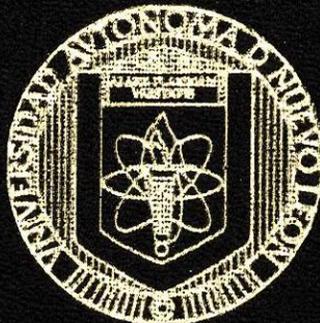


90

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"SEXADO MOLECULAR DE AVES SUJETAS A  
PROTECCION ESPECIAL, AMENAZADAS O EN  
PELIGRO DE EXTINCION DE LAS FAMILIAS  
PSITTACIDAE Y CRACIDAE, Y DE IMPORTANCIA  
ECONOMICA DE LA FAMILIA STRUTHIONIDAE"

TESIS  
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR  
AL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA:  
ARACELY GARCIA GARCIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
DICIEMBRE DEL 2001

**TL**

**QL996**

**.P7**

**G3**

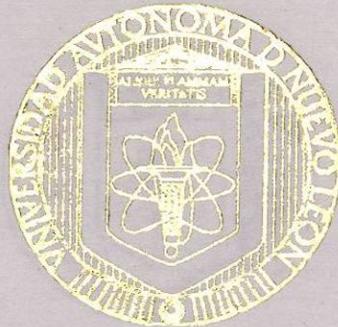
**2001**

**c.1**



1080117226

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“SEXADO MOLECULAR DE AVES SUJETAS A  
PROTECCION ESPECIAL, AMENAZADAS O EN  
PELIGRO DE EXTINCION DE LAS FAMILIAS  
PSITTACIDAE Y CRACIDAE, Y DE IMPORTANCIA  
ECONOMICA DE LA FAMILIA STRUTHIONIDAE”

TESIS  
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR  
AL TITULO DE BIÓLOGO

PRESENTA:

ARACELY GARCIA GARCIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
DICIEMBRE DEL 2001

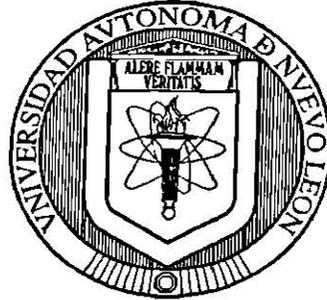


TL  
QL496  
- P7  
G3  
2000



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“SEXADO MOLECULAR DE AVES SUJETAS A PROTECCIÓN ESPECIAL,  
AMENAZADAS Ó EN PELIGRO DE EXTINCIÓN DE LAS FAMILIAS  
PSITTACIDAE Y CRACIDAE, Y DE IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA  
FAMILIA STRUTHIONIDAE”**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ARACELY GARCÍA GARCÍA**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L**

**DICIEMBRE 2001**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“SEXADO MOLECULAR DE AVES SUJETAS A PROTECCIÓN ESPECIAL,  
AMENAZADAS Ó EN PELIGRO DE EXTINCIÓN DE LAS FAMILIAS  
PSITTACIDAE Y CRACIDAE, Y DE IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA  
FAMILIA STRUTHIONIDAE”**

**TESIS**

**QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ARACELY GARCÍA GARCÍA**

**COMISIÓN DE TESIS:**

**M.C. Antonio Guzmán Velasco  
PRESIDENTE**

**Dr. Roberto Montes de Oca Luna  
SECRETARIO**

**M.C. Carlos Humberto Leal Garza  
VOCAL**

**Dr. José Ignacio González Rojas  
SUPLENTE**

*Antonio Guzmán Velasco*  
*Roberto Montes de Oca Luna*  
*Carlos Humberto Leal Garza*  
*José Ignacio González Rojas*

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.**

**DICIEMBRE 2001**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rafael Abel y María de Jesús por la confianza y el apoyo que me han brindado, así como por las enseñanzas y valores que me inculcaron...

A mis hermanos Marisol, Juan de Dios y Rafael, por su apoyo y compañía...

Al M.C. Antonio Guzmán Velasco y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por darme la oportunidad de realizar este proyecto de tesis, por la dirección y asesoría durante la misma, así como por su paciencia y conocimientos transmitidos.

Al M.C. Carlos Humberto Leal Garza y la Dra. Odila Saucedo Cárdenas, por su asesoría en este trabajo y al Dr. José Ignacio González Rojas por sus atenciones y por formar parte de la comisión de tesis.

Al Biol. Luis G. Bermúdez Humarán por enseñarme los aspectos esenciales al inicio de este trabajo, y por sus consejos e interés durante el desarrollo del mismo.

A los maestros que no sólo se preocuparon por enseñarnos Biología, sino que compartieron una amistad con nosotros y formaron una parte importante en nuestra formación, en especial al M.C. Gerardo Guajardo y al Biol. Javier Jaime Hinojosa.

A Marianela Peralta Obregón, Iris Esmeralda García Vázquez e Indhira Arlaee Díaz Villanueva, por su apoyo y por su valiosa amistad...

A mis compañeros y amigos de generación, por los gratos momentos compartidos durante la carrera de Biología.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Humberto Rodríguez., Deyanira Quistián, Arnulfo Villanueva, M.C. Analí Gámez, Pablo Chávez, Q.B.P. Naima Cortéz, Biol. Jorge Gómez, Areli Herrera, y Abraham Castro, por su valiosa ayuda, consejos y amistad...

Al Parque Zoológico La Pastora, en especial a la Dra. Patricia Flores; al Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro; así como al Médico Nelson Manzanares y al Ing. Sergio Estrada, del Centro de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Forestales, por proporcionarnos las muestras que se analizaron en el presente trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por su apoyo otorgado a través del Programa PAICYT.

## **ÁREA DE TRABAJO**

*El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología con apoyo del Laboratorio de Ornitología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del M.C. Antonio Guzmán Velasco y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna, y la Co-dirección del M.C. Carlos Humberto Leal Garza y la Dra. Odila Saucedo Cárdenas.*

## ÍNDICE

Agradecimientos	i
Área de trabajo	iii
Lista de abreviaturas	viii
Lista de tablas	xii
Lista de figuras	xiii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	
Familia Psittacidae	4
Familia Cracidae	7
Familia Struthionidae	10
Métodos de sexado	13
1. Cirugía	13
2. Cloacal	14
3. Citológico	15
4. Molecular	16
4.1. Sexado molecular mediante la amplificación y digestión del marcador molecular CHD.	18
4.2. Sexado molecular mediante la amplificación del marcador molecular CHD con intrón.	19
4.3. Sexado molecular de la Familia Cracidae.	20
4.4. Sexado molecular de la Familia Struthionidae.	20

2.2.	Amplificación de los marcadores moleculares CHD-W y CHD-Z con intrón en integrantes de las Familias Psittacidae y Cracidae	33
2.2.1.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%	33
2.3.	Amplificación de marcadores moleculares ligados al cromosoma W específicos para la Familia Struthionidae	33
3.	Clonación y secuenciación de los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae	34
3.1.	Ligación de los marcadores moleculares CHD con intrón al vector	35
3.2.	Transformación de bacterias con los plásmidos recombinantes	37
3.3.	Aislamiento de DNA plasmídico	38
3.4.	Digestión de los plásmidos recombinantes	39
3.5.	Purificación de DNA plasmídico	40
3.6.	Secuenciación de los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae	40

## Resultados

1.	Aislamiento de DNA genómico de integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae a partir de sangre y/o pluma	41
----	---	----

2. Sexado de integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae, por amplificación de marcadores moleculares ligados a los cromosomas sexuales	42
2.1. Sexado de psitácidos por medio de PCR-RFLP's	42
2.2. Sexado de psitácidos por medio de la amplificación de los marcadores moleculares CHD con intrón	43
2.3. Sexado de crácidos por medio de la amplificación de los marcadores moleculares CHD con intrón	44
2.4. Sexado de crácidos por medio de PCR-RFLP's	45
2.5. Sexado de la Familia Struthionidae por PCR múltiple	47
3. Secuencias de los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae	49
Discusiones	54
Conclusiones	57
Referencias	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AFLP	Polimorfismos por longitud de fragmentos amplificados
C	Citosina
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
<i>Ddel</i>	Endonucleasa de restricción obtenida de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Trifosfato de Desoxinucleósidos
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
G	Guanina
gr	Gramos
<i>HaeIII</i>	Endonucleasa de Restricción obtenida de <i>Haemophilus aegyptius</i>
HCl	Ácido Clorhídrico
IPTG	isopropiltiol- $\beta$ -D-galactosido
Kb	Mil pares de bases
KCl	Cloruro de Potasio
Kg	Kilogramo

LB	Luria-Bertani
M	Concentración Molar
m	Metro
mg	Miligramos
MgCl <sup>2+</sup>	Cloruro de Magnesio
mm	Milímetro
ml	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	Nanogramos
<i>NlaIII</i>	Endonucleasa de Restricción obtenida de <i>Neisseria lactamica</i>
<i>NotI</i>	Endonucleasa de Restricción obtenida de <i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la <i>Polimerasa</i>
pH	Medida estándar de la acidez relativa, matemáticamente igual a – log [H <sup>+</sup> ]
PSA	Persulfato de Amonio

<i>PvuII</i>	Endonucleasa de Restricción obtenida de <i>Proteus vulgaris</i>
RAPD	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLP	Polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción
<i>RNAsa</i>	Enzima que digiere el Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
T	Timina
TAE	Tris-Ácido Acético-EDTA
<i>Taq</i>	<i>DNA polimerasa</i> obtenida de <i>Thermus aquaticus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de DNA.
TE	Regulador Tris-EDTA
TEMED	N, N,N,N-Tetrametiletilendiamina
Tris	Tris-hidroxi-metil aminometano
TSNT	Tritón, SDS, NaCl, Tris-HCl
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volts

X	Veces la concentración
X-GAL	5-bromo-4 cloro-3 indolil-B-D- galactósido
µg	Microgramos
µl	Microlitros

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1. Especies de psitácidos con las que cuenta el Parque Zoológico La Pastora y su categoría de protección según la NOM-Ecol-059-1994.</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2. Especies de crácidos con las que cuenta el Parque Zoológico La Pastora y su categoría de protección según la NOM-Ecol-059-1994.</b>	<b>8</b>
<b>Tabla 3. Ubicación geográfica y subespecies del avestruz.</b>	<b>11</b>
<b>Tabla 4. Especies de aves analizadas en este estudio.</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 5. Endonucleasas de restricción utilizadas en el estudio.</b>	<b>26</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Especies de la Familia Psittacidae.</b>	6
<b>Figura 2. Especies de la Familia Cracidae.</b>	9
<b>Figura 3. Familia Struthionidae.</b>	12
<b>Figura 4. Mapa circular de los vectores pGEM<sup>®</sup>-T, pBluescript II SK, y pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>.</b>	36
<b>Figura 5. DNA genómico de algunas especies de crácidos.</b>	41
<b>Figura 6. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD de tres especies de psitácidos.</b>	42
<b>Figura 7. Digestión enzimática con Ddel de los marcadores moleculares CHD de la especie <i>Aratinga holochlora</i>.</b>	43
<b>Figura 8. Identificación del sexo de varias especies de psitácidos a través de la amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD con intrón.</b>	44
<b>Figura 9. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD con intrón de varias especies de crácidos.</b>	45
<b>Figura 10. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD de varias especies de crácidos.</b>	46
<b>Figura 11. Identificación del sexo de especies de crácidos por medio de enzimas de restricción.</b>	46
<b>Figura 12. Determinación de la temperatura óptima de amplificación para el sexado de <i>Struthio camelus</i>.</b>	48
<b>Figura 13. Identificación del sexo de <i>Struthio camelus</i> por PCR múltiple.</b>	48
<b>Figura 14. Identificación de las clonas recombinantes que poseen los marcadores moleculares CHD.</b>	50
<b>Figura 15. Identificación de las clonas recombinantes que poseen los marcadores moleculares CHD.</b>	50
<b>Figura 16. Identificación de las clonas recombinantes que poseen los marcadores moleculares CHD.</b>	51
<b>Figura 17. Secuenciación del marcador molecular CHD de <i>Crax rubra</i> y <i>Penelope purpurascens</i>.</b>	52
<b>Figura 18. Comparación de la secuencia nucleotídica de los marcadores A) CHD-W y B) CHD-Z de <i>Gallus domesticus</i>, <i>Oreophasis derbianus</i>, <i>Crax rubra</i>, <i>Penelope purpurascens</i> y <i>Ara militaris</i>.</b>	53

## RESUMEN

El problema principal en los programas de reproducción en cautiverio, para la conservación de aves amenazadas o en peligro de extinción, es la ausencia de dimorfismo sexual, es decir que su fenotipo exterior es similar (monomorfismo) y no se puede distinguir entre el macho y la hembra, lo cual es crítico para el establecimiento de parejas para el apareamiento en cautiverio. Los métodos de sexado más precisos, pero con mayor riesgo, eran los quirúrgicos, hasta que recientemente la tecnología molecular identificó marcadores moleculares ligados a los cromosomas sexuales y facilitó este proceso. En el presente trabajo se implementaron dos procedimientos de sexado molecular para la distinción del sexo en varias especies monomórficas de la Familia Psittacidae basados en la amplificación del gen CHD (chromodomain-helicase-DNA-binding protein). En un trabajo paralelo determinamos que *Oreophasis derbianus*, ave endémica de México, mostró una secuencia génica muy particular en el gen CHD y por ende el procedimiento de sexado varió con relación al de las demás aves. En este trabajo extendimos este estudio al análisis de otras especies pertenecientes a esta misma Familia (Cracidae), encontrando que tienen un patrón similar al de *Oreophasis derbianus*, lo cual resulta interesante ya que podemos utilizar esta estrategia y estos resultados para determinar en que momento de la evolución apareció la Familia Cracidae dentro del Orden Galliformes. Por otro lado, en este mismo trabajo se implementó una metodología para el sexado molecular de un ave de importancia económica: el avestruz. El sexado de esta ave es importante para la identificación y venta de parejas antes de los 14 meses de edad, que es cuando aún no se puede diferenciar el sexo de los individuos. Este sexado molecular se logró utilizando marcadores específicos para el cromosoma W de esta especie de la Familia Struthionidae.

