



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evidencias de dimorfismos sexual en *Xenopipo holochlora litae*, una especie de Píprido del Noroccidente del Ecuador**

**Hernán Gonzalo Álvarez Barriga**

**Proyecto Final presentado como requisito para la obtención del título de Licenciatura en Biología**

**Quito, Enero de 2010**

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROVACION DEL PROYECTO FINAL**

**Evidencias de dimorfismos sexual en *Xenopipo holochlora litae*, una especie de Píprido del Noroccidente del Ecuador**

**Hernán Gonzalo Álvarez Barriga**

David Romo, PhD.  
Director de Proyecto Final

.....

Stella de la Torre, PhD.  
Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, Enero de 2010

**© Derechos de autor**  
**Hernán Gonzalo Álvarez Barriga**  
**2010**

## **Agradecimientos**

Agradezco especialmente al Dr. Jordan Karubian por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, brindarme su conocimiento y permitirme utilizar la información recolectada en estudios anteriores. Agradezco al Dr. Thomas Smith y todo su equipo de trabajo en el Centro de Investigación Tropical (CTR) en la Universidad de California Los Angeles (UCLA) por permitirme utilizar sus laboratorios y toda la supervisión y consejos brindados durante el trabajo de laboratorio. Agradezco al Dr. David Romo por todos los consejos, apoyo y soporte brindado durante todos estos cuatro años, ya que me han sido de mucha utilidad para finalizar esta etapa de mi vida. Finalmente, agradezco a mi familia porque sin ellos no hubiera tenido la oportunidad de tener una buena educación.

## Resumen

El saltarín verde (*Xenopipo holochlora litae*) es una de las especies menos conocidas dentro de la familia Pipridae. Hasta el momento se tiene muy poca información acerca de su biología básica y su comportamiento reproductivo todavía es desconocido. Más de 40 especies de Pípidos son conocidos por su alto dimorfismo sexual. El saltarín verde carece de un dimorfismo sexual aparente. El presente estudio utilizó marcadores moleculares para identificar el sexo de 64 individuos provenientes de la Reserva Biológica Bilsa ubicada al noroccidente del Ecuador, provincia de Esmeraldas. La identificación del sexo permitió luego comparar medidas morfológicas (tarso, cola, ala, alto del pico, ancho del pico y culmen expuesto) entre machos y hembras. Se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas (t de Student) entre machos y hembras, siendo los machos mas grandes corporalmentes (largo del ala, tarso y cola) y teniendo las hembras picos más grandes que los machos (largo, ancho y culmen expuesto). El análisis de componentes principales sugiere que el 94% de la variación entre machos y hembras está explicada por el tamaño del ala y la cola. Se sugiere que el tamaño más grande de los machos puede estar explicado por un origen evolutivo a partir de pípidos que hacen leks. El tamaño del pico de las hembras podría ser una respuesta evolutiva a la necesidad de captar una base más grande de alimento, pues éstas son las encargadas de todo el cuidado parental. Finalmente la marcada diferencia del tamaño del ala y la cola podrían servir como una herramienta para identificar machos de hembras en el campo.

Paralabras clave: Pípidrae, Xenopipo, manakins, saltarines, dimorfismo sexual, leks,

## Abstract

The green manakin (*Xenopipo holochlora litae*) is one of the lesser known species within the family Pipridae. So far, we know very little about its basic biology and we do not know anything about its reproductive behavior. More than 40 species of this family are well known for their high sexual dimorphism. The green manakin do not present sexual dimorphism. This study used molecular markers to identify the sex of 64 individuals from Bilsa Biological Reserve, located to the northwest of Ecuador, Esmeraldas province. The identification of the sex allowed me to compare morphological measurements (tarsus, tail, wing, top of the peak width of the peak and summit above) between males and females. I found that there are statistically significant differences (t test) between males and females. Males have larger in corporal mass (length of wing, tarsus and tail), but females have larger bill than males (length, width and exposed culmen). Principal component analysis suggested that 94% of the variation between males and females is explained by the size of the wing and tail. It is suggested that the larger size of males may be explained by an evolutionary process of the Manakin leks origin. The bill size of females could be an evolutionary response to the need to get a larger amount of food, since they are responsible for all parental care. Finally the marked difference in the size of wing and tail could serve as a tool to identify males from females in the field.

Keyword: Pípidrae, Xenopipo, Manakins, sexual dimorphism and leks

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS:</b> .....	<b>5</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>6</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>10</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>16</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>17</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>18</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>20</b>

## Introducción

Los Saltarines o también conocidos como “Manakins” en inglés, son un extenso grupo de aves pertenecientes a la familia Pipridae que se encuentra conformada por 58 especies (Snow, 2004). De todas éstas, sólo 25 han sido estudiadas y se conoce algo de su comportamiento (Fuente). Sin embargo, sólo de *Manacus manacus*, *M. vitellinus*, *Pipra mentalis*, *P. erythrocephala*, y *Chiroxiphia pareola* se conoce con cierta profundidad diferentes aspectos de su historia natural. Del mismo modo, *Xenopipo holochlora* es la especie de esta familia de la que menos se conoce su historia natural. Dentro del Ecuador están registradas dos subespecies: *Xenopipo holochlora litae* al Occidente y *Xenopipo holochlora holochlora* el Este (Ridgely & Greenfield 2001). El rango de distribución que estas dos subespecies poseen es relativamente amplio. *X. Holochlora litae* se extiende desde Esmeraldas (Chocó) hasta la parte Occidental de Imbabura (Ridgely & Greenfield, 2001), mientras que *X. Holochlora Holochlora* tiene un rango de distribución que va desde el Noreste de la cordillera hasta el Sureste en la vía de Maxus, Pompeya (Ridgely & Greenfield 2001). Estas especies han sido consideradas como no comunes pero fáciles de observar y prefieren hábitat de bosque secundario (Ridgely & Greenfield, 2001).

