

# Identificación molecular del sexo de individuos del género *Henicorhina* en Venezuela

Ana Melisa F. Fernandes, Fernando Machado-Stredel, Marialejandra Castro y Jorge Luis Pérez-Emán

Laboratorio de Biología y Conservación de Aves, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. jorge.perez@ciens.ucv.ve

Conocer el sexo de individuos en poblaciones de aves silvestres es de gran interés para la realización de estudios ecológicos, evolutivos y de comportamiento, además de ser crítico en programas de conservación y manejo sustentable. Sin embargo, su determinación en especies en las cuales la hembra y el macho exhiben plumajes similares (i.e. especies sexualmente monocromáticas), así como en estadios juveniles o inmaduros, es difícil o incluso imposible de realizar. La mayoría de los métodos disponibles hoy día presentan una serie de desventajas o únicamente permiten la identificación del sexo de individuos adultos. La observación de conductas o caracteres asociados a un sexo en particular (Ejm cortejo, “parche” de incubación) sólo es posible si el estudio es realizado durante la época reproductiva y la inspección por laparotomía requiere de equipos especializados. Por otro lado, el uso de métodos morfométricos permite el sexado de un porcentaje de la población y la disección y observación directa de las gónadas requiere la colecta de individuos (Stutchbury y Robertson 1987, Piper y Wiley 1991, Gunnarsson 2006).

El descubrimiento del gen aviar CHD (*Chromohelicase-DNA binding*, por sus siglas en inglés), ligado a los cromosomas sexuales (Griffiths y Tiwari 1993), hizo posible determinar con mayor eficiencia el sexo de individuos en un procedimiento no letal, usando una muestra de sangre o pluma. A diferencia de los mamíferos, en la mayoría de las aves las hembras son heterogaméticas (ZW) y los machos homogaméticos (ZZ). Por lo tanto, al realizar una reacción de cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando un par de cebadores que amplifican partes homólogas de los genes CHD-W y CHD-Z, y que incorporan intrones que difieren en longitud, se pueden visualizar en un gel de electroforesis dos fragmentos amplificados en el caso de las hembras (CHD-W y CHD-Z) y un solo fragmento en los machos (CHD-Z) (Griffiths *et al* 1998).

El objetivo de este trabajo fue utilizar herramientas moleculares para identificar el sexo de dos especies de cucaracheros presentes en Venezuela, *Henicorhina leucophrys* y *H. leucosticta*, especies en las que el color y patrón del plumaje no varía entre los sexos (Hilty 2003). Inicialmente, se buscó sexar

a los individuos por medio de pares de cebadores conocidos, utilizados en una gran diversidad de aves (i.e. P2/P8, 1237L/1272H y 2550F/2718R) (Griffiths *et al* 1998, Kahn *et al* 1998, Fridolfsson y Ellegren 1999). Sin embargo, en estos ensayos no se obtuvieron bandas diferenciables en ninguno de los gels de electroforesis. Como consecuencia, realizamos el sexado molecular de muestras de tejido muscular con cebadores y protocolos utilizados previamente en *Henicorhina leucophrys* por Dingle (2009). Esta autora determinó el sexo de los individuos a través de su comportamiento (Ejm. canto), por lo que en este estudio buscamos validar la técnica mediante el uso de ejemplares de museo, previamente sexados por inspección directa de las gónadas. Adicionalmente, incorporamos muestras de plumas y cojinete plantar para observar la efectividad del método con este tipo de muestras.

Un total de 52 muestras de *H. leucophrys*, incluyendo 45 muestras de tejido muscular, seis plumas y un cojinete, fueron sexados molecularmente. El 71% de las muestras de tejido (32 de 45), al igual que el cojinete plantar, correspondían a individuos de sexo conocido (24 machos y nueve hembras). Igualmente, se incluyeron las dos únicas muestras disponibles de tejido muscular de *H. leucosticta*, de individuos de sexo conocido, con el objetivo de evaluar por primera vez la técnica del sexado molecular en esta especie. Las muestras incluidas en este estudio provienen en su totalidad de la Colección Ornitológica Phelps y del Laboratorio de Biología y Conservación de Aves del Instituto de Zoología y Ecología Tropical. La extracción de ADN se realizó con el método de Fenol-Cloroformo (Sambrook y Russell 2001). Las reacciones de PCR se realizaron usando un volumen total de 20 µL, el cual consistió de 4 µL de ADN genómico; 0,4 µL de dNTP's; 0,2 µL de GoTaq® Flexi DNA polymerase (Promega); 4 µL de 5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (Promega) y 0,4 µL de cada uno de los cebadores 2550F (5'GTTACTGATTCGCTACGAGA; Fridolfsson y Ellegren 1999) y MSZ1R (5'ATCCATCAAGTCTCTAAAGAG; Sehgal *et al* 2005). La combinación de estos cebadores permite obtener dos productos de PCR para hembras (600 y 450 pares de bases (pb), respectivamente) y un solo producto