## INTRODUCCIÓN

La progresiva invasión y destrucción de los hábitats naturales, la contaminación del medio ambiente, la sobreexplotación, la cacería y el tráfico ilegal de especies silvestres, causados por el hombre, son las principales causas que están limitando la supervivencia de los ecosistemas llevando a muchas especies a la extinción. Las prácticas del hombre en agricultura, tala inmoderada de bosques, pesca y manejo de agua no son sostenibles para el ambiente y la biodiversidad.

Si el hombre no llevara a cabo este tipo de actividades que rompen el equilibrio ecológico, la proporción del proceso natural de extinción y de sustitución en el sentido de la propia evolución, sería según el archivo fósil de una especie por siglo. Sin embargo, esto está muy lejos de la realidad. Tan sólo en el caso de las aves, se estima que alrededor de 1 200 especies enfrentan un verdadero riesgo de extinguirse en los próximos 100 años. Además, otras especies podrían fácilmente sumarse a la lista de aves amenazadas. Existen cifras que indican que la tasa de extinción se ha incrementado 40 veces en los últimos dos siglos.

Tan solo en el caso de las aves, México se encuentra entre los países que tiene más especies amenazadas, siendo éstas alrededor de 50. Esta situación es preocupante, ya que el impacto que estamos causando en el ambiente cada vez es más destructivo y no sostenible, y la humanidad depende

de la biodiversidad y de los recursos naturales; el uso sostenible es crucial a la calidad de vida.

Las estadísticas son alarmantes, sin embargo, aún es posible evitar, en este caso, la extinción de la enorme riqueza de avifauna que poseemos implementando estrategias para moderar la explotación de los recursos naturales, identificar y proteger las áreas importantes para las aves (sitios críticos para su conservación), mantener y restablecer la calidad y extensión de los hábitats naturales, conscientizar y obtener el apoyo de la gente, así como establecer programas de reproducción en cautiverio para incrementar las poblaciones.

Para alcanzar estas expectativas, se han fundado diversas organizaciones cuya finalidad es la conservación de especies de aves en peligro de extinción, así como de sus hábitats naturales. La drástica reducción de poblaciones de infinidad de especies de aves ha dado pie al establecimiento de programas de reproducción en cautiverio; sin embargo, el principal problema para esto es que el 60% de las aves son monomórficas y es necesario hacer uso de técnicas de sexado para establecer parejas.

Por tal motivo, la finalidad de este estudio es contribuir y apoyar los programas de reproducción de aves monomórficas en cautiverio, principalmente especies que se encuentran en alguna categoría de protección, empleando técnicas de sexado confiables, rápidas y accesibles, así como lo menos estresante posible para las aves.

## **ANTECEDENTES**

### **FAMILIA PSITTACIDAE**

Es la única Familia del Orden Psittaciformes, cuyos representantes constituyen un grupo homogéneo con caracteres muy marcados que permiten diferenciarlos sin dificultad de las demás Familias y Órdenes de aves existentes.<sup>1</sup>

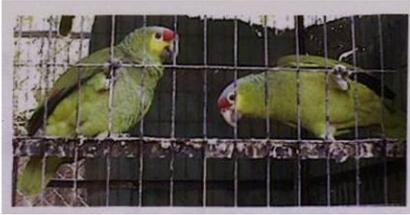
El tamaño de los integrantes de esta familia oscila entre los 10 y 85 cm de longitud. Entre sus rasgos más distintivos se puede nombrar la presencia de un pico corto, globoso, muy fuerte y ganchudo, conspicuamente doblado hacia abajo con la mandíbula superior sobrepasando a la inferior. En la base presenta una cera carnosa, a veces cubierta parcialmente de plumas. Son de cuello corto y cuerpo compacto. Sus alas, por lo general son cortas, redondeadas y accionadas por una poderosa musculatura. La longitud de la cola es muy variable con relación al cuerpo, en algunos psitácidos resulta sumamente corta, mientras que en otros es proporcionalmente larga. Su hermoso plumaje brillante comprende una extraordinaria gama de colores. Los dedos presentan una disposición cigodáctila, es decir, dos dirigidos hacia adelante y dos hacia atrás (Figura 1).<sup>1</sup>

Este grupo comprende alrededor de 82 géneros que se disgregan en aproximadamente 340 especies, cuya distribución abarca todas las regiones tropicales del planeta. Su diversificación ecológica es impresionante. Además, salvo notables excepciones, no presentan dimorfismo sexual.<sup>1</sup>

Lamentablemente, hoy en día sabemos que las poblaciones de psitácidos están disminuyendo progresivamente. Sin embargo, existen instituciones que apoyan los programas de reproducción en cautiverio. Entre algunos de los parques zoológicos de nuestro entorno, se encuentra La Pastora. Esta institución cuenta con diversas especies de aves, entre ellas de psitácidos (Tabla 1), y están interesados en la conservación de las mismas. Por tal motivo, se han sumado para contribuir con nuestros esfuerzos en pro de la conservación por medio de este estudio, ya que la ausencia de dimorfismo sexual es característica en un importante porcentaje de la avifauna.

**Tabla 1.** Especies de psitácidos con las que cuenta el Parque Zoológico La Pastora y su categoría de protección según la NOM-Ecol-059-1994.

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Categoría de protección</b>
<i>Amazona</i>	<i>autumnalis</i>	Loro de mejilla amarilla	
<i>Amazona</i>	<i>oratrix</i>	Loro cabeza amarilla	En peligro de extinción
<i>Ara</i>	<i>macao</i>	Guacamaya roja aliamarilla	En peligro de extinción
<i>Ara</i>	<i>militaris</i>	Guacamaya militar/guacamaya verde	En peligro de extinción
<i>Aratinga</i>	<i>canicularis</i>		
<i>Aratinga</i>	<i>holochlora</i>	Perico mexicano	Amenazada endémica
<i>Cyanoliseus</i>	<i>patagonius</i>	Guacamaya argentina/loro barranquero	
<i>Rhynchopsitta</i>	<i>pachyrhyncha</i>	Cotorra serrana occidental	En peligro de extinción



*Amazona autumnalis*



*Aratinga canicularis*



*Amazona oratrix*



*Rhynchopsitta pachyrhyncha*



*Ara militaris*



*Ara macao*

**Figura 1. Especies de la Familia Psittacidae**

## FAMILIA CRACIDAE

Ésta es una de las seis Familias que integran el Orden Galliformes. <sup>3, 4</sup>

Cabe señalar que los Órdenes Galliformes y Anseriformes divergieron tempranamente de otras aves neognatas, las cuales radiaron a más de 9 000 especies de aves acuáticas y terrestres. <sup>5</sup>

Los crácidos son los galliformes más primitivos, menos estudiados y que filogenéticamente se disgregan más del resto de las Familias de este Orden. <sup>3, 4</sup>

El índice de reproducción de esta familia es el más bajo de todos los galliformes, y puede asegurarse que en conjunto, ninguna otra familia de aves mexicanas está desapareciendo con mayor rapidez. <sup>3</sup>

Los crácidos son aves de tamaño mediano a muy grande. Predominan los tonos negros a veces con blanco, aunque algunas especies son pardas. El plumaje varía entre las diferentes especies y está adaptado a las condiciones ambientales en que viven. Poseen grandes y fuertes extremidades posteriores, el dedo posterior está bien desarrollado y se encuentra a la misma altura de los tres dedos delanteros, lo cual favorece su desplazamiento arbóreo. Sus alas son cortas y la cola larga y redondeada. En esta familia se presentan estructuras anatómicas que las diferencian completamente, no sólo de otros galliformes, sino de cualquier otra familia de aves. El pico es corto y robusto. Los adultos poseen estructuras características en la cabeza y la cara, como son la carúncula, la cera, y la barbilla, que varían de tamaño, color y forma, según la

especie. La tráquea presenta modificaciones muy pronunciadas, ya que aparece curvada, doblada y larga (Figura 2).<sup>3,4</sup>

Los crácidos son exclusivos de la región neotropical americana, cuya distribución está comprendida desde el Sur de Estados Unidos, Tamaulipas y el Sur de Sonora hasta Paraguay, y el Norte de Argentina.<sup>3</sup>

Los últimos reductos de *Crax rubra* y *Penelope purpurascens* en México son las selvas Lacandona en Chiapas y la región boscosa de la Península de Yucatán, desgraciadamente cada día se ven más afectados por la destrucción que causa el hombre. Con respecto a las chachalacas mexicanas, tienen una mayor distribución geográfica y menores exigencias de hábitat; sin embargo, están comenzando a desaparecer de muchas partes.<sup>3</sup>

*Crax rubra* está catalogada como especie amenazada, *Penelope purpurascens* está sujeta a protección especial, *Penelopina nigra* se encuentra en peligro de extinción, al igual que *Oreophasis derbianus*<sup>2</sup>, y si no se pone un alto a la destrucción de hábitats, *Ortalis vetula*, puede entrar en una de estas categorías.<sup>3</sup>

**Tabla 2.** Especies de crácidos con las que cuenta el Parque Zoológico La Pastora y su categoría de protección según la NOM-Ecol-059-1994.

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Categoría de protección</b>
<i>Crax</i>	<i>rubra</i>	Hocofaisán	Amenazada
<i>Penelope</i>	<i>purpurascens</i>	Pava cojolita	Sujeta a protección especial
<i>Penelopina</i>	<i>nigra</i>	Pajuil, guán negro	En peligro de extinción
<i>Ortalis</i>	<i>vetula</i>	Chachalaca vetula	

En la actualidad, se tienen indicios de la reproducción en cautiverio de algunos crácidos. Sin embargo, en especies como *Penelope purpurascens* y *Ortalis vetula*, al igual que en *Oreophasis derbianus*, hay dificultad en ello, ya que no presentan dimorfismo sexual. <sup>3</sup>



*Crax rubra*



*Penelopina nigra*



*Ortalis vetula*

**Figura 2. Especies de la Familia Cracidae**

## FAMILIA STRUTHIONIDAE

El avestruz es el único integrante de esta familia, pertenece al grupo de las aves corredoras que no pueden volar (Subclase Ratites). Es el ave más grande del mundo superando los 2.5 m de altura así como los 150 kg de peso. Presentan una gran capacidad de adaptación, lo cual ha permitido su reproducción en cautiverio.<sup>6, 7</sup>

Estas aves son originarias de África, en donde su comercio comenzó hace más de 150 años.<sup>7</sup> Hoy en día, el establecimiento de criaderos de avestruces se está incrementando en diversas partes del mundo. Su explotación comercial ha adquirido gran importancia ya que se puede aprovechar prácticamente todo de estas aves. En un principio se explotaron sus plumas por su belleza, ahora son utilizadas para fabricar sacudidores; posteriormente su piel, muy suave, resistente y elegante utilizada en la confección de artículos de lujo; y recientemente su carne, apreciada por su sabor y propiedades nutricionales ya que es carne roja baja en calorías, grasa, colesterol y sodio. En sus países de origen el huevo de avestruz es consumido, uno solo equivale a 12 huevos de gallina; además, son apreciados por su textura porcelanosa, tamaño y belleza para desarrollar artesanías. Las pestañas se utilizan para fabricar brochas finas, y el pico y las uñas se emplean en joyería.<sup>6</sup>

Los avestruces presentan dimorfismo sexual al alcanzar los 14 meses de edad.<sup>6</sup> El plumaje del tronco es negro brillante en los machos, mientras las plumas de las alas y la cola son blancas. Las hembras son más pequeñas y su

colorido es predominantemente parduzco. El color de las partes desnudas, es en general rojo carne o rosado en los machos y gris parduzco en las hembras, y varía según las subespecies (Figura 3).<sup>7</sup>

Las subespecies que existen se conocen como: cuello rojo, cuello azul y negra africana (Cuadro 3), siendo la de cuello rojo poco utilizada en explotaciones comerciales debido a su temperamento agresivo y a un menor volumen de carne y piel respecto de las otras dos subespecies.<sup>6, 7</sup>

**Tabla 3.** Ubicación geográfica y subespecies del avestruz.

Subespecie	Localización	Conocida como:
<i>S. c. camelus</i>	En vías de extinción; al noreste de Etiopía, en el Sudán, y uno que otro espécimen en Senegal.	
<i>S. c. massajcus</i>	En Kenya y Tanzania.	Cuello rojo
<i>S. c. molybdophanes</i>	En África tropical del Este (Somalia, Etiopía y Kenya).	Cuello azul
<i>S. c. australis</i>	En Namibia, Botswana, Sudáfrica y Sur de Australia.	Cuello azul
<i>S. c. syriacus</i>	Extinta; habitaba en Siria y Arabia.	Cuello rojo
<i>S. c. domesticus</i>	Híbrido de las subespecies nor-africana, de Siria y Sudafricana. Técnicamente es una raza.	Negra africana

En la actualidad, cada avestruz que ha alcanzado la madurez sexual, es decir, alrededor de los 3-3½ años de edad, ya sea macho o hembra, está cotizado para su venta en \$16,000; a los 12 meses de edad su valor es de \$5,000.<sup>8</sup> De tal forma que mientras más jóvenes sean, su costo se reduce. Sin

embargo, la determinación sexual es indispensable para su venta. Para ello se requiere emplear técnicas de sexado en etapas previas a los 14 meses de edad, que es cuando no hay diferencia morfológica visible entre macho y hembra.

