en buen

estado, sino que también facilita la manipulación al momento de cortar el cálamo, promueve la sedimentación del material ajeno que podría actuar como contaminante y es una técnica simple que puede ocuparse a nivel campo, ya que no requiere de refrigeración y transportarse fácilmente. Lo único que se debe tomar en cuenta es que, las plumas pequeñas al tener menos tejido, su material genético se puede “lavar” y degradar con mayor facilidad, por lo que se recomienda manipular con cuidado sus tubos y procesarlas lo antes posible.

La selección del tipo de pluma a utilizar no solo consideró la obtención de DNA de buena calidad, también tomó en cuenta que en el muestreo se afectara lo menos posible al ave. Para ello se aseguró que los individuos empleados se estabilizaron rápidamente tras la toma de muestra, lo que sugiere que se produjo un mínimo nivel de estrés y concuerda con la mayoría de los autores (Meredith y Redrobe, 2002; Fowler, 2008; Constantini *et al.*, 2008). Respecto a la calidad del DNA obtenido a partir de los diferentes tipos de plumas, en el presente trabajo encontramos que las plumas más grandes con cálamos gruesos, presentaban grados de pureza menores que las plumas pequeñas, debido probablemente a una mayor cantidad de queratina. Por otro lado, sabemos que las plumas de contorno de la región torácica, a diferencia de las plumas remeras y timoneras, no se encuentran involucradas en la dinámica de vuelo, y por su localización son más accesibles y el muestreo difícilmente deja una marca que afecte la vistosidad del ave, por lo que sugerimos el empleo de las plumas de contorno de la región torácica, que además presentan buenos resultados en cuanto al DNA que se extrae de las mismas. No obstante, cabe recalcar que, aun utilizando siempre el mismo tipo de pluma, puede haber variaciones, debidas a otros factores, como la etapa de crecimiento de la pluma, que es difícil diferenciar a simple vista, o el tamaño de la pluma dado por la especie; no es lo mismo una pluma de contorno de una guacamaya que la de una cotorra.

Al comparar los resultados obtenidos con el método de fenol cloroformo se observaron diferencias en el grado de pureza y como se ha reportado, estas radican en el hecho de que el método con Chelex, resume los pasos de precipitación y separación de las fases, que son etapas en las que por el método de fenol cloroformo se puede presentar la contaminación de la muestra y a que elimina la mayor parte de inhibidores de la PCR, como los pigmentos y queratina presentes en las plumas (Khaerunnisa *et al.* 2013). Así pues, tomando en cuenta los valores que se obtuvieron en ambos tipos de extracción, éstos fueron desde 1.07 el mínimo con el que se obtuvo buena amplificación, hasta 2.03, siendo los mayores los obtenidos por

medio de Chelex. Además, este método reduce el proceso de dos días a uno y es adecuado para obtener DNA de muestras muy pequeñas. El único inconveniente del mismo fue la falta de visualización del DNA en el gel de agarosa de algunas muestras, lo cual ya había sido reportado previamente (Bello *et al.* 2001), y se menciona que el método Chelex está diseñado de tal modo que el DNA extraído se encuentra listo para el PCR, por lo que en cierto modo, no existiría la necesidad de realizar estas lecturas.

Por otro lado, el método fenol cloroformo, con las modificaciones realizadas, y aunque en la mayoría de las muestras se obtuvo amplificación por PCR, presenta la desventaja del empleo de sustancias como el fenol, y más oportunidades para la contaminación, aunque esta se puede disminuir cuando el personal está bien capacitado. Consideramos por lo tanto, que ambos métodos utilizados probaron ser aptos para la prueba de sexaje y la opción de emplear un método u otro irá de acuerdo a las capacidades y necesidades de cada laboratorio o criadero.

Una vez que se estandarizaron los puntos anteriores, la reacción de PCR fue muy sencilla. Los iniciadores CHD1F/CHD1R resultaron adecuados para la amplificación de DNA obtenido de pluma y sus productos se visualizaron fácilmente en gel de agarosa, ya que estos iniciadores amplifican regiones más cortas que otros y sus productos tienen diferencias de 200 pb aproximadamente.

Las únicas especies en las que se presentaron dificultades para la determinación del sexo, fueron *Myiopsitta monachus*, *Psittacula krameri* y *Nymphicus hollandicus*. En las especies *P. krameri* y *N. hollandicus* se encontraron únicamente productos correspondientes al tamaño de la banda CHD1W, único de hembras, aunque se esperaba que además de este producto se hallara el correspondiente al gen CHD1Z. En el caso específico de *N. hollandicus* las características morfológicas ayudaron para corroborar que se trataba de hembras, no así en el caso de un ejemplar de *P. krameri*, en el cual la identificación morfológica no fue consistente con la técnica molecular, ya que uno de los individuos presenta el collar negro, característico de los machos de dicha especie y el único producto de amplificación obtenido fue el que corresponde a hembra. Estos resultados se pueden explicar por la posibilidad de que los sitios donde se hibridarían los iniciadores no se encuentren presentes al menos en el cromosoma Z, o a la degradación parcial del DNA. Se intentó comparar las secuencias de estas especies por