Los pípidos han logrado adaptarse a los Neotrópicos principalmente a las zonas de bosques bajos tropicales. Existen algunas excepciones que se registran viviendo en los subtrópicos de los Andes como por ejemplo el saltarín alidorado (*Masius chrysopterus*). De la misma manera el saltarín de yelmo (*Antilophia galeata*) y el saltarín negro (*Xenopipo atronitens*), que viven en lugares atípicos con respecto a los miembros de su familia como son en los bosques de sabana y pantanal de Brazil (Snow, 2004). Algunas especies como los del género *Lepidothrix* son extremadamente selectivos para sus microhábitats y prefieren únicamente lugares húmedos. Otras, como los del género

*Manacus* prefieren bosques más disturbados y secundarios, mientras que las especies de *Xenopipo* se encuentran en bosques primarios, secundarios y alterados de los bosques tropicales. Sin embargo, estos últimos tienen una preferencia por microhábitats secundarios (Mena, 2009). El rango de distribución que poseen estas aves va desde el centro de México hasta el norte de Argentina (Snow, 2004).

Dentro del bosque, los saltarines ocupan el dosel bajo y medio para todas sus actividades. Comúnmente se los encuentra en lugares donde la vegetación es abundante y donde los rayos solares no son muy intensos. Su dieta se encuentra restringida a frutos pequeños e insectos. Forman parte de su dieta principalmente plantas de las familias de Melastomataceae y Rubiaceae cuyos frutos suelen ser abundantes en el bosque (Mena, 2009). En cuanto a insectos comen Ortópteros, larvas de Coleópteros y Lepidópteros (Mena, 2009).

Los saltarines son aves solitarias y sólo en la época de reproducción los individuos de los dos sexos se juntan. Durante esta época, los machos se reúnen en sitios denominados leks o arenas. Dentro de la arena, los machos desarrollan una serie de movimientos complejos mezclados con cantos, que varían considerablemente entre las especies, para tratar de impresionar a la hembra y así poder copular. Varias teorías e investigaciones apoyan la idea de que la formación de un lek se puede explicar como un producto de la selección sexual. Más de 40 especies de pípidos son bien conocidos por su alto dimorfismo sexual, formación de arenas y desarrollo de despliegues por parte de los machos (Prum, 1994).

Esta gran presión de selección sexual ha creado diferencias morfológicas muy marcadas entre los sexos de esta familia. Las principales diferencias morfológicas están presentes en tamaño corporal, coloración del plumaje, especialización de plumas y en los cantos. Cada una de estas diferencias morfológicas se cree que se han desarrollado como fruto de la

selección sexual y de una combinación de los diferentes factores ecológicos que aún se desconocen. Por ejemplo, en el caso de la coloración del plumaje y el tamaño corporal, Owens y Hatley (1998) han demostrado que estos dos tipos de dimorfismos sexuales no sigue un mismo patrón de evolución. Ellos sugieren que la diferencia de tamaño entre machos y hembras se encuentra más relacionada con una competencia dentro del mismo sexo y que el dimorfismo con respecto a la coloración de plumaje es afectada por una decisión oculta de las hembras. Las razones que usan las hembras para elegir el macho todavía representa una incógnita para los investigadores no sólo en este grupo.

En todas las aves que tienen este sistema de reproducción se ha visto que la hembra es la encargada del nido y del cuidado parental. El macho no aporta para nada con el cuidado de las crías. Pero a cambio parece que invierten gran energía en la elaboración de displays y la competencia con otros machos por defender el área de su lek. Las arenas representan una fracción pequeña del territorio total de los saltarines, sin embargo Snow (1962) asegura en base a sus observaciones que los machos pasan entre 70 a 90% del tiempo del día dentro del lek, lugar que incluso lo ocupan para dormir. Las arenas son lugares que están ubicados estratégicamente para interceptar el paso de las hembras y por lo tanto deben cuidar que otros machos no los utilicen. (Snow, 1962).

Por el hecho que están liberados de responsabilidades de cuidar a los polluelos, los machos no están limitados por el número de parejas que pueden tener dentro de un año. En teoría, un macho puede reproducirse con docenas de hembras y en realidad los estudios hechos hasta ahora sugieren que hay diferencias muy fuertes entre los machos exitosos (que pueden aparearse hasta con 15 hembras) y que la mayoría de machos no logran aparearse (Snow 1962).

Dentro de la familia Pipridae, la formación de leks es la característica más sobresaliente. Prum presenta un análisis filogenético en base a la formación de leks asumiendo que es una característica ancestral (Prum, 1994). De todas estas especies únicamente *Antilophia galeata*, hasta el momento que es la única que aparentemente ha perdido este comportamiento posiblemente por su preferencia por hábitats con bosque húmedo ribereños entre los bosques de sabana seca en el Sur y centro de Brazil, y al Este de Bolivia y Paraguay (Prum, 1994). Debido a estas condiciones, *A. galeata* ha evolucionado en ambientes que le obliga a una agrupación no voluntaria. Como resultado de esta adaptación, las hembras construyen los nidos dentro de los territorios de los machos creando parejas por períodos largos de tiempo y así eliminando la necesidad de formar leks (Prum, 1994). A pesar de que machos y hembras están junots, la hembra sigue siendo la encargada exclusiva del cuidado parental (Prum, 1994).