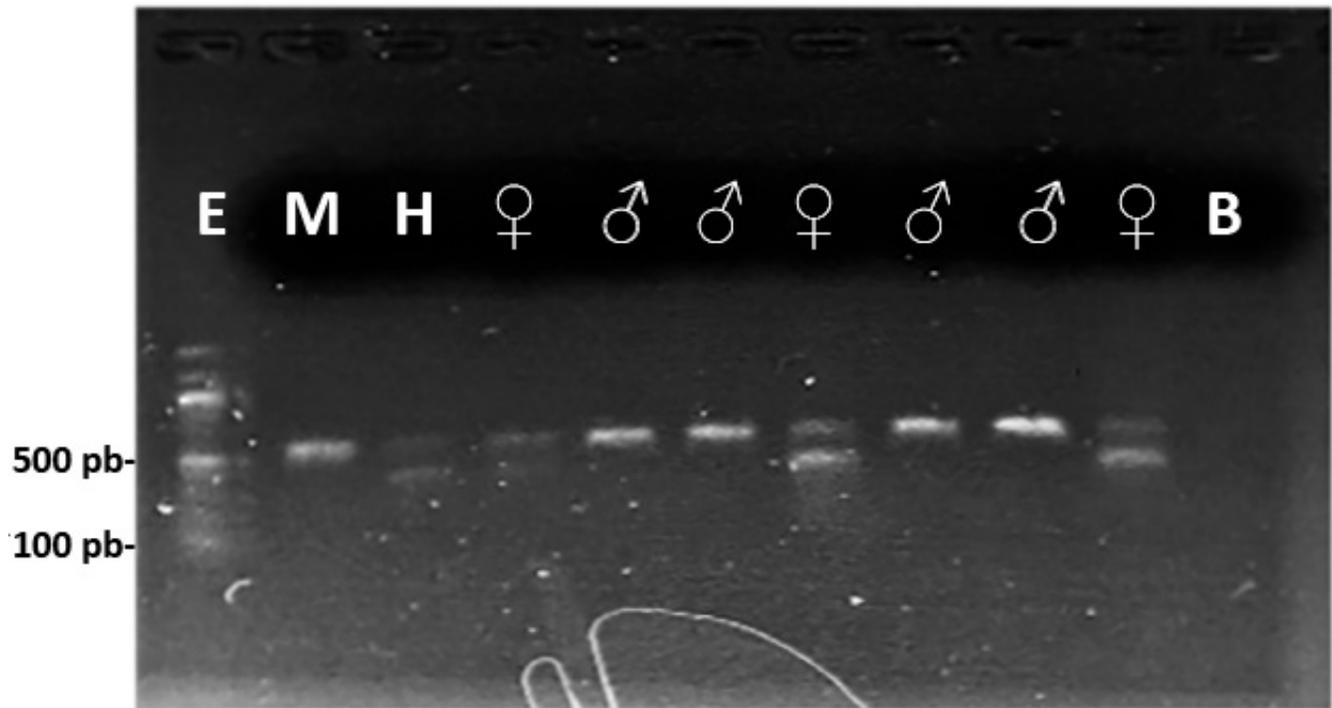


FIGURA 1. Verificación del sexo de ejemplares de *Henicorhina leucophrys* por medio de electroforesis de productos de PCR con los cebadores 2550F/MSZ1R. Los símbolos ♀ (hembra) y ♂ (macho) muestran el sexo conocido del ejemplar. Se indican el marcador de peso molecular o escalera (E; 100 pb), los controles positivos: macho (M) y hembra (H) de sexos conocidos, y el blanco o control negativo (B). El mismo patrón de bandas se obtuvo para *H. leucosticta*.

para machos (600 pb) (Fridolfsson y Ellegren 1999, Cruz-Bernate *et al* 2013). El protocolo de amplificación incluyó una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C por tres minutos y, posteriormente, 35 ciclos de 94°C de desnaturalización por 30 s., 54°C de alineamiento por 30 s. y 72°C por 45 s., culminando en una extensión de 10 min. a 72°C (Dingle 2009). Los productos de PCR (4 µL) se visualizaron en un gel de agarosa al 1% utilizando SYBR® Safe junto con 3 µL de 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega).