bioinformática, sin embargo esta información no está disponible en ninguna base de datos. De hecho únicamente se cuenta con la secuencia de interés en dos especies de psitácidos, no incluidos en éste trabajo, las cuales fueron útiles determinar que los iniciadores CHD1F y CHD1R se unen a regiones de los intrones 17 y 18 en psitácidos. Aunado a lo anterior, la determinación del sexo en individuos donde únicamente se presenta la banda correspondiente a CHD1W ya ha sido reportada previamente, y los autores mencionan que se puede llevar a cabo gracias a las diferencias de tamaño de los fragmentos de CHD1Z y CHD1W, aunque solo uno de los dos esté presente (Vucicevic *et al.*, 2012). Por otra parte, empleando los iniciadores CHD1F/CHD1R, se reportó el caso de una hembra en la que se amplificó solo el fragmento de CHD1Z, con un tamaño de 533.83 pb (Lee *et al.*, 2010).

Dilucidar las causas que expliquen los resultados expuestos anteriormente, podría parecer intrascendente al tratarse de dos especies con dimorfismo sexual externo, sin embargo, recordemos que aún en estas especies la diferenciación *in ovo*, o cuando son polluelos es imposible. Por lo que, aunque el presente trabajo se haya realizado en adultos, en otros casos podría ser de gran importancia conocer el sexo en otras etapas.

La especie *Myiopsitta monachus*, fue la única en la que no se obtuvo ningún producto de amplificación, lo que puede deberse a una ausencia de las secuencias blanco de los iniciadores, aunque de nuevo esto no se pudo comprobar ya que no se cuenta con la secuencia completa del gen CHD1 en esta especie. Cabe mencionar que, *M. monachus* se encuentra dentro de la familia Psittacidae, pero no ha sido asignada a ningún subgrupo (*Incertae sedis*), dificultando aún más su comparación con otras especies, por lo que más estudios de su filogenia serían de gran utilidad.

En este trabajo demostramos que los primers CHD1F y CHD1R pueden ser empleados para el sexaje de aves de las familias Psittacidae y Cacatuidae, pudiendo identificar el sexo de 5 géneros, 9 especies y 14 individuos. Además para ello se logró obtener DNA a partir de plumas, lo que hace el muestreo poco invasivo y adecuado para especies exóticas.

Debido a que en las bases de datos genómicos no se encuentra información acerca del gen CHD1 en la mayoría de las especies con que se trabajó, sería pertinente llevar a cabo la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos para profundizar en su estudio principalmente con fines filogenéticos.

En aquellas especies donde no hubo amplificación o bien se obtuvo la banda correspondiente al cromosoma W, se podría intentar la amplificación con otro juego de iniciadores que amplifique regiones diferentes a CHD1F y CHD1R.

Este trabajo sienta las bases para su posterior aplicación en el montaje de una prueba comercial para realizar el sexaje de las aves, que sea confiable, sencilla y de utilidad para los criaderos comerciales, eliminando o al menos disminuyendo la extracción de crías de su medio natural. Por ejemplo, para apoyar los programas de reproducción de especies de mexicanas, ya que ha demostrado ser útil en todos los miembros de la subfamilia Arnieae en los que se probó. del Por otro lado, al promover la compra de aves de criaderos legales, se beneficia la conservación de especies amenazadas.

## Conclusiones

- ◆ Se logró la estandarización y optimización de la técnica de sexaje molecular, desde la obtención de la muestra hasta la reacción PCR.
- ◆ El muestreo con plumas realizado adecuadamente, es un método mínimamente invasivo, que provee DNA de suficiente calidad y es una excelente opción cuando el muestreo no se puede realizar por otro método.
- ◆ Se determinó que las plumas de contorno de la región torácica son las más adecuadas para el sexaje molecular.
- ◆ La técnica de PCR empleando los iniciadores CHD1F/CHD1R demostró ser eficaz, rápida, certera y fácilmente reproducible.
- ◆ Se realizó exitosamente el sexaje de 9 especies de psitácidos (*Ara ararauna*, *A. chloropterus*, *A. nobilis*, *Pyrrhura molinae*, *Psittacus erithacus*, *Platycercus eximius*, *Cacatua alba*, *C. galerita*, *C. haematuropygia*) pertenecientes a dos familias diferentes, y se corroboró, que el gen CHD1 se encuentra altamente conservado.
- ◆ La especie *Myiopsitta monachus* (Cotorra monje) fue la única en la que no se obtuvo ningún producto de amplificación.
- ◆ En las especies *Psittacula krameri* (Perico de Collar) y *Nymphicus hollandicus* (Ninfa) se encontraron únicamente productos correspondientes al tamaño de la banda CHD1W, que en el caso de *N. hollandicus* concuerda con sus características morfológicas.
- ◆ Esta técnica de sexaje molecular se puede aplicar tanto para Medicina Veterinaria, como en trabajos de conservación animal, ornitología y en gran variedad de estudios genéticos.



## Bibliografía.

Baumel JJ, King AS, Lucas AM, Breazile JE, Evans HE editors. *Nomina Anatomica Avium*. London: Academic Press 1979.

Bayard de Volo S, Reynolds TR, Douglas RM, Antolin FM. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. *The Condor* 2008;110, 4.