Por otro lado, una investigación realizada por Mena (2009) acerca de la “Biología básica del saltarín verde (*Xenopipo holochlora*) en el Chocó ecuatoriano, reserva biológica Bilsa, provincia de Esmeraldas”, sugiere que el saltarín verde tampoco tiene leks y que esta subespecie no presenta rasgos morfológicos diferentes entre macho y hembra evidentes. Tampoco se pudo detectar una diferencia entre el canto de los individuos que determinen su sexo. Según esta investigación se tienen registrados tres tipos de vocalizaciones que fueron categorizados de acuerdo al momento y las circunstancia en las que el ave produjo la vocalización. La primera vocalización se la define como de alarma ante cualquier amenaza o contacto entre individuos de la misma especie. La segunda es un canto de llamada que se la escucha cuando las aves tienen un nido activo y se comunican con sus polluelos. Finalmente, la tercera vocalización es de agitación o enojo y ocurre cuando otro

individuo invade un territorio. De acuerdo a Mena, no existen reportes de otros tipos de vocalizaciones para *Xenopipo holochlora litae* (Mena, 2009).

## **Objetivos:**

### **- General:**

- Buscar evidencias de dimorfismo sexual de *Xenopipo holochlora litae*.

### **- Específicos:**

- Extraer, amplificar y secuenciar ADN de muestras de sangre y de plumas.
- Identificar el sexo usando marcadores moleculares.
- Determinar si existe una diferencia morfométrica de varias características observadas entre machos y hembras.

## **Justificación**

*Xenopipo holochlora* pertenece al grupo *Xenopipo* que incluye a cuatro especies más: *X. flavicapilla*, *X. uniformis*, *X. unicolor* y *X. atronitens*. Estos cinco saltarines son el grupo del que menos información se tiene dentro de la familia Pipridae, recalando que no se absolutamente nada sobre el comportamiento reproductivo de este grupo. Existen algunos estudios filogenéticos de la familia Pipridae acerca del desarrollo del sistema de reproducción usando “leks” y dentro de dicho estudio fue imposible clasificar el grupo *Xenopipo* debido a la falta de información (Prum, 1994).

*Xenopipo holochlora* ha sido clasificada como una ave no común dentro de la familia por la falta aparente de un dimorfismo sexual y el desconocimiento de su comportamiento de apareamiento. Si tomamos en cuenta que su rango de distribución es amplio y se lo puede

encontrar en los bosques tropicales del occidente y oriente, resulta extraño que no haya sido estudiada con detalle. (Ridgely & Greenfield, 2001).

Los pocos registros que se tienen y un estudio realizado acerca de la biología básica de esta ave no documentan un comportamiento de formación de arenas o leks. Esto sugiere en primera instancia que el saltarín verde carece de este comportamiento y que las diferentes condiciones ambientales y ecológicas le han llevado de una u otra manera a evolucionar de modo distinto a los otros miembros de la familia Pipridae.

Este estudio pretende esclarecer si existe o no un dimorfismo sexual que a lo mejor no es aparente a los observadores humanos, pero que sí podría ser detectado por las hembras de la especie. De ser esto cierto, deberemos buscar luego una explicación diferente para comprender por qué esta especie no utiliza leks o arenas.

## **Metodología**

Para desarrollar este proyecto se utilizaron 52 muestras de sangre y 22 pares de plumas de diferentes individuos de *Xenopipo holochlora litae* que estaban depositadas en el Centro de Investigaciones Tropicales (CTR) de la Universidad de California Los Ángeles (UCLA) a través del Doctor Jordan Karubian. Las muestras de sangre y las plumas que se utilizaron provienen de la Reserva Ecológica Bilsa, ubicada al Noroccidente del Ecuador en la provincia de Esmeraldas. La recolección del material no fue contemplada dentro de la propuesta del proyecto, sin embargo cabe explicar que las mismas fueron colectadas como parte de un proyecto de estudio ecológico a largo plazo durante los años 2004, 2005 y 2006. Desde entonces las muestras han permanecido en el CTR en UCLA, Estados Unidos, guardadas en nitrógeno líquido a una temperatura de -80°C.

### ***Extracción de ADN y Amplificación***

El primer paso fue la extracción de ADN que se realizó con la ayuda de un protocolo (*QIAamp DNA Mini kit*). Una vez que se extrajo el ADN se utilizó la técnica de PCR a tiempo real para amplificar las cadenas de ADN y obtener una mejor calidad de los resultados. La técnica de la PCR (*Polimerase Chain Reaction*) es usada para amplificar cadenas específicas de ADN utilizando cambios de temperatura y una serie de reactivos que van a interactuar con el ADN para producir varias copias del mismo. Los reactivos están constituidos por: 1) una enzima conocida como *taq polimerasa*, capaz de soportar altas temperaturas y es la responsable de la amplificación de las cadenas; 2) nucleótidos libres conocidos como *dNTPs*, que van a ser utilizados para construir las nuevas cadenas; 3) un par de marcadores moleculares, que van a identificar las cadenas que se quiere amplificar; 4) agua purificada ( $H_2O$ ) y cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) que van a servir como cofactores de la *taq polimerasa* y 5) un buffer para mantener el pH adecuado de la reacción. La tabla 1 indica los reactivos de la PCR con sus respectivas medidas y tiempos utilizados para amplificar una muestra.