Por lo general, los avestruces son sexados desde los cuatro días de nacidos examinando los órganos sexuales por palpación. <sup>6</sup> Método que pretende sustituirse con una técnica más confiable.

Recientemente se han retomado investigaciones a nivel cromosómico en el grupo de las ratites con el fin de establecer una tecnología molecular que permita diferenciar los sexos y reemplazar con ella las técnicas convencionales de sexado que provocan estrés en las aves.



A) Hembra



B) Macho



C) Polluelos

*Struthio camelus*

**Figura 3. Familia Struthionidae: A) Hembra, B) macho, y C) polluelos**

## MÉTODOS DE SEXADO

La inhabilidad de los investigadores para determinar con seguridad el sexo de las aves ha sido uno de los principales problemas que han hecho nulos los esfuerzos para reproducirlas en cautiverio. La ausencia de dimorfismo sexual, aunado a la tendencia de las aves en cautiverio a desarrollar un patrón de comportamiento sexual anormal imitando al sexo opuesto, ha llevado a los avicultores a desarrollar métodos para el sexado.<sup>9</sup>

### 1. Cirugía.

Dentro de los métodos quirúrgicos se encuentra la laparotomía y la laparoscopia. En ambos casos se examinan directamente las gónadas. Para esto se requiere anestésiar localmente al ave y realizar una incisión en la región lateral izquierda del abdomen entre las dos últimas costillas. En la laparotomía la incisión es lo suficientemente grande para permitir la inserción de una sonda de metal que se usa para desplazar el tracto digestivo y permitir la observación de las gónadas. Éstas, son adyacentes a la espina dorsal y se encuentran justo debajo de la caja torácica. En la laparoscopia se utiliza un cable de fibra óptica, el cual es insertado para la inspección de las gónadas. Para ello sólo se requiere de una pequeña punción abdominal. Este método resulta ser exacto y económico. Ambas técnicas pueden realizarse en pocos minutos cuando se tiene experiencia en ello.<sup>3, 10, 11</sup>

Sin embargo, estos métodos no dejan de carecer de riesgo. Por ejemplo, la aplicación de la anestesia en las aves es complicada, ya que la diferencia

entre la dosis que las adormece y la que puede causarles la muerte es muy pequeña; en aves juveniles, las gónadas sufren regresión para disminuir su peso, y por consecuencia son difíciles de identificar; en las aves pequeñas que sólo pesan unos pocos gramos, la dificultad es mayor debido a la escala de la cirugía, sobre todo en el caso de los polluelos; otro posible efecto de las cirugías es la presencia de una gran hinchazón en el punto de la incisión, causada por la ruptura de sacos aéreos.<sup>3, 10</sup>

## **2. Cloacal.**

Básicamente el sexado cloacal consiste en la examinación de los órganos sexuales por palpación. La ausencia de pene y engrosamiento de la pared cloacal indica que se trata de una hembra, mientras que en el macho el pene se aprecia como un órgano de forma cónica, de apariencia hinchada y de color rojo. El clítoris de la hembra es más pequeño y lateralmente comprimido. Es un órgano rosado, no hinchado y sin vasos sanguíneos visibles. Por otro lado, se puede observar el paso de la orina o cuando defecan, ya que el pene del macho emerge al realizar estas actividades.<sup>6</sup>

Este procedimiento suele emplearse para el sexado de algunas aves, sin embargo, no siempre resulta confiable y además causa un gran estrés en las mismas.

### 3. Citológico.

El cariotipo de las aves resulta muy complejo, pues a diferencia de otros grupos de vertebrados superiores, consta de un número de cromosomas muy elevado: el rango varía de 52 a 94 cromosomas, aunque el 77% se encuentra en el rango de 76 a 84 cromosomas.<sup>9</sup>

La mayoría de los cariotipos de aves están constituidos por dos clases de cromosomas que de acuerdo a su tamaño se les ha denominado macrocromosomas y microcromosomas.<sup>9, 10</sup>

Los macrocromosomas poseen una morfología semejante a la de mamíferos, y generalmente en un cariotipo de aves sólo se consideran dentro de este grupo de seis a ocho pares. Con respecto a los microcromosomas, es difícil precisar la talla mínima para esta denominación.<sup>9, 10</sup>

El mecanismo de identificación del sexo en aves es opuesto al encontrado en mamíferos, es decir, el macho es homogamético ZZ y la hembra es heterogamética ZW. El cromosoma sexual Z corresponde a un macrocromosoma, y el W a un microcromosoma.<sup>9, 12</sup>

Los cromosomas mitóticos son de gran utilidad ya que contienen un juego completo del material genético de una célula. Para visualizar un cariotipo se puede extraer la pulpa del tejido folicular de una pluma en crecimiento, después se trata con colchicina, se añade una solución hipotónica que rompe cada una de las células, los cromosomas de un solo núcleo (en metafase) se colocan y se fijan a la superficie de una laminilla y se tiñe con algún colorante para conferir a los cromosomas un patrón de bandas C, G o Q, en este último patrón se utiliza

un colorante fluorescente llamado quinacrina que confiere a los cromosomas un aspecto de bandas cruzadas. Las bandas Q más brillantes típicamente contienen secuencias de DNA repetitivas ricas en A-T, y menor contenido de genes que codifican proteínas.<sup>3, 9, 10, 13</sup>

Sin embargo, solamente un 2% de las 9,000 especies de aves ha sido cariotipado debido a lo complicado, prolongado y costoso que resulta este proceso.<sup>9</sup>

#### **4. Molecular.**

Recientemente, la tecnología ha permitido el desarrollo de métodos más confiables, rápidos, relativamente económicos, y sobre todo que no implican ningún riesgo en las aves. Únicamente se requiere una pequeña muestra de sangre e incluso una pluma del ave de interés, por lo que el estrés causado es mínimo. A partir de esto se realiza el aislamiento de DNA y se efectúan unas pruebas con marcadores moleculares ligados a los cromosomas sexuales.

Los marcadores genéticos son simplemente caracteres heredables con múltiples estados de cada carácter. Típicamente, en organismos diploides, cada individuo puede tener uno o dos estados (alelos) diferentes por carácter (locus). Todos los marcadores genéticos reflejan diferencias en las secuencias de DNA.<sup>14</sup>

Existen varios tipos de marcadores así como métodos para su identificación. Entre las principales técnicas para generar marcadores genéticos se encuentran los RFLP's, los microsatélites, los RAPD's y los AFLP's.<sup>14, 15</sup>

En el caso de las aves, el uso de marcadores moleculares ha resultado ser una solución efectiva para diagnosticar el sexo. Como ya se mencionó, en este grupo el macho es homogamético ZZ y la hembra es heterogamética ZW. Por lo tanto, el cromosoma W es único para un sexo, por lo que su presencia o ausencia en una muestra de DNA genómico es indicativa del sexo.<sup>9, 12</sup>

Se sabe que el cromosoma W contiene pocos genes ya que es rico en heterocromatina constitutiva, la cual corresponde a DNA permanentemente silencioso y sólo se encuentra en alta densidad en el centrómero de los microcromosomas y en uno de los extremos del cromosoma Z, al menos en *Gallus domesticus*. La región heterocromática del cromosoma W consiste principalmente en DNA satélite repetitivo de replicación tardía, la cual ha sido clonada y caracterizada en pocas especies. Generalmente, uno o unos pocos tipos de este DNA satélite prevalecen dentro de cada una de las especies y las repeticiones parecen estar pobremente conservadas entre las mismas. De los pocos genes encontrados en el cromosoma W se ha encontrado una copia en el cromosoma Z; sin embargo, no son pseudoautosomales, es decir, están presentes en partes no recombinantes de los dos tipos de cromosomas sexuales y muestran un alto grado de similitud en su secuencia.<sup>16</sup>

#### 4.1. Sexado molecular mediante la amplificación y digestión del marcador molecular CHD.

Inicialmente, un grupo de investigadores identificó un gen altamente conservado en *Gallus domesticus*, el cual parecía estar ligado al cromosoma W en todas las aves, con la posible excepción de las aves ratites. Posteriormente, descubrieron que existía un segundo gen bastante conservado en otra parte del genoma. Utilizaron unos oligonucleótidos para amplificar una región de ambos genes en *Cyanopsitta spixii*, y encontraron que el gen ligado al cromosoma W tenía un sitio de restricción reconocido por la enzima *Ddel*, mientras que el otro gen carecía del mismo. Por lo tanto, en las hembras se generaron dos fragmentos como producto de la digestión, mientras que en los machos permaneció el fragmento sin digerir. <sup>17</sup>

En base a los estudios realizados con *Cyanopsitta spixii* descubrieron un gen ligado al cromosoma W en la especie *Parus major*. Este gen es llamado CHD-W (chromodomain-helicase-DNA-binding protein W-linked). Además, se encontró un segundo gen, el CHD-NW, del cual confirmaron después su localización en el cromosoma Z. Ambos genes están muy conservados; sin embargo, existe una diferencia entre ellos que permite diferenciar los sexos. Como se había mencionado, el fragmento del CHD-W posee un sitio de restricción reconocido por *Ddel*, mientras que el CHD-NW tiene un sitio de restricción reconocido por *HaeIII*. <sup>18, 19</sup>

Los genes CHD codifican proteínas CHD que son miembros de la familia de cromodominio. Estas proteínas están involucradas en la transcripción,

degradación de DNA y estructura de la cromatina. La familia CHD consiste en proteínas que comparten 3 secuencias características: un cromodominio, una *ATPasa/helicasa* y un segmento de unión al DNA. Las proteínas CHD están conservadas de levaduras a plantas a mamíferos. Hay dos Subfamilias de proteínas CHD: CHD1 y CHD3/4. Los CHD de las aves, ligados al cromosoma W y al Z pertenecen a la subfamilia CHD1. Estudios en levaduras revelaron que el Chd1p es un factor de reconstrucción del nucleosoma, y que puede compartir funciones traslapadas con el complejo SWI-SNF para regular la transcripción.  
20, 21

Un estudio previo demostró que la digestión del gen CHD con la enzima *DdeI* permite determinar el sexo de varias especies del género *Ara*.<sup>22, 23</sup>

#### **4.2. Sexado molecular mediante la amplificación del marcador molecular CHD con intrón.**

Por otro lado, encontraron regiones muy conservadas de ambos genes que incluyen dos exones contiguos separados por un intrón, el cual usualmente difiere en tamaño entre los genes CHD. De esta forma, por medio de una reacción de PCR con oligonucleótidos que flanquean dicha región y analizando en un gel de agarosa, en los machos se observa una sola banda que corresponde al CHD-Z, en tanto que en las hembras hay una segunda banda exclusiva del CHD-W. Por medio de esta técnica, 27 especies de 10 Órdenes diferentes fueron sexadas, entre ellos pueden citarse los Órdenes Psittaciformes

y Galliformes. Por lo tanto, este procedimiento resulta más sencillo e igual de eficaz que el anterior. <sup>24</sup>

#### **4.3. Sexado molecular de la Familia Cracidae.**

Un estudio reciente establece que los procedimientos universales para el sexado molecular de aves <sup>17, 24</sup>, no funcionaron satisfactoriamente para el pavón, *Oreophaps derbianus*, un crácido en peligro de extinción; sin embargo, con algunas modificaciones del primero, se estandarizó la técnica. Se amplificó de igual forma una región de los genes CHD, pero se encontró que el CHD-W carece del sitio de restricción reconocido por la enzima *Ddel*, por lo que se hizo un mapa de restricción de los marcadores moleculares CHD del pavón y se encontró otro sitio de restricción exclusivo del CHD-W. Este nuevo sitio es para la enzima *NlaIII*, cuya digestión genera dos productos, permitiendo así la identificación del sexo. <sup>25</sup> Así pues, es posible que esta modificación determinada en el pavón, se presente a nivel de familia.

#### **4.4. Sexado molecular de la Familia Struthionidae.**

Al parecer, los procedimientos moleculares descritos permiten el sexado de todas las aves no ratites. Esto se determinó debido a que en muestras de avestruces se revelaron patrones de bandas idénticos en machos y hembras. Por lo tanto, se estableció que los avestruces carecen del gen CHD-W. <sup>26</sup>

A diferencia de las hembras de las aves carinadas, en las cuales los cromosomas sexuales son heteromórficos, en las ratites son homomórficos, es decir, tienen cromosomas sexuales indiferenciados morfológicamente, a excepción de las especies *Rhea americana*<sup>27</sup> y *Pterocnemia pennata*.<sup>28</sup>

El cromosoma W de las ratites carece completamente de heterocromatina constitutiva. Se cree que el primer paso del proceso de diferenciación morfológica de los cromosomas sexuales de las aves, fue un cambio estructural en el cromosoma W, probablemente la pérdida de material genético, y no así la heterocromatización. Posiblemente, este proceso fue el que dio lugar a los cromosomas heteromórficos, característicos de las aves carinadas.<sup>29</sup>

Los cromosomas sexuales Z y W de las ratites han divergido muy poco, y por lo tanto, pocos marcadores ligados al sexo son disponibles.<sup>30</sup>

Un grupo de investigadores confirmó que los cromosomas sexuales de las ratites son homólogos en gran parte. Además, mencionan que en la región centromérica del cromosoma W puede localizarse un gen o genes determinantes del sexo.<sup>5</sup>

Sin embargo, se realizó un estudio en el avestruz, en donde por medio de AFLP's se aislaron marcadores ligados al sexo, y se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de marcadores del cromosoma W, con lo cual se ha logrado diferenciar a ambos sexos.<sup>31</sup>

## OBJETIVOS GENERALES

Establecer una tecnología molecular para el sexado de aves sujetas a protección especial, amenazadas o en peligro de extinción de las Familias Psittacidae y Cracidae; dentro de esta última, determinar si las diferencias encontradas en el gen CHD ligado al sexo en *Oreophasis derbianus* están conservadas en otras especies de esta familia; por último, establecer una tecnología molecular para el sexado del avestruz, *Struthio camelus*, único integrante de la familia Struthionidae, cuya importancia económica es relevante.