Bello N, Francino O, Sánchez A. Isolation of genomic DNA from feathers. *J Vet Diagn Invest* 2001;13:162-164

Bermúdez HLG, García GA, Leal GC, Riojas VV, Jaramillo RG, Montes De Oca LR. Molecular Sexing of Monomorphic Endangered *Ara* Birds. *Journal of Experimental Zoology* 2002;292:677-680.

Boersma DP, Davies ME. Sexing Monomorphic Birds by Vent Measurements. *Auk*. 1987;1:779-783.

Bonilla RC, Cinta MC, Santos-Moreno A. Determinación del dimorfismo sexual secundario en la Guacamaya Verde (*Ara militaris*): Complementariedad Morfométrica e Índice Ocular. *Acta Zoológica Mexicana*; 2011; 27:245-255.

Breeding S, Ferrie MG, Schutz P, Leighty AK, Plassé C. Hand-Rearing and Sex Determination Tool for the Taveta Golden Weaver (*Ploceus castaneiceps*). *Zoo Biology*, 2012;31:600-608.

Cammack R, Attwood KT, Campbell NP, Parish HJ, Smith DA, Stirling LD, *et al.* editors. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. USA, New York: Oxford University Press, 2007.

Cantú GJC, Sánchez SM, Grosselet M, Silva GJ. Tráfico Ilegal de Pericos en México: Una Evaluación Detallada. Washington, D.C, USA: Defenders of Wildlife, 2007: 1-4, 16.

Cattaneo C, Gelsthorpe K, Sokol JR. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006.

Cerit H, Avanus K. Sex Determination by CHDW and CHDZ Genes of Avian Chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turk J. Vet. Anim. Sci* 2007;31:371-374. (1)

- Cerit H, Avanzuz K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World's Poultry Science Journal* 2007;63:91-99. (2)
- Cheng HY, Kuo FT, Lee ND, Weng FC. Sex identification of the Black-face Spoonbill (*Platalea minor*). Online First: June 14, 2005.
- Constantini V, Guaricci CA, Laricchiuta P, Rausa F, Lacalandra MG. DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Animal Reproduction Science* 2008;106:162-167.
- Cracraft J. Avian higher-level relationships and classification: nospasseriforms. In: Dickinson EC, Remsen V. *The Howard and Moore Complete Checklist of the Birds of the World*. 4<sup>th</sup> ed. UK: Aves Press, 2013:21-43.
- Del Valle CM. Introducción a la Biología y Ecología de las Psitácidas Neotropicales. *Memorias de la Conf. Interna. Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv*; 2008, 4:1. Colombia. Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre (VVS) ISSN 2001-9348.
- Donohue CK, Dufty AM. Sex determination of Red-tailed Hawks (*Buteo jamaicensis calurus*) using DNA analysis and morphometrics. *J. Field Ornithol* 2006;77:74-79.
- Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings: Biological Sciences*. 1996;263:1635-1641.
- Forshaw MJ editor. *Parrots of the World*. USA: Princeton University Press. 2010. pp. 178, 210, 216.
- Fowler ME, editors. *Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals*. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2008:377-378, 402-404.
- Franco OMP. Evaluación y recomendación para el mejoramiento de la situación de los psitácidos en el centro para la conservación e investigación de la vida silvestre Los Reyes. (Tesis de maestría). México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- Fridolfsson A, Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol* 1999; 30:116-121.

Fridolfsson AK, Ellegren H. Molecular Evolution of the Avian CHD1 Genes on the Z and X Sex Chromosomes. *Genetics* 2000;155:1903-1912.

Fuller G, Margulis WS, Santymire R. The Effectiveness of Indigestible Markers for Identifying Individual Animal Feces and Their Prevalence of Use in North American Zoos. *Zoo Biology*, 2011;30:379-398.

Gálvez A. Identificación de sexo en los géneros *Ara*, *Amazona* y *Rhyncopsitta* de la familia Psittacidae aplicando una técnica molecular y posibles causas de ausencia de dimorfismo sexual (tesis de licenciatura). Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. S/A

González GPL, Estades FC. Is natural selection promoting promoting sexual dimorphism in the Green-backed Firecrown Hummingbird (*Sephanoides Sephanoides*). *J Ornithol*; 2009;150:351-356.

Griffiths, R, Tiwari, B. Sex of the last wild Spixi's macaw. *Nature* 1995; 375:454.

Griffiths, R, Daan, S, Dijkstra, C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1996; 263:1251-1256.

Griffiths R, Korn R. A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 1997;197:225-229.

Griffiths R, Double CM, Orr K, Dawson GR. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 1998;7:1071-1075.

Griffiths R, Phil D. Sex Identification in Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2000;9:14-26.

Harcourt-Brown NH, Chitty J editors. *BSAVA Manual of Psittacine Birds*. 2<sup>nd</sup> Ed. Dorset UK: BSAVA. 2005 pp. 7-7, 102, 222-223, 231-232.

Hori T, Asakawa S, Itoh Y, Shimizu N, Shigeki M. Wpkci, Encoding an Altered Form of PKCI, Is Conserved Widely on the Avian W Chromosome and Expressed in Early Female Embryos: Implication of Its Role in Female Sex Determination. *Molecular Biology of the Cell* 2000;11:3645-3660.

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

Jensen T, Pernasetti MF, Durrant B. Conditions for Rapid Sex Determination in 47 Avian Species by PCR of Genomic DNA from Blood, Shell-Membrane Blood Vessels, and Feathers. *Zoo Biology* 2003;22:561-571.