### ***Identificación de los cromosomas sexuales Z y W***

Al momento de preparar la reacción de PCR se utilizaron marcadores moleculares específicos que ayudaron a identificar el gen *chromo-helicase de unión al ADN (CHD)* presente en los dos cromosomas sexuales (Camacho et al., 2008). Las aves a diferencia de los humanos, presentan dos cromosomas homólogos (ZZ) y las hembras presentan dos cromosomas heterogéneos (ZW) (Camacho et al., 2008). Por lo tanto, lo que esperamos encontrar en el caso de los machos es una sola banda y en el caso de las hembras dos bandas, uno para el cromosoma Z y otro para el cromosoma W. Los marcadores moleculares que se utilizaron para amplificar estos cromosomas fueron *sex 2550F* y *sex*

*m5z1R*. Luego de la amplificación, con la ayuda de geles de agarosa (2%) pudimos visualizar los cromosomas e identificarlos por bandas (una banda para machos y dos bandas para hembras).

### ***Secuenciación de las cromosomas Z y W***

Seguido de esto se secuenció una banda correspondiente al cromosoma W y otra correspondiente al cromosoma Z. La finalidad de esto fue comprobar que las bandas que estuvimos observando fueron las correctas. Para secuenciar las bandas se tuvo que localizar cada una de éstas en el gel de agarosa, luego se las corta cuidadosamente y la muestra se introduce en microtubos de 4ml para centrifugarlos junto con 400µl de una solución buffer ABD. La mezcla fue puesta a 55°C hasta que estuvo completamente disuelta. Una vez que se disolvió el gel se utilizó el protocolo que resume la tabla 2. Los productos de la reacción completa fueron enviados a un laboratorio comercial para que realicen la secuencia automáticamente con la ayuda de una computadora. Los resultados de las secuencias pudimos obtenerlas por Internet a través del sitio de web: [www.genetics.ucla.edu/webseq](http://www.genetics.ucla.edu/webseq), con la respectiva autorización del laboratorio del Dr. Thomas Smith en UCLA. Los archivos fueron abiertos con la ayuda de un programa conocido como 4peak. Dentro de este programa cada una de las secuencias de los cromosomas pueden ser editadas, ya que en algunos casos existen errores de lectura que se deben a la baja concentración de nucleótidos en un punto en particular. Luego de esto se procedió a comparar la secuencias obtenidas con otras secuencias preestablecidas dentro de un programa conocido como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Este programa es una base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) el cual contiene secuencias de pares de bases de varios segmentos de DNA de diferentes animales y plantas, incluyendo humanos. Por lo tanto, las secuencias de mis muestras del

cromosoma W y Z fueron comparadas con secuencias del cromosoma W y Z de otras especies de aves, para comprobar que se amplificaron o no los segmentos de ADN correctos.

### ***Determinación de diferencias morfométricas entre machos y hembras***

Durante la recolección de las muestras de sangre y plumas, también se recolectaron medidas morfológicas (Tarso, ala, cola, alto del pico, ancho del pico y culmen expuesto) de todos estos individuos y con la autorización del Dr. Jordan Karubian y el CTR se pudo acceder a esta base de datos. Las medidas morfológicas fueron tomadas por una sola persona de la siguiente manera:

- El tarso, desde la parte inferior del muslo hasta el comienzo de la pata.
- El ala, desde el comienzo del pecho hasta el final de la pluma más larga.
- La cola, desde el comienzo de la cola hasta la pluma más larga.
- El alto del pico, la medida más alta de todo el largo del mismo.
- El ancho del pico, de igual forma se tomó la medida más ancha de todo el largo del pico
- El culmen expuesto, que fue la longitud del pico desde su base hasta el extremo en la parte superior del mismo.

Para realizar la comparación de todas las medidas morfométricas se elaboraron gráficos de frecuencias. Estos gráficos ayudaron a observar si cada medida morfológica tenía una distribución normal o si su distribución tiende hacia los extremos. Seguido a esto se agrupó las medidas morfológicas de acuerdo al sexo y se calculó el promedio, error estándar y se realizó una prueba “t de student”. Esto sirvió para determinar si cada una de

las medidas morfológicas difieren en tamaño en cada sexo. Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales para determinar cual o cuales de las variables aporta más a explicar las diferencias entre machos y hembras.

## **Resultados**

### ***Extracción de ADN***

Del total de 75 muestras de sangre y plumas que se utilizaron para extraer ADN, únicamente de 64 muestras fue posible extraer y amplificar el ADN. Cuando se corrió cada una de las muestras amplificadas en los geles de agarosa se obtuvo dos tipos de bandas. La primera banda fue de un tamaño de 500pb mientras que la segunda fue de 400 pb (Figura 7). De las 64 muestras se encontró que 39 eran machos (una banda) y 25 eran hembras (dos bandas). Al obtener la secuencia de las bandas correspondientes al cromosoma W y Z se editó la secuencia con la ayuda del programa 4peak (Figura 8). La banda CHDW se comparó con la secuencias de nucleótidos en la base de datos BLAST se encontró que la secuencia de este cromosoma coincide en un 99% con el gen CHD1W en el cromosoma W de la especie *Nymphicus hollandicus*. Al comparar la banda CHDZ se obtuvo que esta secuencia coincide en un 90% con el gen CHD1Z del cromosoma Z de la especie *Amazona oratrix*. Estos dos porcentajes nos confirman que las bandas observadas en el gel si corresponden a segmentos del cromosoma W y Z.