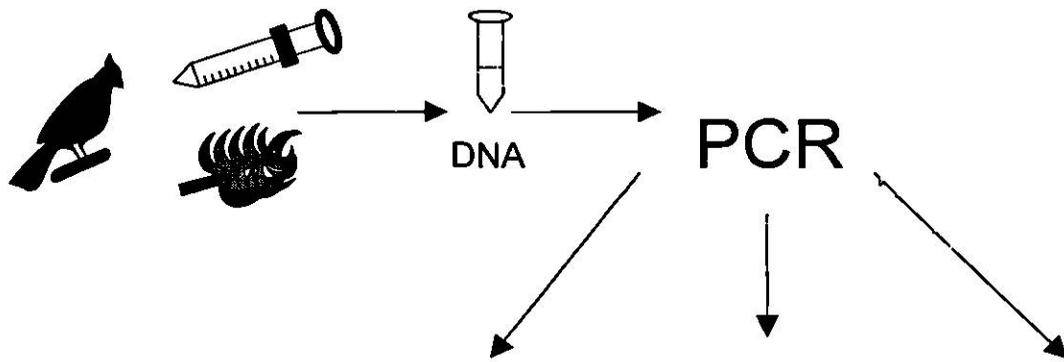
## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar DNA genómico de integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae.
  - 1.1. Obtener muestras de sangre periférica y/o plumas de ambos sexos.
  - 1.2. Aislar DNA genómico a partir de sangre periférica.
  - 1.3. Aislar DNA genómico a partir de pluma.
2. Amplificar por PCR marcadores moleculares ligados a los cromosomas sexuales en integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae.
3. Clonar y secuenciar los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae.

## HIPÓTESIS

1. Es posible el distinguir los sexos de especies de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae mediante el uso de marcadores moleculares ligados al cromosoma sexual W, el cual es un cromosoma exclusivo de las hembras.
2. *Oreophasis derbrianus*, especie perteneciente a la Familia Cracidae, presenta un sitio de restricción para la enzima *NlaIII* en su gen CHD ligado al cromosoma W, el cual es utilizado para el sexado de esta especie. Es posible que otras especies pertenecientes a esta Familia, como lo son *Crax rubra*, *Ortalis vetula*, *Penelope purpurascens* y *Penelopina nigra*, también presenten este mismo sitio de restricción y puedan ser sexadas molecularmente.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



P, C

P, C

S

CHD CON

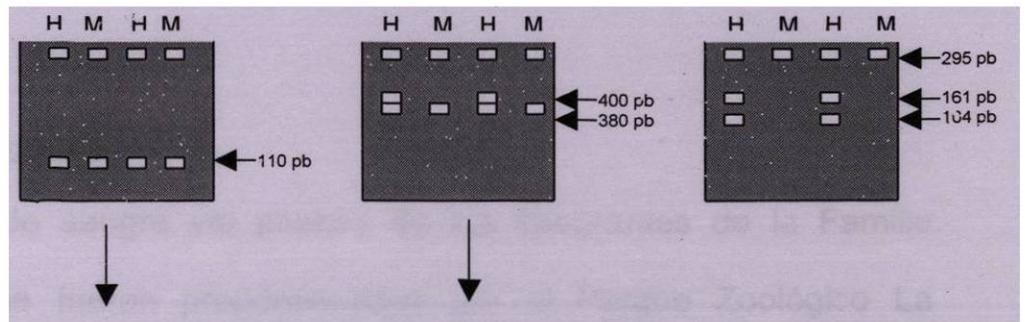
MARCADORES

CHD

INTRÓN

LIGADOS AL W

P = Psittacidae  
C = Cracidae  
S = Struthionidae



C

DIGESTIÓN

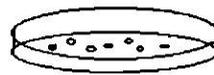
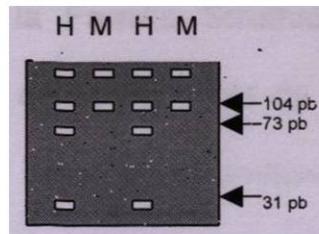
CLONACIÓN DE

CON ENZIMAS

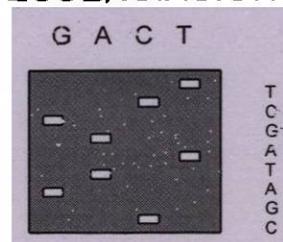
LOS MARCADORES CHD

DE RESTRICCIÓN

CON INTRÓN



SECUENCIACIÓN



## MATERIAL Y EQUIPO

### Equipo:

Cámara de Electroforesis OWL Separation System Inc.

Campana de Flujo Laminar VECO S.A de C.V.

Incubadora ORBIMIX 1010 BINKMANN, INCUBATOR.

Microcentrífuga 5415 C Eppendorf®

Termociclador PTC-100™, MJ Research, Inc.

Termo-mixer R Eppendorf 1.5 ml

Transiluminador FBTIV-88 Fischer Scientific

### Muestras Biológicas:

Las muestras de sangre y/o plumas de los integrantes de la Familia Psittacidae y Cracidae fueron proporcionadas por el Parque Zoológico La Pastora, en Guadalupe, Nuevo León. El Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro, en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, contribuyó con muestras de hembras del crácido *Penelope purpurascens*. Las muestras de sangre y plumas correspondientes a la Familia Struthionidae se obtuvieron en el Centro de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las Familias a las cuales pertenecen estas aves se encuentran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Especies de aves analizadas en este estudio.

FAMILIA PSITTACIDAE	FAMILIA CRACIDAE	FAMILIA STRUTHIONIDAE
<i>Amazona autumnalis</i>	<i>Crax rubra</i>	<i>Struthio camelus</i>
<i>Amazona oratrix</i>	<i>Penelope purpurascens</i>	
<i>Ara macao</i>	<i>Penelopina nigra</i>	
<i>Ara militaris</i>	<i>Ortalis vetula</i>	
<i>Aratinga canicularis</i>		
<i>Aratinga holochlora</i>		
<i>Cyanoliceus patagonius</i>		
<i>Rhynchopsitta pachyrhyncha</i>		

Las cepas bacterianas que se utilizaron corresponden a células  $\text{Ca}^{++}$  competentes de *Escherichia coli* JM109 y células electrocompetentes de *Escherichia coli*.

**Tabla 5.** Endonucleasas de restricción utilizadas en el estudio.

ENZIMA	SITIO DE RECONOCIMIENTO
<i>Ddel</i>	5' C $\nabla$ TNAG 3' 3' GANT $\blacktriangle$ C 3'
<i>HaeIII</i>	5' GG $\nabla$ CC 3' 3' CC $\blacktriangle$ GG 5'
<i>NlaIII</i>	5' CATG $\nabla$ 3' 3' $\blacktriangle$ GTAC 5'
<i>NotI</i>	5' GC $\nabla$ GGCC GC 3' 3' CG CCGG $\blacktriangle$ CG 5'
<i>PvuII</i>	5' CAG $\nabla$ CTG 3' 3' GTC $\blacktriangle$ GAC 5'

## METODOLOGÍA

### **1. Aislamiento de DNA genómico de integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae.**

El primer paso en el aislamiento de DNA consiste en la utilización de un medio de extracción que contiene un detergente, el cual sirve para desnaturalizar proteínas y lisar los núcleos para liberar el DNA. Después es necesario separar los ácidos nucleicos de contaminantes, como RNA y proteínas.

#### **1.1. Obtención de muestras de sangre periférica y/o de pluma de ambos sexos.**

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena braquial y almacenadas con anticoagulante. Se inmovilizó el ave y se extendió una de las alas visualizando la zona interna, para lo cual fue necesario arrancar algunas plumas para facilitar el acceso. Se hicieron punciones con lanceta recogiendo la muestra en capilares con heparina, e incluso con jeringa almacenando en tubos con EDTA. En el caso de las plumas, se procuró que fueran de nuevo crecimiento, ya que la elevada irrigación hace factible el aislamiento de DNA,<sup>32</sup> sin embargo, éste se obtuvo aún de plumas viejas.

## **1.2. Aislamiento de DNA genómico a partir de sangre periférica.**

Esto se realizó por el método descrito por Bermúdez-Humarán, L.G., et al.<sup>23</sup> con algunas modificaciones.

Se colocaron 25  $\mu$ l de sangre en un tubo de microcentrífuga, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de buffer TSNT (TRITON 100X 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0). Se adicionaron 65  $\mu$ l de SDS al 10% y 10  $\mu$ l de *proteínasa K* (10 mg/ml), se mezcló con vórtex para homogenizar los reactivos y permitir su acción conjunta. Se incubó durante 2 horas a 55 °C y 300 rpm. Se realizaron tres extracciones: una con fenol, otra con fenol/cloroformo, y una última con cloroformo. Cada una de ellas se agitó con vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm para la separación de fases. Al recuperar la fase acuosa de la última de las extracciones se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de la solución III (Acetato de Sodio 3M, pH 5.2). Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y se secó. El DNA fue resuspendido en 200  $\mu$ l de buffer TE1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) o agua estéril.

## **1.3. Aislamiento de DNA genómico a partir de pluma.**

Modificado de Taberlet, P.<sup>33</sup>

Se realizó un corte transversal a 5 mm de la base del cálamo de la pluma, se colocó en un portaobjetos en donde se trituroó con una hoja de

bisturí. Se colocó en un tubo de microcentrífuga y se agregaron 500  $\mu$ l de buffer TSNT y 10  $\mu$ l de *proteínasa K*, se mezcló con vórtex y se incubó durante 12 horas a 55 °C y 500 rpm. Se realizaron tres extracciones: una con fenol, otra con fenol/cloroformo, y una última con cloroformo. Cada una de ellas se agitó con vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm para la separación de fases. Al recuperar la fase acuosa de la última de las extracciones se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de la solución III. Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y se secó. El DNA fue resuspendido en 20  $\mu$ l de buffer TE1X o agua estéril.

## **2. Amplificación por PCR de marcadores moleculares ligados a los cromosomas sexuales en integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae.**

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar un fragmento de DNA específico y generar miles de millones de copias del mismo. El DNA se mezcla con los cuatro dNTP's, la *DNA polimerasa*, y los oligonucleótidos complementarios de las secuencias de DNA en los extremos 3' de la región de interés. Los oligonucleótidos sirven como iniciadores donde se van agregando los dNTP's durante los pasos de duplicación que consisten en una desnaturalización de las moléculas de DNA, hibridación de los oligonucleótidos y extensión por la adición de nucleótidos.

## 2.1. Amplificación de los marcadores moleculares CHD-W y CHD-Z en integrantes de las Familias Psittacidae y Cracidae.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l, conteniendo 200-300 ng de DNA genómico de cada especie, 250  $\mu$ M de cada dNTP, 100 ng de cada oligonucleótido: BSexP3 (5'-AGATATTCTG GATCTGATAG TGA-3') y BSexP2 (5'-CTCTGCATCG CTAATCCTTT-3')<sup>17</sup>, 5 U de *Taq DNA Polimerasa*, 10 mM de Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 mM KCl pH 8.3. El programa del termociclador que se utilizó es el siguiente:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	EVENTO
1	94°	4 minutos	Desnaturalización prolongada
2	94°	1 minuto	Desnaturalización
3	49°	1 minuto	Alineamiento
4	72°	3 minutos	Extensión
5	34 ciclos al paso 2		
6	72°	7 minutos	Extensión prolongada

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en agarosa al 2%. Posteriormente fueron digeridos con enzimas de restricción.

### 2.1.1. Electroforesis en gel de agarosa.

En esta técnica se utiliza como soporte un gel de agarosa que es sumergido en una solución amortiguadora (buffer TAE 1X), los fragmentos de DNA son cargados en pozos que se encuentran en uno de los extremos del gel y migran a través de éste por

aplicación de corriente eléctrica. El DNA tiene carga negativa, por lo que migra hacia el ánodo. El tamizado de los fragmentos depende de la concentración de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa al 2% en una solución amortiguadora, TAE 1X (Tris-Acetato 0.04 mM; EDTA 0.001 M). El gel polimerizado se depositó en una cámara de electroforesis horizontal y se cubrió con el mismo buffer. Después se mezclaron 10  $\mu$ l de cada producto de PCR con 2  $\mu$ l de jugo azul 6X (Azul de Bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25% y Glicerol 30%) y se depositaron en los carriles del gel. Para determinar el tamaño del producto de PCR se utilizaron marcadores de peso molecular como 100 pb, 50 pb ó 25 pb (100 ng/ $\mu$ l). Al término de la electroforesis el gel fue teñido por 10 minutos en una solución de bromuro de etidio (2  $\mu$ g/ $\mu$ l), el cual se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos, por lo que las bandas de DNA presentes son fluorescentes al exponerse en un transiluminador de luz UV.

### **2.1.2. Digestión con enzimas de restricción.**

Estas enzimas reconocen secuencias específicas en el DNA de doble cadena, y después catalizan la ruptura de éste en puntos precisos, dando como resultado fragmentos de DNA que poseen extremos definidos.

Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *Ddel* y/o *NlaIII*, así como *HaeIII*. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 17  $\mu$ l del producto de PCR, 2  $\mu$ l de buffer de reacción y 5 U de la enzima. La digestión con *Ddel* se incubó a 37° durante 1 hora, mientras que con *NlaIII* y *HaeIII* se incubó de 12 a 16 horas. Posteriormente esto se analizó en un gel de poliacrilamida al 10%.

### **2.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.**

El fundamento es el mismo de la electroforesis en gel de agarosa, la diferencia es que los geles de poliacrilamida tienen una mayor resolución, siendo posible la separación de moléculas pequeñas de DNA de unos pocos cientos de nucleótidos o menos, e incluso cuando la longitud difiere sólo en una base.

La solución fue preparada a una concentración del 10% para un volumen de 10 ml, conteniendo 2.5 ml de acrilamida al 40%, 5 ml de agua bidestilada estéril, 2 ml de buffer TBE 5X estéril (27 gr Tris-Base, 13.75 gr Ácido Bórico, 10 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0 aforado a 500 ml con agua bidestilada estéril), 115  $\mu$ l de PSA al 10% cuya función es iniciar la polimerización, y 12  $\mu$ l de TEMED, usado como catalizador para la polimerización. Las cámaras de electroforesis utilizadas son verticales y el buffer de corrida es TBE 1X.

## **2.2. Amplificación de los marcadores moleculares CHD-W y CHD-Z con intrón en integrantes de las Familias Psittacidae y Cracidae.**

Las condiciones para esta reacción fueron las mismas que en el caso anterior, a excepción de los oligonucleótidos, que fueron: BSexP8 (5'-CTCCCAAGGA TGAGRAAYTG-3'), donde R=A/G, Y=T/C y N=A/T/G/C<sup>24</sup>; y BSexP2. El programa del termociclador fue el mismo. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en agarosa al 2.5%.

### **2.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.**

Éste se utilizó para analizar los productos de PCR de los crácidos.

La solución fue preparada para un volumen de 60 ml, conteniendo 12 ml de acrilamida al 40%, 35 ml de agua bidestilada estéril, 12 ml de buffer TBE 5X estéril, 600 µl de PSA al 10% y 45 µl de TEMED.

## **2.3. Amplificación de marcadores moleculares ligados al cromosoma W específicos para la Familia Struthionidae.**

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl, conteniendo 200-300 ng de DNA genómico de la especie en cuestión, 250 µM de cada dNTP, 100 ng de cada oligonucleótido (OPERON): ScW1F (5'-AATTCAGGAC CTTGGTGAA-3'), ScW1R (5'-ACAAGATGTT

TTGGAAAGAA GAG-3') y ScW2F (5'CAATAAACAA CATGTGAAAG AACAA-3'), ScW2R (5'ACATGAGGAC AATGTGTAAG GA -3'); además de los usados como control positivo: P8 y P18 (5'-GAGATGGAGT CACTATCAGA TCC-3')<sup>31</sup>, 5 U de *Taq DNA Polimerasa*, 10 mM de Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 mM KCl pH 8.3. El programa del termociclador fue como sigue:

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	EVENTO
1	94°	4 minutos	Desnaturalización prolongada
2	94°	1 minuto	Desnaturalización
3	47°	1 minuto	Alineamiento
4	72°	2 minutos	Extensión
5	29 ciclos al paso 2		
6	72°	7 minutos	Extensión prolongada

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en agarosa al 2.5%.

### 3. Clonación y secuenciación de los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae.

La técnica de clonación del DNA permite producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico.

Esto se realizó con muestras de una pareja de *Crax rubra*, y una hembra de la especie *Penelope purpurascens*.

### 3.1. Ligación de los marcadores moleculares CHD con intrón al vector.

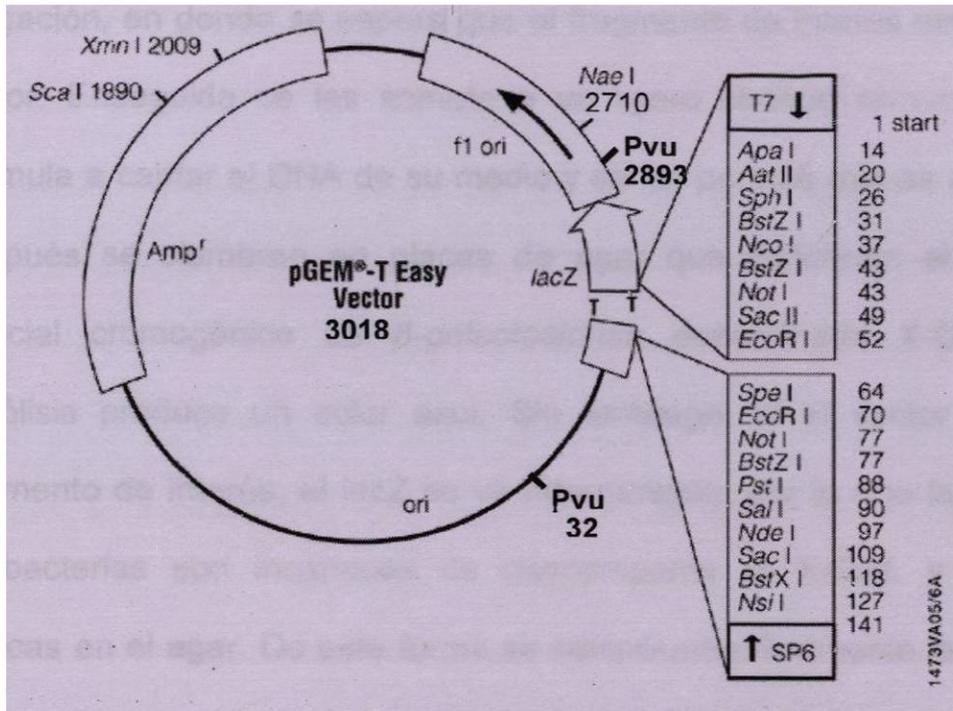
El segmento de DNA que desea clonarse primero debe ser unido a un vector, el cual permite transportar DNA extraño a una célula huésped como la bacteria *Escherichia coli*.

En este estudio se utilizaron tres vectores para clonación: los plásmidos pGEM<sup>®</sup>-T, pBluescript II SK y pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Figura 4). Estos vectores poseen un gen que confiere resistencia a la ampicilina, así como el gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) de *Escherichia coli*. El *lacZ* tiene una serie de sitios de restricción únicos incluidos en él, de tal forma que el plásmido sólo puede ser cortado dentro del mismo. La eficiencia de la ligación es debido a la presencia de T en los extremos 3' de los vectores abiertos, los cuales son complementarios con la desoxiadenosina que adiciona la *Taq DNA polimerasa* al extremo 3' del fragmento amplificado.

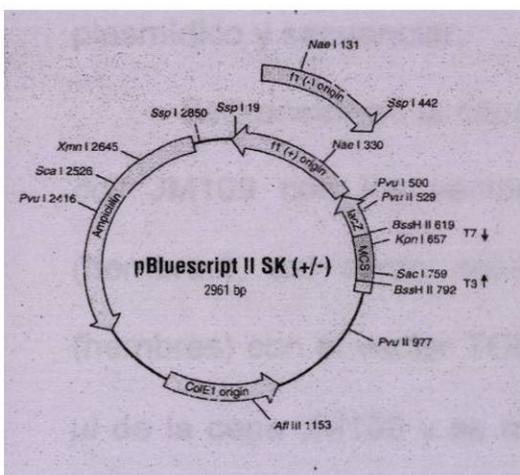
La ligación se llevó a cabo en un volumen de 6 a 10  $\mu$ l. Conteniendo en el caso del macho 5  $\mu$ l de buffer *ligasa* 2X, 1  $\mu$ l del vector pGEM<sup>®</sup>-T, 2  $\mu$ l del producto de PCR del CHD con intrón, 1 U de *T4 DNA ligasa* y 1  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. En el caso de las hembras se utilizó 1  $\mu$ l de buffer *ligasa* 10X, 1  $\mu$ l del vector pBluescript II SK, 1  $\mu$ l del producto de PCR, 1 U de *T4 DNA ligasa* y 6  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. También se empleó el vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>, del cual se utilizó 1  $\mu$ l, así como 3  $\mu$ l del producto de PCR de las hembras, 1  $\mu$ l de buffer y 1  $\mu$ l de agua bidestilada estéril. En el caso de los vectores pGEM<sup>®</sup>-T y

pBluescript II SK, la reacción se incubó a 4° C durante 12 horas. La reacción del vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> sólo se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

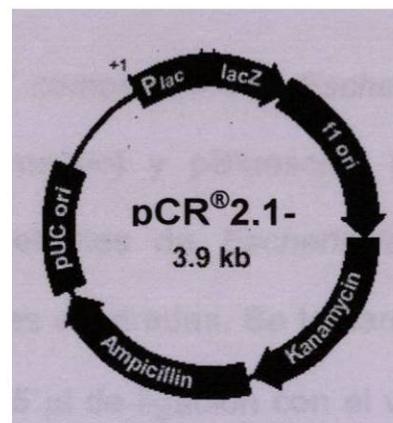
**A) Mapa del Vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector**



**B) Mapa del Vector pBluescript II SK**



**C) Mapa del vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>**



**Figura 4. Mapa circular de los vectores. A) pGEM<sup>®</sup>-T, B) pBluescript II SK, y C) pCR<sup>®</sup>2.1, TOPO<sup>®</sup>.**

### **3.2. Transformación de bacterias con los plásmidos recombinantes.**

Este procedimiento consiste en mezclar las células  $Ca^{++}$  competentes o electrocompetentes de *Escherichia coli* con el producto de la ligación, en donde se espera que el fragmento de interés esté unido al vector. Enseguida se les somete a un ligero choque térmico que las estimula a captar el DNA de su medio y se les permite que se recuperen. Después se siembran en placas de agar que contienen el substrato artificial cromogénico de  $\beta$ -galactosidasa denominado X-GAL, cuya hidrólisis produce un color azul. Sin embargo, si el vector posee el fragmento de interés, el lacZ se ve interrumpido, por lo que las colonias de bacterias son incapaces de descomponer el X-GAL y aparecen blancas en el agar. De esta forma se seleccionan fácilmente las colonias que poseen el vector con el fragmento de interés. Después se inocula medio nutritivo con las cepas de interés para finalmente aislar el DNA plasmídico y secuenciar.

Se transformó la cepa de células  $Ca^{++}$  competentes de *Escherichia coli* JM109 con los vectores pGEM<sup>®</sup>-T (macho) y pBluescript II SK (hembras), así como células electrocompetentes de *Escherichia coli* (hembras) con el vector TOPO, en reacciones separadas. Se tomaron 50  $\mu$ l de la cepa JM109 y se mezclaron con 3-5  $\mu$ l de ligación con el vector respectivo; para transformar las células electrocompetentes sólo se utilizaron 2  $\mu$ l de ligación con el vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. Esto se incubó

en hielo durante 20 minutos y se aplicó un choque térmico a 42° C durante 1 minuto, se incubó de nuevo en hielo por 2 minutos y se añadieron 950 µl de medio SOC (2 gr Peptona, 0.5 gr Extracto de levadura, 1 ml NaCl 1 M, 0.25 ml KCl 1 M, 1 ml MgCl<sup>2+</sup> 2 M, 1 ml Glucosa 2 M aforado a 100 ml y esterilizado), a excepción de las células electrocompetentes, en donde sólo se agregaron 250 µl. Posteriormente se incubó 2 horas a 37° C y 200 rpm. Después se sembró por extensión en placas preparadas con medio LB-Agar ampicilina (100 µg/ml) donde se añadieron 4 µl de IPTG (200 mg/ml) y 30 µl de X-GAL (20 mg/ml). Se dejó crecer a 37° C durante 12 horas. Posteriormente, se seleccionaron varias colonias, se inocularon 5 ml de medio LB-caldo-ampicilina (100 µg/ml) con las cepas de interés. Se dejaron crecer a 37° C y 150 rpm durante 12 horas.

### **3.3. Aislamiento de DNA plasmídico.**

Se tomaron 1.5 µl de la cepa de interés, se centrifugó y la pastilla obtenida se resuspendió en 150 µl de la solución I (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0). Se agregaron 300 µl de la solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. Después se añadieron 250 µl de la solución III (Acetato de Potasio 5 M, Ácido Acético Glacial) y se mezcló con vórtex. Se centrifugó 8 minutos a 14,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se agregó un volumen de isopropanol y se agitó con vórtex. Se centrifugó 7 minutos a 14,000 rpm y se descartó el

sobrenadante. Se lavó la pastilla con 800  $\mu$ l de etanol al 70% y se dejó secando. Después de esto, la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer TE1X con 1  $\mu$ l de *RNA*sa (10 mg/ml), y se incubó a 55° C por 10 minutos.

#### **3.4. Digestión de los plásmidos recombinantes.**

Posteriormente, las clonas con el vector pGEM<sup>®</sup>-T se digirieron con la enzima *Not*I para determinar cuáles poseían el fragmento de interés. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 6  $\mu$ l de DNA plasmídico, 2  $\mu$ l de buffer, 11  $\mu$ l de agua bidestilada estéril y 1  $\mu$ l de la enzima respectiva. Las clonas con el vector pBluescript II SK se digirieron con la enzima *Pvu*II para liberar el fragmento. Las reacciones fueron también en un volumen de 20  $\mu$ l, conteniendo 17  $\mu$ l de DNA plasmídico, 2  $\mu$ l de buffer y 5 U de la enzima. Las clonas con el vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> se digirió con *Not*I para identificar por tamaño las clonas positivas, la reacción se realizó de igual forma que en pGEM<sup>®</sup>-T. Todas las mezclas se incubaron a 37° C por espacio de 1 hora. Ya identificadas las clonas, se amplificó por PCR el gen CHD con los oligonucleótidos P3 y P2, se hicieron digestiones con las enzimas *Nla*III y *Hae*III para identificar si el inserto correspondía al CHD-W, o al CHD-Z.