Jensen T, Mace M, Durrant B. Sexing of Mid-Incubation Avian Embryos as a Management Tool for Zoological Breeding Programs. *Zoo Biology* 2012;31:694-704.

Juniper T, Parr M, editors. *Parrots: A guide to parrots of the World*. 1<sup>st</sup> Ed. London, England: Yale University Press, 2010;17-24, 278-283, ...

Khaerunnisa I, Sari E, Ulfah M, Jakaria, Sumantri. Avian Sex Determination Based on Chromo Helicase DNA-binding (CHD) Genes Using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Media Peternakan*, 2013:85-90.

Kahn WN, John SJ, Quinn WT. Chromosome-specific Intron Size Differences in the Avian CHD Gene Provide an Efficient Method for Sex Identification in Birds. *The Auk* 1998;115:1074-1078.

Karp G editor. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 7<sup>th</sup> ed. United States of America: Wiley. 2013. pp. 769.

Katzner ET, Wheeler M, Negro JJ, Kapetanacos Y, DeWoody A, Horvath M, *et al.* To pluck or not pluck: scientific methodologies should be carefully chosen, not 'one size fits all'. *J. Avian Biol.* 2012;43:15-17.

Lee JCHI, Tsai LCH, Hwa PY, Chan CHL, Huang A, Chin SCH *et al.* A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes* 2010; 24:27-31.

Lee J, Tell L, Lasley B. A Comparison of Sex Steroid Hormone Excretion and Metabolism by Psittacine Species. *Zoo Biology*, 1999;18:247-260.

Lemons RP, Sedinger SJ, Nicolai AC, Oring WL. Sexual dimorphism, survival, and parental investment in relation to offspring sex in a precocial bird. *Journal of Avian Biology*. 2012;43:445-453.

Maurer G, Beck N, Double CM. A 'feather-trap' for collecting DNA samples for birds. *Molecular Ecology Resources* 2010;10:129-134.

Matta CN, Ramírez MN, Zúñiga DB, Vera V. Determinación del sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta biol. Colomb* 2009;14:25-38.

McDonald GP, Griffith CS. To pluck or not to pluck: the hidden ethical and scientific costs of relying on feathers as a primary source of DNA. *J. Avian Biol.* 2011;42:197-203.

Meredith A, Redrobe S editors. *BSAVA Manual of Exotic Pets*. 4<sup>th</sup> ed. Barcelona, Spain: BSAVA, 2002. pp. 154.

Miyaki YC, Duarte BM, Caparroz R, Nunes VA, Wajntal A. Sex Identification of South American Parrots (Psittacidae, Aves) Using the Human Minisatellite Probe 33.15. *The Auk* 1997;114:516-520.

Miyaki YC, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira LS, Wajntal A. Sex Identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR: Perspectives for Wild and Captive Population Studies. *Zoo Biology* 1998;17:415-423.

Monge ZE. Análisis morfométrico y sexado por DNA de psitácidos mantenidos en la zona de influencia de la FES-C (Tesis de licenciatura). Estado de México México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.

Moreno LD, Henaó BB, López GG, Castaño VG, Rivera PF. Determinación del sexo en aves de la familia Furnariidae a través de técnicas moleculares. *Bol. cient. mus. hist. nat.* 2011;15 (2):130-138.

Morin AP, Messier J, Woodruff SD. DNA extraction, amplification, and direct sequencing from hornbill feathers. *J.Sci.Soc.Thailand* 1994;20:34-41.

Nota Y, Takenaka O. DNA extraction from urine and sex identification of birds. *Molecular Ecology*,1999;8:1235-1238.

Ogawa A, Solovei I, Hutchison N, Saitoh Y, Ikeda JE, McGregor H *et al.* Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. *Chromosome research* 1997;5:93-101.

O'Malley B, editor. *Anatomía y Fisiología Clínica de Animales Exóticos; Estructura y función de mamíferos, aves, reptiles y anfibios*. 1ª ed. Zaragoza, España: Elsevier, 2007.pp:124, 144.

O'Neil M, Binder M, Smith C, Andrews J, Reed K, Smith M, *et al.* ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Development Genes and Evolution*. 2000;210:243-249.

Ong H.K y Vellayan S. An Evaluation of CHD-Specific Primer Sets for Sex Typing of Birds from Feathers. *Zoo Biology*, 2008;27:62-69.

Penfold ML, Halager S, Boylan J, Wit M, Metrione CL, Oliva M. Differences in Fecal Androgen Patterns of Breeding and Nonbreeding Kori Bustards (*Ardeotis kori*). *Zoo Biology*, 2003;32:54-62.

Quintero ML, Soto ZC, Mercado MC. *Temas Selectos de Biología Molecular: Manual del Curso Práctico*. Cuautitlán, Estado de México; FES-C, Departamento de Ciencias Biológicas: Sección de Ciencias Morfológicas. 2012.

Robaldo GNM *et al*, Chapter 17: Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). IN: Fowler ME editors. *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. 3th Ed. Iowa, USA: Iowa State University Press, 2001: 146

Russello MA, Amato G. Application of Noninvasive, PCR-Based Test for Sex Identification in an Endangered Parrot, *Amazona guildingii*. *Zoo Biology* 2001;20:41-45.