Cuando se calculó el promedio y el error estándar de las medidas morfométricas de cada uno de los aspectos morfológicos (tarso, ala, cola, alto del pico, ancho del pico y culmen expuesto) se obtuvo que, el tarso es mas grande en los machos ( $15.20 \pm 0.17$ ;  $n = 39$ ) que en las hembras ( $14.64 \pm 0.22$ ;  $n = 25$ ). Las alas son mas largas en los machos ( $68.42 \pm 0.71$ ;  $n = 39$ ) que en las hembras ( $65.92 \pm 0.88$ ;  $n = 25$ ). La cola es mucho más larga en los

machos ( $47.46 \pm 0.41$ ;  $n = 39$ ) que en las hembras ( $44.00 \pm 0.51$ ;  $n = 25$ ). En cuanto al alto del pico, en las hembras ( $4.46 \pm 0.06$ ;  $n = 25$ ) es más grande que en los machos ( $4.30 \pm 0.05$ ;  $n = 39$ ). El pico de las hembras es más ancho ( $5.53 \pm 0.17$ ;  $n = 25$ ) que el pico de los machos ( $5.02 \pm 0.13$ ;  $n = 39$ ) y el culmen expuesto es más grande en las hembras ( $11.20 \pm 0.15$ ;  $n = 25$ ) que en los machos ( $10.76 \pm 0.12$ ;  $n = 39$ ). (Tabla 3).

Al realizar una prueba t de estudiante se encontró que la diferencia en el tamaño del tarso entre machos y hembras sí es significativa ( $t = -1.98$ ,  $P = 0.0528$ ). Las diferencias del tamaño del ala ( $t = -2.46$ ,  $P = 0.0167$ ) y la cola ( $t = -5.38$ ,  $P < 0.0001$ ) si son significativas entre los dos sexos. Las hembras sí tienen un pico significativamente más profundo ( $t = -2.20$ ,  $P = 0.0329$ ) y ancho ( $t = 2.51$ ,  $P = 0.0151$ ) que los machos, al igual que el culmen expuesto ( $t = 2.18$ ,  $P = 0.0345$ ) (Tabla 3).

Por otro lado, los resultados del análisis de componentes principales sugieren que de todas las variables medidas, la cola y el ala son las que más explican la diferencia entre machos y hembras. Por un lado, el ala independientemente de las demás variables explican el 75% de la diferencia; mientras que por otro lado, la cola, independientemente explica el 19% de la diferencia morfológica entre machos y hembras (Figura 9 y tabla 4).

## **Discusión**

### ***Extracción de ADN***

De las 74 muestras que se pensó utilizar para extraer el ADN en un principio, sólo se pudo trabajar con 64. De estas 10 muestras restantes, 5 fueron de sangre y 5 de plumas. No es posible saber exactamente por qué falló la extracción del ADN, pero es muy probable que al momento de extraer el ADN, se cometió algún error en uno o más pasos del protocolo. Otra posibilidad es que durante la extracción alguno de los materiales se contaminó

ocasionando que se dañe la muestra de ADN. Un paso para corroborar lo dicho es repetir la extracción de ADN de las muestras fallidas, pero esto no fue posible por falta de tiempo en relación con mi permanencia en el laboratorio del CTR. Es importante aquí indicar que de las 64 muestras que fueron exitosas, las de sangre tuvieron siempre una mejor resolución al momento de observar las bandas en los geles. Es posible que debido al tamaño muy pequeño de las plumas y de la zona de éstas que posee ADN, la concentración de muestra es inferior comparada con la sangre.

### ***Comparación de las medidas morfológicas***

Al haber obtenido el ADN de 64 muestras se pudo separar todos los individuos en 39 machos y 29 hembras. Cuando se comparó las medidas morfológicas entre ambos sexos se observó que sí hay una diferencia entre ellos. Los machos presentan mayor masa corporal que las hembras, mientras que estas últimas poseen picos relativamente más grandes que los machos. El número de muestras obtenidas en este estudio no es lo suficientemente grande. Sin embargo, es lo suficientemente aceptable como para que se pueda distinguir una diferencia marcada entre machos y hembras, los cuales permiten dar iniciales conclusiones que se las puede mejorar en estudios posteriores.

### ***Dimorfismos en el tamaño corporal***

Los resultados del promedio y la desviación estándar de cada una de las medidas demostraron que los machos poseen tarso, cola y ala más grandes que las hembras. Sin embargo, la prueba “t de student” solo confirma las diferencias de la cola y ala. Si tomamos en conjunto estas tres medidas como indicadores de la masa corporal, podríamos atrevernos a sugerir que en efecto los machos son más grandes que las hembras. La formación de leks se basa en una alta selección sexual por parte de la hembra y una fuerte

competencia entre machos, como habíamos indicado anteriormente. Varios estudios apoyan que el inicio del cambio dimórfico entre sexos no es el producto de una selección ecológica, sino más bien de esta selección sexual (Jeht & Marray, 1986). Esta teoría dice que la competencia entre machos ocasiona un incremento en la masa corporal en comparación con las hembras en base a infinidad de ejemplos (Jehl & Murray, 1986; Andersson 1994). Por lo tanto, se podría sugerir que la diferencia en el tamaño corporal de *Xenopipo holochlora litae* tiene su origen en el hecho de que, esta ave es proveniente de una familia que evolucionó de un ancestro común que usaba leks para su reproducción. Con el transcurso del tiempo este patrón dimórfico nunca se perdió.