### **3.5. Purificación de DNA plasmídico.**

Antes de secuenciar fue necesario obtener un DNA altamente puro, lo cual se realizó de acuerdo al protocolo del *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche.

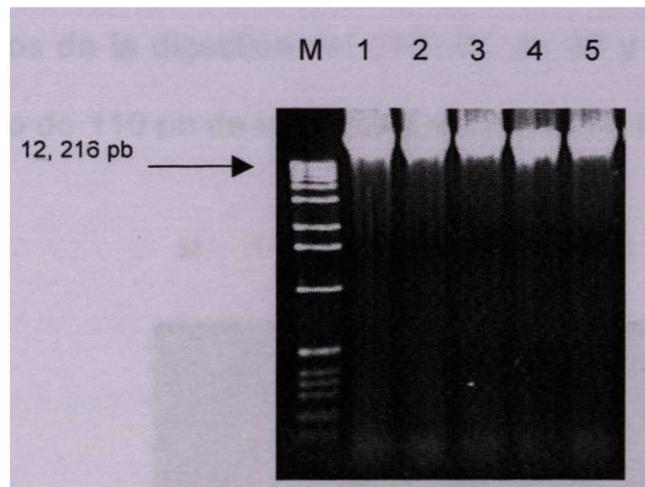
### **3.6. Secuenciación de los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae.**

Los marcadores moleculares CHD-W y CHD-Z con intrón de una pareja de *Crax rubra*, y una hembra de *Penelope purpurascens* fueron secuenciados por medio de la técnica Sanger ó técnica didesoxi.<sup>34</sup>

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento de DNA genómico de integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae a partir de sangre y/o pluma.

El hecho de que los eritrocitos de las aves son nucleados y más grandes que los de los mamíferos permitió obtener sin dificultad una alta concentración de DNA, siendo el procedimiento de extracción igual de efectivo tanto a partir de sangre como de pluma. En la Figura 5 se muestra un gel de agarosa al 0.8%, en donde se incluye sólo el DNA de algunas de las especies analizadas en este estudio; sin embargo, todas ellas presentaron aproximadamente el mismo patrón de concentración.



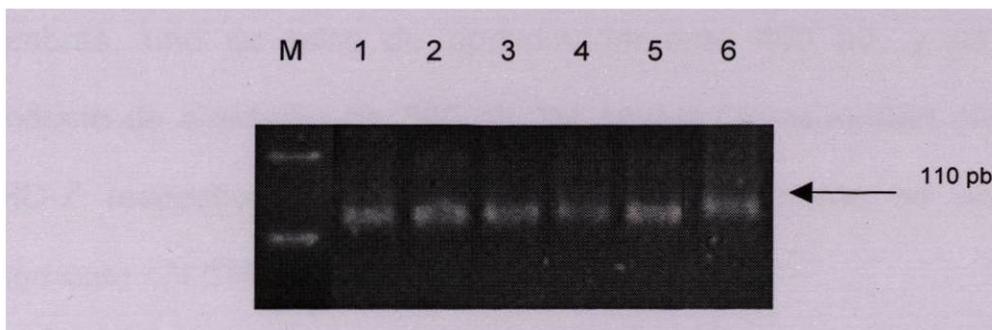
**Figura 5. DNA genómico de algunas especies de crácidos.** El marcador de peso molecular (M) es 1 Kb, los carriles 1-3 corresponden a *Ortalis vetula*, el carril 4 a *Penelopina nigra*, y el carril 5 a *Penelope purpurascens*.

## 2. Sexado de integrantes de las Familias Psittacidae, Cracidae y Struthionidae, por amplificación de marcadores moleculares ligados a los cromosomas sexuales.

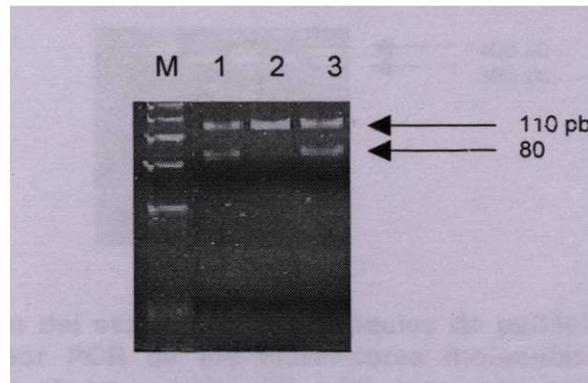
### 2.1. Sexado de psitácidos por medio de PCR-RFLP's.

Los oligonucleótidos P3 y P2 permitieron amplificar por PCR ambos marcadores en las especies de psitácidos previamente mencionadas. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2% y las digestiones en geles de poliacrilamida al 10%.

El producto de PCR de 110 pb (Figura 6) fue digerido con la enzima *DdeI*, y puesto que el sitio de restricción reconocido por esta enzima se encuentra sólo en el CHD-W, en las hembras se generaron tres fragmentos, uno de ellos de 110 pb correspondiente al CHD-Z que carece de este sitio por lo que permanece del mismo tamaño, y dos fragmentos de la digestión del CHD-W, de 80 y 30 pb; en los machos el fragmento de 110 pb de los CHD-Z conservó su tamaño (Figura 7).



**Figura 6. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD de tres especies de psitácidos.** Los productos CHD se muestran como una banda de 110 pb. El marcador de peso molecular (M) es 100 pb; los carriles 1, 3 y 5 muestran la amplificación de los genes CHD-W y CHD-Z de las hembras, los cuales son del mismo tamaño; los carriles 2, 4 y 6 muestran la amplificación de ambos alelos CHD-Z en los machos. Las especies analizadas son: *Amazona autumnalis*, *Aratinga holochlora* y *Ara militaris* respectivamente.

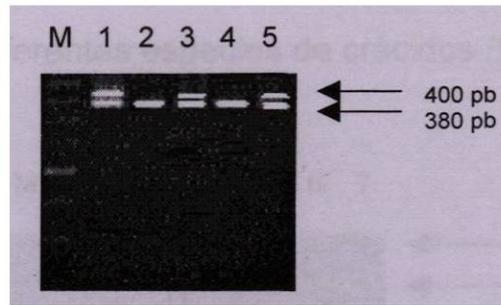


**Figura 7. Digestión enzimática con *Ddel* de los marcadores moleculares CHD de la especie *Aratinga holochlora*.** Las muestras corresponden a una pareja y su cría. El marcador de peso molecular (M) es 25 pb, los carriles 1 y 3 corresponden a hembras, y el carril 2 a un macho. El producto de digestión de 30 pb no se alcanza a percibir.

## **2.2. Sexado de psitácidos por medio de la amplificación de los marcadores moleculares CHD con intrón.**

Los oligonucleótidos P8 y P2 permitieron amplificar por PCR dos exones contiguos separados por un intrón, el cual usualmente difiere en tamaño entre los genes CHD.

En este caso se obtuvieron dos productos de amplificación en las hembras, uno de ellos de aproximadamente 400 pb, y un segundo producto de alrededor de 380 pb, los cuales corresponden al CHD-W y CHD-Z respectivamente. En los machos, solamente se amplificó el fragmento del CHD-Z (Figura 8).



**Figura 8. Identificación del sexo de varias especies de psitácidos a través de la amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD con intrón.** Se utilizaron los oligonucleótidos P2 y P8, los cuales amplificaron una banda de 400 pb (CHD-W) y una banda de 380 pb (CHD-Z). El marcador de peso molecular (M) es 50 pb. Carriles: 1 y 2, hembra y macho de *Aratinga canicularis*; 3 y 4, hembra y macho de *Cyanoliceus patagonius*; y 5, hembra de *Rhynchopsitta pachyrhyncha*.

Cabe mencionar que en un estudio previo las especies *Ara macao* y *A. militaris* fueron sexadas por medio de la técnica de digestión con *Ddel*. Así pues, la técnica del intrón resultó igual de efectiva así como más rápida y sencilla.

### **2.3. Sexado de crácidos por medio de la amplificación de los marcadores moleculares CHD con intrón.**

Con respecto a los crácidos, al igual que en *Oreophasis derbianus*, la técnica no funcionó, por lo que no fue posible, al menos en las especies analizadas, el sexado por medio de este procedimiento.

Se amplificaron los marcadores moleculares CHD que incluyen el intrón, con los oligonucleótidos mencionados; sin embargo, al ser analizados en un gel de poliacrilamida al 8% y utilizando como control positivo amplificaciones del CHD con intrón de hembras de psitácidos, se

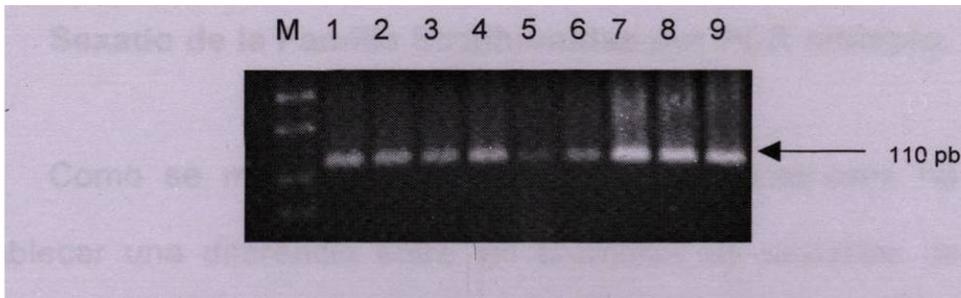
obtuvo un solo producto de amplificación de alrededor de 380 pb en ambos sexos de las diferentes especies de crácidos (Figura 9).



**Figura 9. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD con intrón de varias especies de crácidos.** El marcador de peso molecular (M) es 100 pb. Carriles: 1, macho de *Ortalis vetula*; 2, macho de *Penelopina nigra*; 3, hembra de *Penelope purpurascens*; 4 y 5, hembra y macho de *Crax rubra*; 6, hembra de *Rhynchopsitta pachyrhyncha*; y 7, hembra de *Amazona oratrix*; estas dos últimas especies corresponden a psitácidos, las cuales se utilizaron como control positivo.

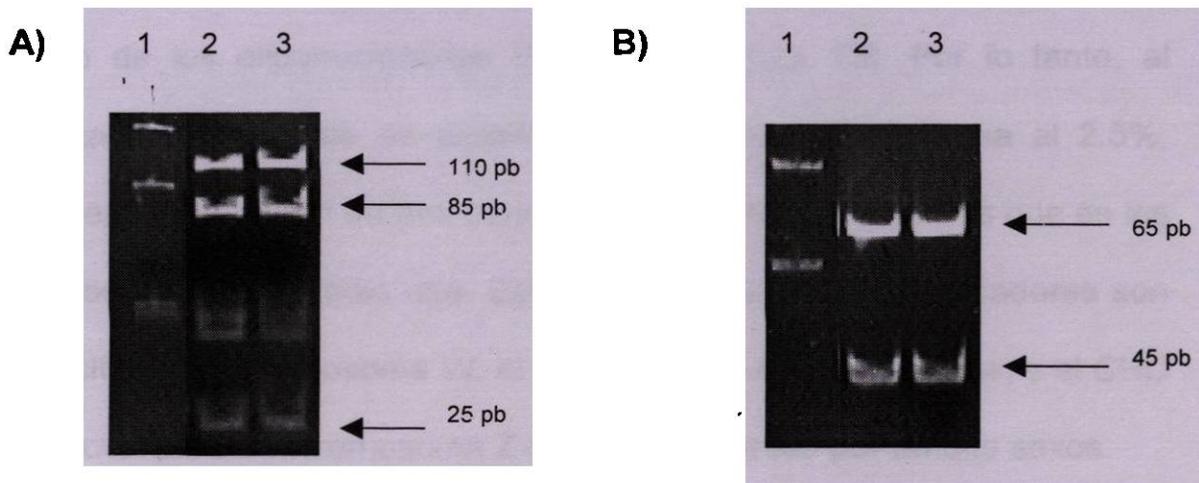
#### **2.4. Sexado de crácidos por medio de PCR-RFLP's.**

Con respecto a los crácidos, los fragmentos amplificados tuvieron un tamaño de 110 pb (Figura 10). Como se mencionó anteriormente, un estudio previo determinó que el sitio de restricción reconocido por *DdeI* no es conservado en el CHD-W de *Oreophasis derbianus*, un crácido en peligro de extinción. Sin embargo, en dicho estudio se reportó otro sitio de restricción único en el CHD-W que es reconocido por la enzima *NlaIII*, de tal modo que se utilizó esta enzima con el objeto de determinar si esta modificación está conservada en otros crácidos y permite el sexado de los mismos.



**Figura 10. Amplificación por PCR de los marcadores moleculares CHD de varias especies de crácidos.** Los productos CHD se muestran como una banda de 110 pb. El marcador de peso molecular (M) es 50 pb. Carriles: 1-3, machos de *Ortalis vejala*; 4, macho de *Penelopina nigra*; 5 y 6, hembras de *Penelope purpurascens*; y 7-9, dos hembras y un macho de *Crax rubra*.

Como resultado de la digestión de los productos de PCR con la enzima *NlaIII* se generaron tres fragmentos en las hembras, el correspondiente al CHD-Z de 110 pb sin digerir debido a que carece de tal sitio, y dos correspondientes al CHD-W digerido, de 85 y 25 pb (Figura 11).