Samour J editor. *Avian medicine*.. China: Mosby, 2000.

Santamaría AC, Kelley S, Schulz GG, Ransom DJR, Hurtado AL. Polymerase Chain Reaction-Based Sex Identification in the Greater Roadrunner. *Journal of Wildlife Management* 2010;74:1395-1399.

Schroeder J, Kentie R, Van Der Velde M, Hooijmeijer WJ, Both C, Haddrath O, *et al.* Linking intronic polymorphism on the CHD1-Z gene with fitness correlates in Black-tailed Godwits *Limosa l. limosa*. *Ibis: The International Journal of Avian Science*, 2010;152:368-377.

Spoon RT, Chapter 8: Parrot Reproductive Behavior, or Who Associates, Who Mates. And Who Cares?. IN: LUESCHER UA editor. *Manual of Parrot Behavior*. 1<sup>st</sup> Ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2006: 63-65, 67-69, 72-73

Stevanov PM, Vucicevic M, Bosnjak J, Stevanovic JD, Resanovic R, Stanimirovic Z. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2013;63:45-51.

Taberlet P, Bouvet J. A Single Plucked Feather as a Source of DNA for Bird Genetic Studies. *The Auk* 1991;108:959-960.

Tejera NV, De Tejera VA. Pericos, Casangas, Loros, Guacamayos y afines. *Tecnociencia* 2001;3:19-30.

Vucicevic M, Stevanov-Pavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, *et al.* Sex Determination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing. *Zoo Biology* 2012;00:1-13.

Wang LC, Chen CT, Lee HY, Li SH, Lir JT, Chin SC, *et al.* Cut Feather Containing Rachis as a Sampling Way for Avian Sexing. *Zoo Biology*, 2006;25: 279-283.

Wang LC, Chen CT, Lee HY, Li SH, Lir JT, Chin SC, *et al.* Sexing a Wider Range of Avian Species Based on Two CHD1 Introns With a Unified Reaction Condition. *Zoo Biology*, 2007;26:425-431.

White EN, Dawson R, Coghlan LM, Tridico RS, Mawson RP, Haile J, *et al.* Application of STR markers in wildlife forensic casework involving Australian Black-cockatoos (*Calyptorhynchus spp.*). *Forensic Science International: Genetics* 2012;6:664-670.

Zumbo P. Phenol-chloroform extraction. Weill Cornell Medical College. Department of Physiology and Biophysics. 2006.

## Anexo: Descripción de las especies empleadas en el presente trabajo.

### *Ara ararauna*



**Fotografía. 1** Pareja de Guacamayas azul-dorado. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

Una de las guacamayas mejor conocidas, recibe varios nombres comunes, como Guacamaya azul-dorado, Guacamaya de pecho amarillo, Guacamaya amarillo y azul, entre otros. Es una especie grande de 75 a 83 cm. Su color es azul ultramarino, con amarillo-dorado en la zona ventral, una cola larga, el pico es negro y grueso, presenta un parche facial color blanco

desprovisto de plumas, con líneas negras. No presenta dimorfismo sexual y las aves juveniles se diferencian por tener un iris café. Puede ser confundida con la Guacamaya de garganta azul (*Ara glaucogularis*), aunque ésta última es una especie mucho más rara. Lo más común es encontrar a *A. ararauna* en parejas o familias de 3 a 4 individuos, a veces forma parvadas de hasta 25 componentes, las cuales pueden ser mixtas entre otras especies de guacamayas. Tienen un llamado ronco y estridente, que puede sonar como *raaa*, *kewa*, *scureeek* y *scaaark*. Se distribuye en zonas boscosas húmedas de Sudamérica, desde el Este de Panamá en tierras tropicales bajas, hasta el Sureste de Brasil, Bolivia, Paraguay y la zona tropical baja de Colombia, con hallazgos ocasionales en otras zonas tropicales como Venezuela, se ha extinto de manera local en lugares como Guayana y Trinidad. Como casi todas las especies de psitácidos tienen hábitos crepusculares, y se alimentan silenciosamente en las copas de los árboles, de una dieta que varía dependiendo la zona donde se encuentra, compuesta generalmente por frutos de palmas, nueces, brotes de hojas, etc. Su temporada reproductiva en la mayoría de los lugares es durante Febrero y Marzo, aunque puede ir desde Diciembre hasta Febrero en Colombia y de Noviembre a Enero en Perú, suelen tener dos huevos que empollan en agujeros naturales de palmas secas (Forshaw, 2010; Juniper y Parr, 2010).