Por otro lado, Karubian y Swaddle (2001) en un estudio que reconstruyó la morfología ancestral para machos y hembras de un amplio clado de aves, demuestra que, el mayor tamaño de los machos puede ser explicado más bien por una reducción del tamaño de las hembras. El estudio demuestra que esto podría ser verdad para casi el 50% de los casos estudiados. . Ellos sugieren que es incorrecto tratar de explicar el dimorfismo del tamaño corporal basándose en un solo factor selectivo. Considero importante que para tener una explicación más clara de la diferencia en el tamaño corporal de *Xenopipo holochlora litae* es necesario realizar un estudio que reconstruya estados ancestrales que expliquen la direccionalidad de este cambio.

### ***Dimorfismo en el tamaño del pico***

El análisis de los promedios, error estándar y la prueba “t de student” sugieren que el pico es una diferencia morfológica entre sexos en sus tres componentes: largo, ancho y profundidad. Basándome en estudios previos del dimorfismo sexual puedo sugerir dos hipótesis que podrían explicar este suceso. La primera sugiere que el pico de las hembras

se alargó bajo selección natural mientras que la segunda propone que el pico de los machos se acortó por la interacción de diversos factores de selección.

Lo que podría estar pasando con el saltarín verde, desde el punto de vista de la primera hipótesis, es que, el pico de las hembras se ha alargado para facilitar la obtención de comida para sus crías y reponer el gasto energético. Como sabemos *Xenopipo holochlora litae* no tiene un sistema de reproducción que involucre el uso de leks.. A pesar de que los machos si se agrupan con las hembras, éstos no intervienen en ninguna actividad relacionada con el cuidado parental ni la construcción del nido y las hembras son las únicas encargadas de estas actividades (Mena, 2009). Esto sugeriría que las hembras requieren un consumo mayor de alimento para reponer el gran gasto energético y poder alimentar a sus crías al mismo tiempo. El incremento del tamaño del pico resultaría por lo tanto ser una estrategia muy ventajosa para la supervivencia de las hembras pues les permite alcanzar una mayor variedad de alimentos que los machos, reduciendo así la competencia intraespecífica.

Estudios en el Green Woodhoopoe (*Phoeniculus purpureus*) , una ave de Sudáfrica que posee un tamaño corporal semejante entre machos y hembras pero que tiene una gran diferencia morfológica en el tamaño del pico, demostraron que la diferencia en el tamaño del pico es más una reacción adaptativa a la alimentación que un resultado de selección sexual. Los machos poseen picos mucho más grandes que las hembras. Al comparar el tamaño del pico entre machos que tenían éxito reproductivo y los que no lo tenían, no se obtuvo ninguna diferencia significativa. Esto sugeriría que el alargamiento del pico de esta ave no es producto de selección sexual, sino que es mucho más probable que el pico haya evolucionado bajo selección natural para evitar competencia intersexual por

alimento, similar a lo que estaría sucediendo en la especie motivo de este estudio (Radford & du Plessis, 2004).

La segunda hipótesis sugiere que, el pico de los machos se acortó como motivo de selección sexual. Ésta hipótesis está apoyada por una teoría que se conoce como dimorfismo sexual invertido o sus siglas en inglés “RSD” (Swaddle et al., 1999). Dado que la única diferencia morfológica que tiene un crecimiento desproporcionada con relación al cuerpo es el pico, se puede asumir que esto puede ser utilizado como criterio de selección por parte de las hembras al momento de elegir un macho. El estudio de Mena sugiere que a pesar de que los machos no hacen leks, parece que en la época de reproducción, los machos tienen territorios grandes y que las hembras entran anidar dentro de los mismos (Mena, 2009). Un pico más pequeño podría ser una desventaja en la supervivencia similar a las colas grandes de los pavos reales en relación de sus depredadores. Si un macho con pico pequeño es seleccionado por la una hembra, indirectamente estaría seleccionando genes capaces de sobrevivir aún portando una desventaja adaptativa.

Hasta el momento no se tienen estudios de dimorfismos sexual invertido que relacionen el pico de ninguna especie. Sin embargo, existe un patrón novel evolutivo de dimorfismo sexual invertido en dos especies de la familia Maluridae. Este patrón de dimorfismo sexual invertido fue descubierto en el largo de la cola de *Malurus melanocephalus* y *Malurus alboscapulatus* al reconstruir los estadios morfológicos ancestrales de la cola de esta familia (Swaddle et al., 1999). Inicialmente la cola de los machos era más larga que la cola de las hembras, pero luego, la cola de los machos se redujo a la misma velocidad que el tamaño del cuerpo de las hembras se redujo. Esto dio como resultado que las hembras tenga una cola más larga (Swaddle et al., 1999). Esta investigación demostró que la

reducción en la cola de los machos es una característica selectiva durante la reproducción (Swaddle et al., 1999). Sería posible pensar entonces que existe también la posibilidad de que el pico más corto de los machos en los saltarines verdes sea un ejemplo de dimorfismo sexual invertido.

Finalmente, el análisis de componentes principales demostró que el ala y la cola juntas explican el 94% de la diferencia morfológica entre machos y hembras. La falta de un dimorfismo obvio como color o algún tipo de adorno suprime la opción de poder marcar con anillos indicadores de sexo a los especímenes capturados en redes. Estos resultados sugieren que sumando los dos valores podríamos hacer esta distinción en el campo sin necesidad del análisis molecular. Obviamente, antes de aplicar este método, y a medida de precaución se debería repetir el análisis molecular con un grupo más grande y buscar si la diferencia persiste y las magnitudes exactas de la misma.