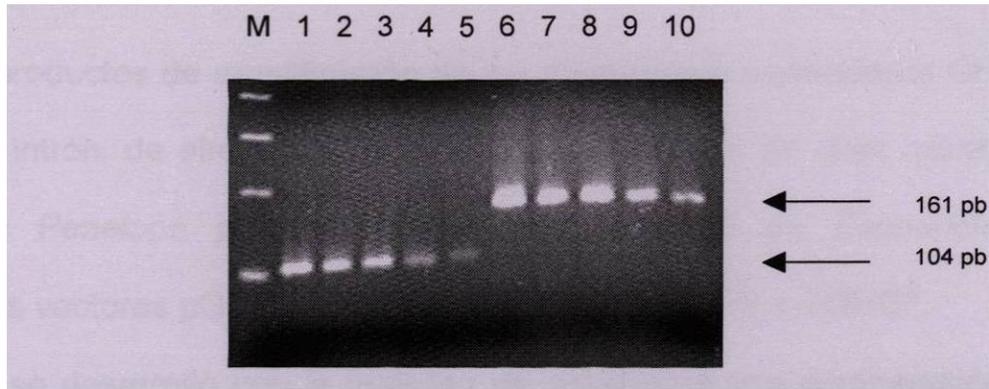


**Figura 11. Identificación del sexo de especies de crácidos por medio de enzimas de restricción.** El producto de PCR de 110 pb se digirió: A) en el caso de las hembras con *NlaIII* (bandas de 85 y 25 pb), y B) los machos con *HaeIII* (bandas de 65 y 45 pb). El marcador de peso molecular (M) es 50 pb.

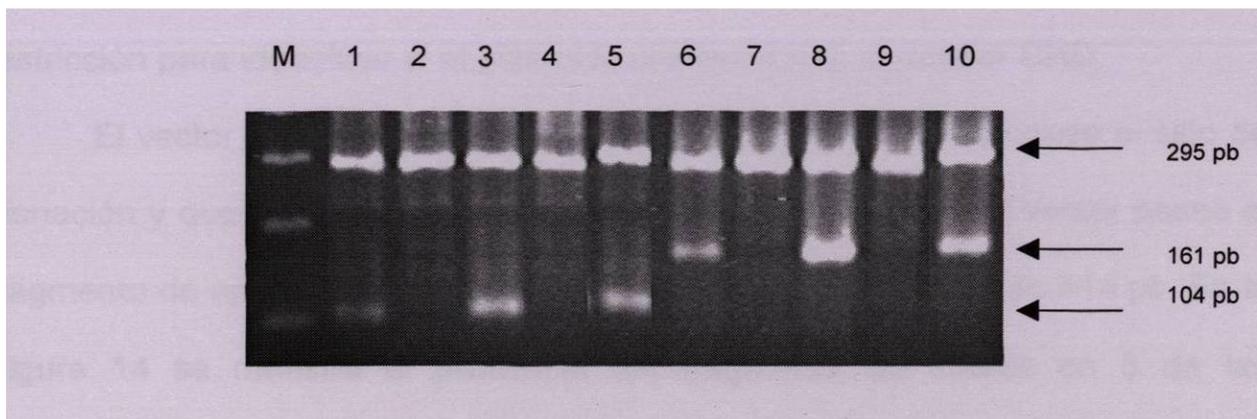
## **2.5. Sexado de la Familia Struthionidae por PCR múltiple.**

Como se mencionó, los procedimientos anteriores no permiten establecer una diferencia entre los cromosomas sexuales de las aves ratites. Sin embargo, la identificación de marcadores moleculares ligados al cromosoma W en estas aves, permite el sexado de las mismas sin mayor problema.

Se utilizaron dos marcadores moleculares amplificados por medio de los oligonucleótidos ScW1F, ScW1R y ScW2F, ScW2R, siendo los productos de 104 y 161 pb respectivamente. Para esto fue necesario estandarizar la técnica de PCR por medio de un gradiente de temperatura (Figura 12). Además, se utilizó como control positivo interno el gen CHD, siendo amplificada una región del mismo de alrededor de 295 pb, por medio de los oligonucleótidos P8 y P18 (Figura 13). Por lo tanto, al analizar los productos de amplificación en geles de agarosa al 2.5%, obtenemos un patrón de tres bandas en las hembras, mientras que en los machos se observa sólo una. Esto es debido a que los marcadores son específicos del cromosoma W, el cual es único en las hembras, y el CHD se encuentra en el cromosoma Z que es compartido por ambos sexos.



**Figura 12. Determinación de la temperatura óptima de amplificación para el sexado de *Struthio camelus*.** Las muestras corresponden a hembras. El marcador de peso molecular (M) es 100 pb. En los carriles 1-5 se utilizó el marcador ScW1, en los carriles 6-10 se amplificó el marcador ScW2. Las temperaturas son 47°, 49°, 51°, 53° y 55° respectivamente.



**Figura 13. Identificación del sexo de *Struthio camelus* por PCR múltiple.** El marcador de peso molecular (M) es 100 pb. Carriles: 1-5, avestruces sexados con los oligonucleótidos ScW1 (banda de 104 pb); y 6-10, con los oligonucleótidos ScW2 (161 pb). Se utilizó un control positivo interno que amplifica el CHD con los oligonucleótidos P8 y P18 (295 pb). Se alternan muestras de hembra y macho.

### 3. Secuencias de los marcadores moleculares CHD con intrón de integrantes de la Familia Cracidae.

Los productos de amplificación de los marcadores moleculares CHD-W y CHD-Z con intrón, de alrededor de 380 pb de una pareja de *Crax rubra*, y una hembra de *Penelope purpurascens* fueron clonados en *Escherichia coli* utilizando los vectores pGEM<sup>®</sup>-T, pBluescript II SK y pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>.

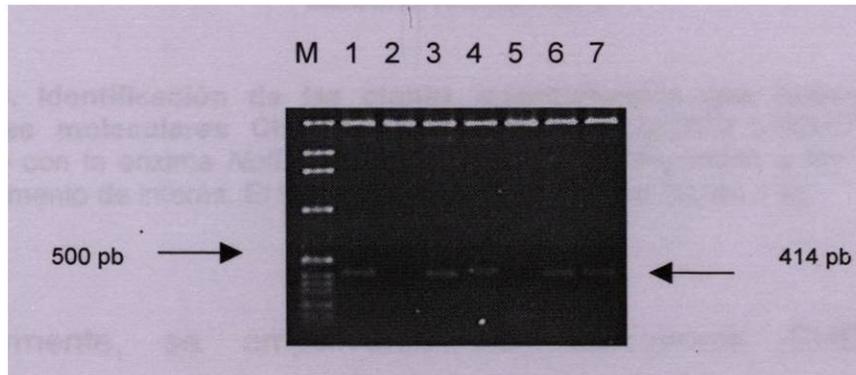
Esto se desarrolló con la finalidad de establecer una comparación entre las secuencias de los marcadores CHD-W y CHD-Z entre las diferentes especies de crácidos mencionadas, así como una comparación con lo reportado en *Oreophasis derbianus*.

Las transformantes positivas para los marcadores CHD fueron identificadas por medio de la selección de colonias blancas y azules. Posteriormente se aisló el DNA plasmídico y se digirió con enzimas de restricción para identificar si el plásmido presentaba el marcador CHD.

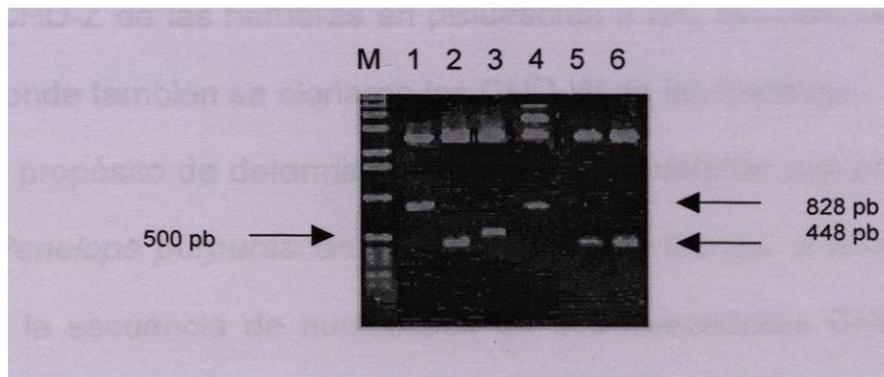
El vector pGEM<sup>®</sup>-T fue digerido con *NotI*, enzima que flanquea el sitio de clonación y que libera un fragmento de 34 pb, por lo tanto, si el vector posee el fragmento de aproximadamente 380 pb, se libera un fragmento de 414 pb. En la Figura 14 se muestra la presencia del fragmento de interés en 5 de las transformantes.

En el caso del vector pBluescript II SK, el sitio de clonación es flanqueado por la enzima *PvuII*, cuya digestión genera un fragmento de 448 pb; por lo tanto, la presencia de un fragmento de 828 pb nos indica que el vector posee el marcador CHD (Figura 15).

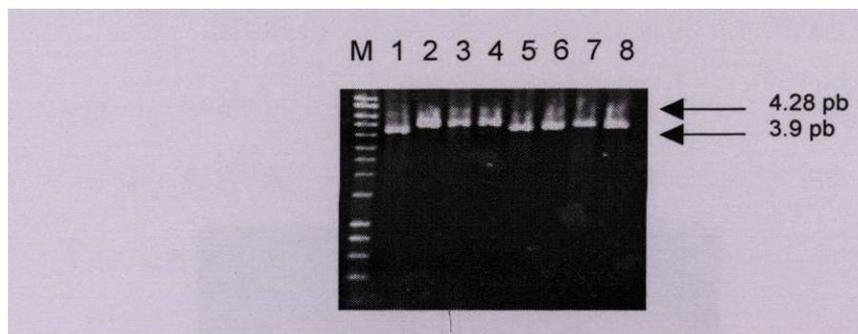
Por otro lado, el vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> se linearizó cortando con la enzima *NotI*. El tamaño de este vector es de 3.9 kb, por lo que una banda de 4.28 kb señala la presencia del fragmento de interés (Figura 16).



**Figura 14. Identificación de las clonas recombinantes que poseen los marcadores moleculares CHD.** El DNA plasmídico (pGEM<sup>®</sup>-T) fue digerido con la enzima *NotI*. Los carriles 1, 3, 4, 6 y 7 corresponden a las clonas con el fragmento de interés. El marcador de peso molecular (M) es 1 kb.



**Figura 15. Identificación de las clonas recombinantes que poseen los marcadores moleculares CHD.** El DNA plasmídico (pBluescript II SK) fue digerido con la enzima *PvuII*. Los carriles 1 y 4 corresponden a las clonas con el fragmento de interés. El marcador de peso molecular (M) es 1 kb.

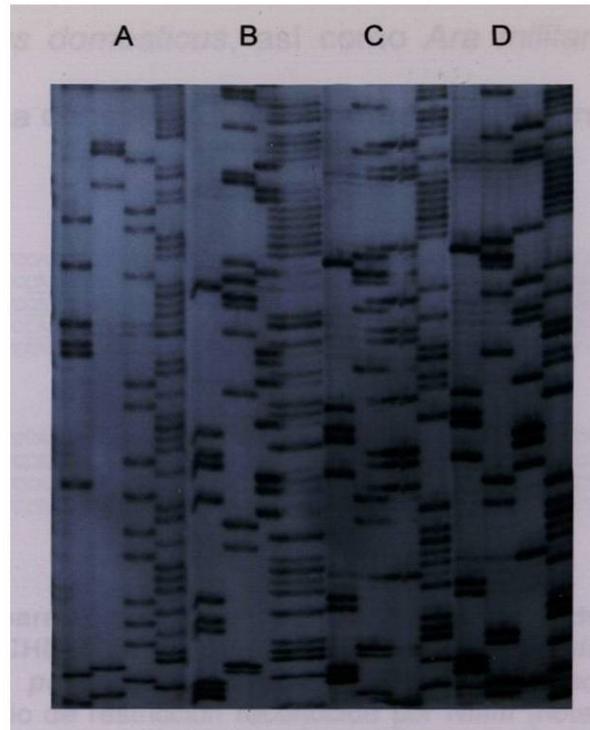


**Figura 16. Identificación de las clonas recombinantes que poseen los marcadores moleculares CHD.** El DNA plasmídico (pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>) fue linearizado con la enzima *NotI*. Los carriles 2-4 y 7 corresponden a las clonas con el fragmento de interés. El marcador de peso molecular (M) es 1 kb.

Posteriormente, se amplificaron los marcadores CHD con los oligonucleótidos P3 y P2. Esto se realizó con la finalidad de identificar a cuál marcador correspondían los fragmentos clonados de las hembras, por lo que después se digirieron con las enzimas de restricción *NlaIII* y *HaeIII*.

Los marcadores CHD-Z de los machos se clonaron en pGEM<sup>®</sup>-T, los marcadores CHD-Z de las hembras en pBluescript II SK, así como en pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>, en donde también se clonaron los CHD-W de las hembras.

Con el propósito de determinar la homología existente entre las especies *Crax rubra*, *Penelope purpurascens* y *Oreophasis derbianus*, a nivel molecular, se determinó la secuencia de nucleótidos de sus marcadores CHD. Como se mencionó en la metodología, los marcadores CHD amplificados se clonaron en el vector TOPO y se determinó la secuencia de nucleótidos mediante el procedimiento de Sanger (Figura 17).



**Figura 17. Secuenciación del marcador molecular CHD de *Crax rubra* y *Penelope purpurascens*.** La secuenciación se realizó por el método de Sanger utilizando  $^{35}\text{S}$ -dATP y el oligonucleótido universal mp13. Los resultados se muestran como sigue: A) Marcador CHD-Z de *Crax rubra*, B) Marcador CHD-Z de *Penelope purpurascens*, C) Marcador CHD-W de *Penelope purpurascens*, y D) Marcador CHD-W de *Crax rubra*. Gel de poliacrilamida al 6%.