*Ara chloroptera*



**Fotografía. 2** Guacamaya aliverde. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

La Guacamaya aliverde o Guacamaya roja, es una de las más poderosas del género. Es predominantemente roja, con una cola muy larga y terminación en punta, tiene un verde muy llamativo en las partes exteriores y superiores de las alas y un pico muy grande. El parche facial está marcado por delgadas líneas de plumas rojas. Se diferencia de la Guacamaya escarlata (*Ara macao*) por sus alas verdes no amarillo brillante, por tener un plumaje rojo más oscuro y ser ligeramente más pequeña, midiendo de 73 a 95 cm aproximadamente. No presenta dimorfismo sexual y sus polluelos tienen colas más cortas, iris

café claro y pueden tener tintes amarillos en las plumas externas de las alas. Forma parejas y menos comúnmente pequeñas parvadas, en las que puede asociarse a la Guacamaya escarlata o a la Guacamaya azul-dorado. Su llamado es muy fuerte pero menos áspero que el de la Guacamaya escarlata. Se distribuye en el bosque tropical, desde el este de Panamá y gran parte de Sudamérica, hasta el norte de Argentina. Ha desaparecido de ciertas localidades, como Espíritu Santo, Río de Janeiro en Brasil y el interior de Panamá. La reducción local de sus poblaciones se debe principalmente a la pérdida de su hábitat y a la captura ilegal, son muy comunes en cautiverio. Su dieta en vida libre incluye frutos y semillas de varias especies, que varían dependiendo su ubicación. Su temporada reproductiva es de Noviembre a Abril en Perú, y en Enero para casi todos los demás lugares que habita. Anidan en árboles huecos o grietas de paredes rocosas, ponen de dos a tres huevos. (Forshaw, 2010)

*Ara severa*



**Fotografía. 3** Guacamaya severa. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

*A. severa* es una de las especies pequeñas de guacamaya, se le conoce también como Guacamaya de frente castaña, Guacamaya verde de Brasil, Guacamaya severa, Maracaná grande, entre otros. Mide 40 a 49 cm, de color verde con una larga cola con terminación en punta, tiene una corona azul-verdosa, la frente es de un color castaño y tiene las mejillas color blanco y desprovistas de pluma. Tiene un parche rojo en la parte interna de las alas y plumas azules en las remeras primarias. Ambos sexos son similares, a veces las hembras presentan un color más pálido en la frente. Se agrupa en parvadas pequeñas o

parejas, algunas veces se puede asociar con la Guacamaya de vientre rojo (*Orthopsittaca manilata*) o con Amazona alinaranja (*Amazona amazonica*). Vuela más rápido que las especies más grandes de guacamayas y tiene una vocalización aguda y fuerte. Su dieta es mayormente a base de frutos de palmas y algunas semillas. Su temporada de reproducción no está muy bien definida pero, probablemente es de Marzo a Mayo en Colombia, de Febrero a Marzo en Panamá y de Septiembre a Diciembre en Surinam, prefiere anidar en una palma o árbol hueco, cerca de agua y tienen 2 a 3 huevos. Se distribuye en zonas tropicales y tierras bajas, desde el Este de Panamá y el Sudamérica hasta Bolivia central. Aunque puede llegarse a ver en cautiverio no tiene una gran demanda y sus poblaciones solo han observado disminuciones locales. (Forshaw, 2010; Juniper y Parr, 2010)

*Pyrrhura molinae*



**Fotografía. 4** Cotorra de molina. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

Se le conoce comúnmente como Cotorrilla mejilla verde, Cotorra de molina, Cotorra argentina, Cotorra de cola carmesí, y otros nombres regionales. Mide aproximadamente 25 cm, es mayormente color verde con una larga cola, pecho de apariencia escamosa, cabeza café, cola marrón y un parche granate en el vientre. Además tiene un parche gris alrededor de los oídos y coloración azul las

plumas remeras. La combinación de su color mayormente verde, vientre granate y mejillas,

separan esta especie de otras similares. Es una especie sin dimorfismo sexual, las aves inmaduras presentan una coloración más pálida y el iris más oscuro. Su llamado es largo y estridente, con la segunda nota más baja que la primera. Es una especie muy silenciosa mientras se alimenta. No se tiene mucha información sobre su dieta, se cree que es similar a la de otras cotorras. Anida en árboles huecos y pone de tres a cuatro huevos. Habita zonas boscosas densas, aunque también puede encontrarse en claros. Se distribuye desde el interior de América Central y Sur. Desde los 80's fue una especie predilecta como mascota, sin embargo, sus poblaciones se han mantenido estables. Se consideran 5 razas, distribuidas en diferentes regiones, éstas son *P. m. molinae*, *P. m. phoenicura*, *P. m. australis*, *P. m. sordida* y *P. m. restricta*. (Forshaw, 2010)

*Myiopsittta monachus*



**Fotografía. 5** Cotorra monje. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

*M. monachus* es conocida comúnmente como Cotorra monje, Perico monje, Cotorra de Uruguay, Perico verdigris y otros. Mide aproximadamente 33 cm y pesa entre 120 a 140 g. El manto es verde limón, con una larga cola en forma de punta, un pecho gris, con barrido ventral, la cabeza y la garganta también son grises. Tiene una banda amarilla difusa en la parte baja del pecho, las remeras presentan una coloración azulada. Aunque convive con muchas especies de loros y cotorras, es inconfundible por su coloración gris. No presenta dimorfismo sexual. Forma grandes y ruidosas parvadas de 20 individuos o más, se puede asociar con la Cotorra ñanday (*Aratinga nenday*). Tiene un vuelo rápido y resuelto. Es muy característico de esta especie que forma nidos comunitarios en las copas de los árboles. Tienen un amplio repertorio de vocalizaciones, y son muy expresivas. Esta especie habita regiones boscosas secas y tierras abiertas con galerías de árboles, también se pueden ubicar en la sabana y el bosque espinoso, se distribuye desde las tierras bajas del Sudamérica, hasta el Este de los Andes, desde Bolivia hasta la Patagonia. Ha establecido poblaciones ferales en localidades como Puerto Rico, Florida y Nueva York (EU), Río de Janeiro (Brasil) e incluso Berlín (Alemania), Austria y otras localidades del Mediterráneo, también es muy común verla en cautiverio. Se alimentan comunalmente y a veces lo hacen en el nido, mientras no sea temporada de reproducción. Su temporada de reproducción es de octubre a diciembre, ponen de 4 a 6 huevos (Forshaw, 2010).