## **Conclusiones**

- La extracción, amplificación y secuenciación del ADN de muestras de sangre y plumas fue exitosa para la mayoría de muestras.
- Es posible identificar el sexo mediante la utilización de marcadores moleculares puesto que se aislaron genes de las bandas Z y W con más del 95% de certeza.
- Existen patrones de dimorfismo sexual que no son visibles al ojo humano en el saltarín verde.
- Los machos son más grande que las hembras en cuanto a masa corporal, siendo el tamaño del ala y la cola las medidas que más aportan a la diferencia.

- Las hembras poseen picos relativamente más grandes que los machos. Esta diferencia podría ser explicada ya sea por una presión de selección natural intraespecífica debido a la presión de la hembra por alcanzar mayor cantidad de alimento; o, por selección sexual invertida, en cuyo caso a los machos se les redujo el tamaño del pico en la misma medida que a las hembras se les redujo el tamaño del cuerpo.

## **Recomendaciones**

- Utilizar muestras de sangre en lugar de plumas, ya que la resolución en las muestras de sangre es mejor.
- Sería interesante evaluar si en efecto la falta de resultados en ciertas muestras se debe a error humano o a falta de suficiente ADN en la muestra en sí.
- Continuar con estudios de la ecología y etología de *Xenopipo holochlora litae* pues representa un caso bastante extraño dentro de la Familia Pipridae y de los ejemplos de selección natural y sexual.
- Comparar los datos de este estudio con la subespecie oriental de este Xenopipo y con otros miembros del mismo grupo para determinar si existe similitudes o diferencias que permitan esclarecer los patrones evolutivos sugeridos.
- Comprobar la fidelidad de medir el tamaño de la masa corporal o el tamaño del pico para determinar el sexo de esta especie.

## Referencias

Anderson, M. 1994. *Sexual selección*. Princeton University Press.

Camacho, N. E. M., Ramírez, N., Zúñica, B. y Vera, V. 2008. Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta Biol. Colomb.* Vol. 13 No. 3, pp:27-40.

Doucet, Stephanie M., Mennill, Daniel J. y Hill, Geoffrey E. 2007. The Evolution of Signal Design in Manakin Plumage Ornaments. *The American Naturalist*, Vol. 169.

Green, A. J. (2000). The scaling and selection of sexually dimorphic characters: An example using the Marbled Teal. *Journal of Avian Biology* 31:345-350.

Jehl, J. R. y Murray, B. G. 1986. The evolution of normal and reverse sexual size dimorphism in shorebirds and other birds. In *Current Ornithology*, vol. 3 (ed. R. F. Johnstone), pp. 1-86. New York:Plenum.

Karubian, J., y Swaddle, J. P. 2001. Selection on females can create 'larger males'. In *The Royal Society*. 268, 725-728.

Mena, J. P. 2009. Biología Básica del Saltarín verde (*Chloropipo Holochlora*) en el chocó ecuatoriano, reserva biológica Bilsa, Provincia de Esmeraldas. Universidad Central del Ecuador. Informe del Proyecto de Área de Formación Profesional presentado como requisito parcial para optar por el Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Owens, Ian P. F. y Hartley, Ian R. (1998). Sexual Dimorphism in Birds: Why are There So Many Different Forms of Dimorphism? *Biological Sciences*. Vol. 265, No. 1394, pp. 397-407.

Petrie, M. (1988). Intraspecific variation in structures that display competitive ability: Large animals invest relatively more. *Animal Behaviour* 36:1174-1179.

- Prum, Richard O. 1994. Phylogenetic Analysis of the Evolution of Alternative Social Behavior in the Manakins (Aves: Pipridae). *Evolution*, Vol. 48, No. 5, pp. 1675-1675.
- Radford, A. N. & du Plessis, M. A. (2004). Extreme sexual dimorphism in Green Woodhoopoe (*Phoeniculus purpureus*) bill length: A case of sexual selection?. *The Auk* 121(1):178-183.
- Ridgely, R. & P. Greenfield. 2001. *The Birds of Ecuador Status, Distribution and Taxonomy. Volumen I.* Cornell University Press. Ithaca, New York.
- Snow, D. W. 1963. The Evolution of manakin displays. *Proceedings of the International Ornithological Congress*. Vol. 13<sup>th</sup>, pp. 553-561.
- Snow, D. W. (2004). Family Pipridae (Manakins). Pp. 110-169 in: del Hoyo, J., Elliott, A. y Christie, D.A. eds. (2004). *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 9. Cotingas to Pipits and Wagtails. Lynx Edicions, Barcelona.
- Swaddle, J. P., Karubian, J. y Pruett-Jones, S. 1999. A novel evolutionary pattern of reserved size dimorphism in fairy wrens: implications for sexual selection. *Behavioral Ecology*. Vol. 11 No. 3: 345-349.