El método molecular nos permitió confirmar el sexo de la totalidad (100%) de los ejemplares previamente sexados ( $n=35$ , incluyendo el cojinete plantar y las muestras de *H. leucosticta*), observándose en todos los casos dos bandas en los ejemplares hembra y una banda en los machos (Fig 1). Es importante resaltar que las muestras de *H. leucosticta* son las primeras de esta especie en las que el sexo es determinado usando estos cebadores. Igualmente, la amplificación y observación de bandas definidas se observó en las muestras de plumas analizadas.

Este estudio permitió generar información sobre el sexo de ejemplares depositados en la Colección Ornitológica Phelps en los cuales no se observaron las gónadas en el momento de su preparación como pieles de estudio ( $n=13$ ). Por otra parte, el uso de herramientas moleculares en material de museo (Ejm cojinetes plantares) permitiría identificar el sexo de ejemplares en los que se sospeche la presencia de

errores en la transcripción o en la asignación misma del sexo (Parkes 1989, Knox y Walters 1992, Bantock *et al* 2008). Adicionalmente, el estudio de patrones de dimorfismo sexual, así como de comportamiento, se benefician con el uso de esta técnica molecular. En el caso particular del dimorfismo sexual de tamaño, con los ejemplares sexados en este estudio logramos incrementar el número de muestras para realizar análisis morfométricos en *H. leucophrys* y, con ello, disminuir la incertidumbre de modelos generados en análisis discriminantes y regresiones logísticas (Machado-Stredel y Pérez-Emán en preparación). Así mismo, el sexado molecular es una herramienta de utilidad en el estudio de zonas potenciales de contacto o hibridación entre especies o poblaciones diferenciadas de una especie, utilizando tanto material de museo (colectado en diferentes épocas) como muestras de sangre o plumas obtenidas en el campo sin sacrificar ejemplares, lo que permite el estudio de procesos evolutivos a lo largo del tiempo.

#### AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Margarita Martínez y Miguel Lentino por toda la ayuda brindada en la revisión de datos y ejemplares de la Colección Ornitológica Phelps. A Luis Gonzalo Morales por revisar una versión preliminar de este manuscrito. Así mismo, deseamos dar un especial reconocimiento a Arlés Urrutia, por todo lo aprendido durante la pasantía de AMFF, FMS

y MC en la Unidad de Ecología Genética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

#### LISTA DE REFERENCIAS

- Bantock TM, RP Prys-Jones y PLM Lee. 2008. New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Molecular Ecology* 8: 519–528
- Cruz-Bernate L, Y Riascos y G Barreto. 2013. Dimorfismo sexual y determinación del sexo con DNA en el Pellar Común (*Vanellus chilensis*). *Ornitología Neotropical* 24: 433–444
- Dingle C. 2009. Function and evolution of song in a duetting neotropical passerine, the Gray-breasted Wood-Wren (*Henicorhina leucophrys*). Tesis Doctoral, Universidad de Cambridge, Cambridge, UK
- Fridolfsson AK y H Ellegren. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116–121
- Griffiths R y B Tiwari. 1993. The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 8324–8326
- Griffiths R, M Double, K Orr y RJ Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071–1075
- Gunnarsson TG, JA Gill, SL Goodacre, G Gélinaud, PW Atkinson, GM Hewitt, PM Potts y WJ Sutherland. 2006. Sexing of Black-tailed Godwits *Limosa limosa islandica*: a comparison of behavioural, molecular, biometric and field-based techniques. *Bird Study* 53: 193–199
- Hilty SL. 2003. Birds of Venezuela. Princeton University Press, Princeton, USA
- Kahn N, J St John y T Quinn. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115: 1074–1078
- Knox AG y MP Walters. 1992. Under the skin: the bird collections of the Natural History Museum. *Bulletin of the British Ornithologist's Club* 112: 169–190
- Parkes KC. 1989. Sex ratios based on museum collections: a caution. *Colonial Waterbirds* 12: 130–131
- Piper WH y RH Wiley. 1991. Effects of laparotomies on wintering White-throated Sparrows and the usefulness of wing chord as a criterion for sexing. *Journal of Field Ornithology* 62: 40–45
- Sambrook J y DW Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3<sup>rd</sup> ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, UK
- Sehgal RN, HI Jones y TB Smith. 2005. Molecular evidence for host specificity of parasitic nematode microfilariae in some African rainforest birds. *Molecular Ecology* 14: 3977–3988
- Stutchbury BJ y RJ Robertson. 1987. Two methods of sexing adult Tree Swallows before they begin breeding. *Journal of Field Ornithology* 58: 236–242