*Psittacus erithacus*



**Fotografía. 6** Loro gris africano. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

El Loro gris africano o Loro gris, como su nombre lo indica es de color inconfundiblemente gris, de talla grande (33 cm), con una llamativa cola color escarlata. El vientre, la parte interior de las alas y la grupa tienen brillos plateados, mientras que el pecho, el manto y la parte exterior de las alas es de un gris muy oscuro. Tienen un área facial más clara, con pico negro e iris amarillo. No exhibe dimorfismo sexual. Sus vocalizaciones son un amplio repertorio de graznidos, todos

muy característicos, también tienen la capacidad de imitar los sonidos de otras aves y mamíferos, incluyendo el humano. Sus parvadas son muy ruidosas, y pueden formar comunidades de hasta 10,000 individuos. Se ubica naturalmente en el Este y Centro de África, y algunas islas como Bioko y Príncipe. Es un ave sedentaria, del bosque tropical primario y secundario, en tierras bajas, aunque puede llegar a los 2,200 m. Su dieta incluye frutos y semillas de especies como *Ficus*, *Heisteria*, *Dacryodes*, *Macaranga*, entre otros. Debido a la pérdida de su hábitat, ha habido una drástica disminución de su población en algunos lugares como Liberia y Kenya (Forshaw, 2010; Juniper y Parr, 2010).

*Platycercus eximius*



**Fotografía. 7** Rosela común. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

Ésta especie recibe varios nombres, como Rosela Común, Rosela Oriental, Perico multicolor, Rosela roja, entre otros. Es una ave pequeña de 29 a 34 cm, pertenece a la subfamilia *Platycerniae*. Es nativa del sureste de Australia y de Tasmania, fue introducida a Nueva Zelanda. La combinación de cabeza roja, mejillas blancas,

alas con tintes azul intensos y cuerpo amarillo la hace una especie extremadamente llamativa e inconfundible. Tiene un llamado fuerte y penetrante, un vuelo suave y ondulante, donde es muy notorio su región ventral color verde pálido. Pueden existir híbridos entre ésta especie y la Rosela Carmesí (*Platycercus elegans*) que se diferencian por presentar mejillas blancas con azul o puramente azules. Presentan un muy sutil dimorfismo sexual, el cual solo puede notarse al comparar ambos sexos, las hembras son ligeramente mas pequeñas que los machos, tienen una cabeza de color menos brillante y pueden presentar más tonalidades verdes. En una especie que se observa de manera moderada en cautiverio, y se ha beneficiado por esparcimiento de la agricultura, y aunque se encuentra protegida por la ley, se llegan a otorgar licencias para erradicarla. Se distribuyen en zonas de bosques abiertos, cerca de cuerpos de agua, en bosques de eucaliptos, en tierras agrícolas y en suburbios. Forman grandes parvadas desde el inicio de la temporada de reproducción hasta inicios de primavera., su temporada de anidación es entre Julio y Marzo. Se alimentan tanto en el suelo como en los árboles, su dieta incluye semillas, frutos pequeños, grano, flores, néctar e insectos (Juniper y Parr, 2001).

#### *Psittacula krameri*



**Fotografía. 8** Perico de collar macho. Fuente: wildsienceblog.tumblr.com

Ésta especie es comúnmente conocida como Cotorra de Kramer o Perico de collar, mide aproximadamente 40 cm, es predominantemente verde con pico rojo y una cola larga. Los machos, a partir de los 3 años, presentan un collar negro con rosado, mientras que las hembras solo presentan un tono rosa pálido alrededor del cuello, y tienen colas más cortas, las aves juveniles tienen una apariencia similar pero con picos más pálidos. Son aves muy ruidosas, con un llamado agudo y alto, pueden silbar o hacer otros sonidos curiosos. Es el psitácido mayormente distribuido del Viejo Mundo, con un rango que abarca desde el occidente de África en su región tropical hasta

el sur de Asia. Es una especie que se adapta muy fácilmente, es común encontrarla en cautiverio y de hecho se considera invasora en algunos países. Se alimenta principalmente de frutos como *Tamarindus* y *Adansonia*, algunas semillas de plantas nativas de Asia. Se considera que existen 4 razas o variaciones geográficas, el *P.k. krameri*, *P. k. parvirostris*, *P. k. boreales* y *P. k. manillensis*. Además pueden tener varias mutaciones de color que incluyen el blanco, azul y amarillo (Forshaw, 2010; Juniper y Parr, 2010).