La secuencia de nucleótidos de los marcadores moleculares CHD-W y CHD-Z de *Crax rubra* y *Penelope purpurascens* se muestra en la Figura 18. Asimismo, estas secuencias se compararon con una secuencia ya reportada de *Gallus domesticus*, perteneciente al mismo Orden (Galliformes), y con una secuencia de *Ara militaris*, del Orden Psittaciformes. Los resultados indican que los marcadores CHD-W de *Crax rubra* y *Penelope purpurascens* poseen un 100% de homología con respecto a *Oreophasis derbianus*, pertenecientes a la Familia Cracidae; y un 83% de similitud a nivel de secuencia de nucleótidos con *Gallus domesticus*, y un 77% con el marcador CHD-W de *Ara militaris*. Por el

contrario, la homología entre los diferentes marcadores CHD-Z fue la siguiente: 95% entre *Penelope purpurascens* y *Oreophasis derbianus*, 95% entre *Penelope purpurascens* y *Gallus domesticus*, así como *Ara militaris*. Esto indica que el marcador CHD-Z se ha conservado mejor entre los diferentes Órdenes.

A)										
<i>G. domesticus</i> CHD-W	TTC	CAT	CTCA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	ACGTGGACGA	CCACGAACTA	TTC	CCCGTGA	AAACATT
<i>O. derbianus</i> CHD-W	TTC	CAT	CTCA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	ACGTGGACGA	CCAAGAACTA	TTC	CTCGAGA	AAACATT
<i>C. rubra</i> CHD-W	CTC	CAT	CTCA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	ACGTGGACGA	CCAAGAACTA	TTC	CTCGAGA	AAACATT
<i>P. purpurascens</i> CHD-W	CTC	CAT	CTCA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	ACGTGGACGA	CCAAGAACTA	TTC	CTCGAGA	AAACATT
<i>A. militaris</i> CHD-W	CTC	CAT	CTCA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	ACGTGGACGA	CCAAGAACTA	TTC	CTCGAGA	AAACATT
B)										
<i>G. domesticus</i> CHD-Z	CTC	CAT	CACA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	GCGTGAAGA	CCTCGAACCA	TTC	CTCGAGA	AAATATT
<i>O. derbianus</i> CHD-Z	CTC	CAT	CACA	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	GCGTGAAGA	CCTCGAACCA	TTC	CTCGAGA	AAATATT
<i>P. purpurascens</i> CHD-Z	CTC	CAT	CACG	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	GCGTGAAGA	CCAAGAACTA	TTC	CTCGAGA	AAATATT
<i>A. militaris</i> CHD-Z	CTC	CAT	CTCG	GAAAGAAAAC	GACCAAAAAA	GCGTGAAGA	CCAAGAACTA	TTC	CTCGAGA	AAATATT

**Figura 18. Comparación de la secuencia nucleotídica de los marcadores A) CHD-W y B) CHD-Z de *Gallus domesticus*, *Oreophasis derbianus*, *Crax rubra*, *Penelope purpurascens* y *Ara militaris*. La secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción reconocido por *NlaIII* (nótese que esta última es característica de los crácidos). Los nucleótidos sombreados indican las modificaciones con respecto a la secuencia de *Gallus domesticus*.**

## DISCUSIÓN

En algunas especies de aves se han identificado secuencias de DNA ligadas al cromosoma W; sin embargo, corresponden a repeticiones que no son funcionales. El principal problema de esto es la velocidad a la que evolucionan, por lo que suelen servir únicamente para sexar un grupo limitado de aves estrechamente emparentadas.<sup>18</sup> A diferencia de esto, el marcador CHD ligado al cromosoma W en las aves presenta un 82.9% de similitud a nivel de nucleótidos y no menos de 95.6% de similitud a nivel de aminoácidos con el CHD1 del ratón. Este alto grado de homología provee un procedimiento universal para el sexado de todas las aves no ratites.<sup>26</sup>

Los procedimientos moleculares para el sexado basados en los marcadores CHD son bastantes sólidos; sin embargo, el riesgo de una mutación peculiar en algunas especies de aves no es imposible.<sup>18</sup> Tal es el caso de *Oreophasis derbianus*, y como muestra este estudio, otras especies de crácidos, tal y como *Crax rubra* y *Penelope purpurascens*, en donde se perdió el sitio de restricción reconocido por *Ddel* debido al cambio de un nucleótido, C a G, en el marcador CHD-W. Sin embargo, esta modificación originó un nuevo sitio de restricción para la enzima *NlaIII*, del cual carece la secuencia del gen CHD-Z.<sup>25</sup> Por tal motivo, existe la posibilidad de que esta mutación puntual sí se conserve a nivel de la Familia Cracidae.

Con respecto a los crácidos, los resultados encontrados en este trabajo son semejantes a los reportados en un estudio previo sobre *Oreophasis*

*derbianus*.<sup>25</sup> Como se hipotetizó, los marcadores CHD-W de *Crax rubra* y *Penelope purpurascens* correspondieron en un 100% con el marcador CHD-W de *O. derbianus*. Se encontró una similitud notable con respecto al marcador CHD-W de *Gallus domesticus*, debido a que junto con los crácidos forma parte del Orden Galliformes. Con respecto a *Ara militaris* (Orden Psittasiformes), la similitud fue menor; los cambios de nucleótidos entre los marcadores son más notables, lo cual hace relación con el hecho de que son de diferente Orden.

El hecho de que el sitio de restricción para la enzima *Ddel* no esté presente en el marcador CHD-Z, aunado a la pérdida del mismo en el marcador CHD-W de los crácidos, sugiere que este sitio de restricción está abierto a mutaciones, por lo que es probable que esta forma de discriminación no esté conservada en todas las aves no ratites. Si los sitios discriminatorios conocidos faltan en el CHD-W y el CHD-Z, se puede clonar y secuenciar el marcador CHD de la especie e identificar nuevos sitios.<sup>18</sup>

Por otro lado, mientras que diferencias en longitud en dos copias de secuencias codificantes altamente conservadas pueden ser raras, tales diferencias pueden existir en intrones.<sup>26</sup> Cabe la posibilidad de que la longitud del intrón de secciones homólogas de los marcadores CHD-W y CHD-Z permita establecer una diferencia en todas las aves no ratites. En este caso, se descarta a la Familia Cracidae, al menos a *Crax rubra* y *Penelope purpurascens*, así como *Oreophasis derbianus*, previamente reportado, ya que la visualización de las secuencias de ambos marcadores sexuales en estas especies a través de un

gel de poliacrilamida al 8%, mostró que el intrón conserva el mismo tamaño en ambos marcadores.

Por lo tanto, es necesario el análisis de más especies tanto de la Familia Cracidae como de las demás Familias que forman parte del Orden Galliformes, así como los demás Órdenes que integran la Clase Aves, para establecer el posible Orden evolutivo de las especies de aves.

Con respecto a las aves ratites, no existe evidencia que indique la presencia de marcadores ligados al sexo que formen parte de genes, como el CHD.<sup>18, 26</sup> Una posible explicación del fracaso de la detección de los mismos en este grupo, es que los cromosomas sexuales de las aves no ratites comenzaron a diferenciarse después de la separación de las ratites.<sup>35</sup> Sin embargo, al menos en *Struthio camelus*, la identificación de marcadores moleculares ligados al cromosoma W permite el diagnóstico del sexo de polluelos y aves juveniles.<sup>31, 36</sup> Incluso, el sexado de embriones, antes de que las diferencias morfológicas entre macho y hembra se hayan desarrollado, es posible por medio de este tipo de tecnología molecular.<sup>37, 38</sup>

## CONCLUSIONES

1. Ambos procedimientos universales para el sexado de aves no ratites funcionaron satisfactoriamente para las especies *Amazona autumnalis*, *Amazona oratrix*, *Ara macao*, *Ara militaris*, *Aratinga canicularis*, *Aratinga holochlora*, *Cyanoliceus patagonius* y *Rhynchopsitta pachyrhyncha* de la Familia Psittacidae (*Ara macao* y *Ara militaris* fueron sexadas en un estudio previo por medio de la técnica de digestión).
2. Las modificaciones encontradas en el gen CHD-W de *Oreophasis derbianus* también se determinaron en *Crax rubra* y *Penelope purpurascens*. En las especies *Penelopina nigra* y *Ortalis vetula* no se pudo establecer esto, puesto que sólo se dispuso de muestras de machos. Sin embargo es posible que tales modificaciones se presenten a nivel de la Familia Cracidae.
3. El sexado de *Struthio camelus* fue posible por medio del uso de marcadores moleculares ligados al cromosoma W específicos para la Familia Struthionidae.

## REFERENCIAS

1. Rodríguez de la Fuente, F. (1970) Enciclopedia Salvat de la Fauna. Tomo 9/Australia e Islas. Salvat Editores de México, S. A. 129-153.
2. NOM-Ecol-059-1994.
3. Estudillo-López, J. (1978) Consideraciones sobre los crácidos mexicanos. México. 1-58.
4. Estudillo-López, J. (1981) Introducción a la Familia Cracidae. Memorias del Primer Simposio Internacional de la Familia Cracidae. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 14-34.
5. Shetty, S., Griffin, D.K. & Graves, J.A. (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.*, 7(4): 289-95.
6. De La Maza-Benignos, M. (1993) Estudio de Factibilidad Técnica para la Producción Intensiva de Avestruces (*Struthio camelus* L.) con fines Comerciales en México. Tesis de Licenciatura Inédita. División de Agricultura y Tecnología de Alimentos. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. México. 1-61.
7. Rodríguez de la Fuente, F. (1970) Enciclopedia Salvat de la Fauna. Tomo 1/África (Región etiópica). Salvat Editores de México, S. A. 143-161.
8. <http://www.oronegro.com.mx>
9. Madariaga-Campos, M. & Yerena de Vega, M. (1981). Estudio preliminar de los cromosomas de los géneros Crax, Mitu y Pauxi. Memorias del Primer

Simposio Internacional de la Familia Cracidae. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 62-71.

10. Griffiths, R. Sex identification in birds. En prensa.
11. Burr, E.W., Huchzermeyer, F.W. & Riley, A.E. (1981) Laparoscopic examination to determine sex in monomorphic avian species. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 52(1): 45-7.
12. Griffiths, R. & Tiwari, B. (1993) The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8324-26.
13. Karp, G. (1998) Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos. Capítulo 12. McGraw-Hill Interamericana. México. 501-504.
14. Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.*, 15(5): 199-203.
15. Mueller, U.G. & Wolfenbarger, L.L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14(10): 389-394.
16. Ellegren, H. (2000) Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Ecol. Evol.*, 15, 188-192.
17. Griffiths, R. & Tiwari, B. (1995) Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 375, 454.
18. Griffiths, R., Daan, S. & Dijkstra, C. (1996) Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 263, 1251-1256.
19. Griffiths, R. & Korn, R.M. (1997) A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197, 225-229.

20. Delmas, V., Stokes, D.G., & Perry, R.P. (1993) A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SW12-like helicase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2414-18.
21. Tran, H.G., Steger, D.J., Iyer, V.R, & Johnson, A.D. (2000) The chromo domain protein Chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *The European Molecular Biology Organization*, 19(10): 2323-2331.
22. Bermúdez-Humarán, L.G. (1998) Estandarización de una técnica molecular para la determinación del sexo de aves monomórficas en peligro de extinción del género *Ara*. Tesis de Licenciatura Inédita. Escuela Superior de Biología. Universidad Juárez del Estado de Durango. Gómez Palacio, Dgo., México.
23. Bermúdez-Humarán, L.G., García-García, A., Leal-Garza, C.H., Jaramillo-Rangel, G., & Montes de Oca-Luna, R. (2001) Molecular sexing of monomorphic endangered *Ara* birds (Enviado a publicación).
24. Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R. (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.*, 7(8): 1071-5.
25. Chávez-Zamarripa, P. (2001) Desarrollo de una estrategia molecular para la identificación del sexo del ave monomórfica en peligro de extinción *Oreophasis derbianus*. Tesis de Licenciatura Inédita. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
26. Ellegren, H. (1996) First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 263, 1635-1641.

27. Takagi, N., Itoh, M. & Sasaki, M. (1972) Chromosome studies in four species of Ratitae (Aves). *Chromosoma*, 36, 281-291.
28. Benirschke, R.J., Sekulovich, R.E. & Risser, A.C. (1976) The chromosomes of Darwin's rhea (*Pterocnemia p. Pennata*, Aves). *Chrom. Inform. Serv.*, 21: 13-14.
29. Ansari, H.A., Takagi, N. & Sasaki, M. (1988) Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet. Cell Genet.* 47: 185-188.
30. Ogawa, A., Murata, K. & Mizuno, S. (1998) The location of Z- and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosome of the ostrich and the emu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4415-18.
31. Griffiths, R. & Orr, K. (1999) The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Mol. Ecol.*, 8(4): 671-4.
32. <http://www.ucm.es/info/genetvet/osex1.htm>
33. Taberlet, P. & Bouvet, J. (1991) A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk*, 108:959-60.
34. Sanger, F., Niclen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-67.
35. Fridolfsson, A.K., et al. (1998) Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8147-8152.

36. Bello, N. & Sánchez, A. (1999) The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Mol. Ecol.*, 8(4): 667-9.
37. Clinton, M. (1994) A rapid protocol for sexing chick *embryos* (*Gallus g. domesticus*). *Anim. Genet.*, 25(5): 361-2.
38. D' Costa, S. & Petite, J.N. (1998) Sex identification of turkey embryos using a multiplex polymerase chain reaction. *Poult. Sci.*, 77(5): 718-21.