### *Cacatua alba*



**Fotografía.** 9 Cacatúa alba. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

Comúnmente conocida como Cacatúa blanca, puede recibir otro nombre como: Gran Cacatúa Blanca, Cacatúa Crestada blanca y Cacatúa Paraguas, debido a la forma de su cresta. Mide aproximadamente 46 cm. Su cresta es amplia, triangular y eréctil, con plumas en punta roma, siendo la única cacatúa grande con una cresta completamente blanca. Muestra su fusión de color amarillo debajo de las alas y de la cola.

La hembra se distingue del macho por presentar un color rojizo en el iris. Tienen una vocalización fuerte y chillona, además producen un silbido de alarma. (Juniper y Parr, 2001). Es endémica del Norte de las Islas Molucas. De manera natural se distribuye en tierras bajas y bosque montañoso. Se alimenta de semillas, frutas, nueces y moras. Su lugar de anidación predilecto es un hueco en un árbol alto, donde ponen 2 huevos, con un periodo de incubación de 30 días. (Juniper y Parr, 2001). Es muy común verla en cautiverio, por ello la IUCN la ha clasificado como vulnerable. Sin embargo se requieren más estudios para conocer su estatus en vida libre. (Juniper y Parr, 2010)



**Fotografía. 10** Cacatúa de moño amarillo.  
Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

### *Cacatua galerita*

La *C. galerita*, recibe varios nombres, en español el más común es el de Cacatúa de moño amarillo, pero también se le conoce como Cacatúa de cresta amarilla mayor, Cacatúa de cresta sulfurada mayor, entre otros. Es un ave grande de 38 a 51 cm, su plumaje es mayormente blanco, con una llamativa cresta

eréctil de color amarillo, tiene matices amarillos por debajo de las alas y la cola, el pico y las patas son de color gris negruzco. Presenta una coloración azul pálida o blanca alrededor del ojo dependiendo de la raza. Es la especie de cacatúa con cresta amarilla más ampliamente distribuida y hallada en cautiverio. Su vocalización es muy ruidosa y aguda (*ah-yai-yah!* or *kai-yah!*), y presenta varios sonidos guturales de alarma. Como varias especies de cacatúas, las hembras y las aves inmaduras tienen el iris de color rojizo oscuro, y los machos color café muy oscuro. (Juniper y Parr, 2001). Se extiende desde el bosque tropical y subtropical de Indonesia, Papúa Nueva Guinea y el este de Australia. Ha sido introducida a Nueva Zelanda, Palaos, Singapur y Puerto Rico. Es un ave principalmente sedentaria, pero puede realizar movimientos locales, de zonas costeras hacia zonas urbanizadas en invierno o bajo condiciones de escasez de alimento. Se alimentan en parvadas y pueden hacerlo tanto en los árboles como en el suelo, su dieta incluye raíces, nueces, moras, espino, algunas flores, brotes y larvas de insectos. Su temporada reproductiva varía con la región, en Australia es entre Mayo y Agosto en el norte y de Agosto a Junio en el sur, anidan en huecos de árboles altos, pero pueden llegar a hacerlo en acantilados o incluso en graneros. (Juniper y Parr, 2010)

*Cacatua haematuropygia*



**Fotografía. 11** Cacatúa filipina. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

También es conocida como Cacatúa filipina o Cacatúa de cola rosada. Mide aproximadamente 31 cm, siendo una especie pequeña, tiene cresta eréctil, pico blanco, pigmentos rojos en las plumas internas de la cola, y una sufusión amarilla por debajo de la cola. Es una especie monotípica, las hembras y los machos son similares, excepto por el color del iris, las aves juveniles son muy parecidas a los adultos. Es la única especie de cacatúa nativa de las Islas Filipinas, suele ser difícil de ver en su hábitat natural, aunque es conocida por sus “acrobacias”

en el aire, para evitar ser capturada por aves rapaces. Es una especie mayormente sedentaria, que depende mucho del bosque de manglares costeros, aunque se ha adaptado a los espacios modificados por el hombre. Se alimenta de semillas, frutas (sobre todo de tierras agrícolas), nueces y moras. Su vocalización es un fuerte y áspero croar, y un carraspeo de dos sílabas. Su época de reproducción es entre Febrero y Junio, prefiere árboles huecos y aislados para anidar. Se encuentra en la lista roja de la IUCN como especie Críticamente Amenazada (IUCN) y se ubica en el Apéndice I de CITES (Forshaw, 2010; Juniper y Parr, 2010).

*Nymphicus hollandicus*



**Fotografía.** 12 Ninfas posadas. Fuente: wildscienceblog.tumblr.com

Conocida comúnmente como Ninfa, hay quienes también la llaman Cocotilla o Carolina. Presenta una inconfundible descripción, cacatúa pequeña de color gris, con prominentes parches blancos en las alas, cresta eréctil y cola con degradado gris en los machos, o barrido gris y blanco

y plumas laterales amarillas en las hembras y los juveniles. Su vocalización es aguda, de dos sílabas, “*queel-queel*”. Se localizan en terreno abierto, granjas y otros sitios urbanizados de Australia, hasta 400 m por encima del nivel del mar. Forman pequeñas parvadas, que son ruidosas al volar, pero que son muy discretas al alimentarse a nivel de suelo. Es una de las especies más adaptables y predilectas como ave de compañía y su manutención en cautiverio es relativamente sencilla. El IUCN la considera una especie en Preocupación Menor (Forshaw, 2010).