## Anexos

<b>Material</b>	<b>Volumen</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	30µl
<b>Buffer no MgCl<sub>2</sub></b>	5µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	5µl
<b>dNTPs</b>	5µl
<i>sex 2550F</i>	2.5µl
<i>sex m5z1R</i>	2.5µl
<b>Tag Gold polimerasa</b>	0.25µl

**Tabla 1: Reactivos de la PCR con sus respectivos volúmenes para realizar una reacción de 50ml por cada muestra amplificada.**

<b>Material</b>	<b>Volumen</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2µl
<b>Seq Saber(Sequencing buffer)</b>	2µl
<b>DNA</b>	3µl
<i>sex 2550F/sex m5z1R</i>	1µl
<b>Big dye</b>	1µl

**Tabla 2: Reactivos utilizados para secuenciar cada uno de los segmentos del cromosoma W y Z con sus respectivos volúmenes.**

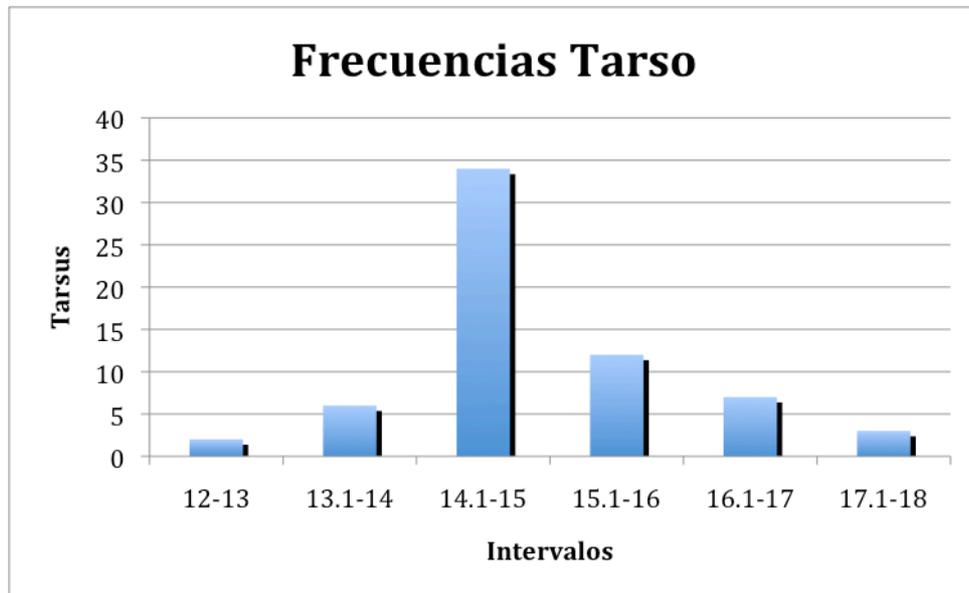
	<b>Machos (n=39)</b>	<b>Hembras (n=25)</b>	<b>t de student</b>
<b>Tarso</b>	15.20 ± 0.17	14.64 ± 0.22	t = -1.98, P = 0.0528
<b>Ala</b>	68.42 ± 0.71	65.92 ± 0.88	t = -2.46, P = 0.0167
<b>Cola</b>	47.46 ± 0.41	44.00 ± 0.51	t = -5.38, P < 0.0001
<b>Alto del pico</b>	4.30 ± 0.05	4.46 ± 0.06	t = -2.20, P = 0.0329
<b>Ancho del pico</b>	5.02 ± 0.13	5.53 ± 0.17	t = 2.51, P = 0.0151
<b>Culmen expuesto</b>	10.76 ± 0.12	11.20 ± 0.15	t = 2.18, P = 0.0345

**Tabla 3: Resultados del promedio, error estándar y t de student para cada uno de las medidas morfológicas del saltarín verde.**

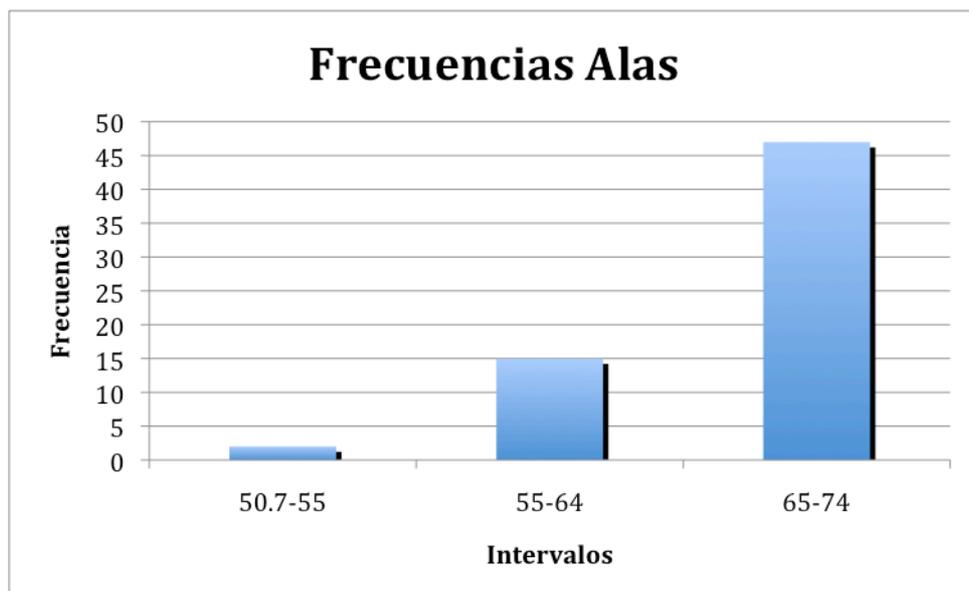
<b>Variable</b>	<b>% individual</b>	<b>% acumulado</b>
<b>Ala</b>	75.395	75.395
<b>Cola</b>	18.507	93.902

**Tabla 4: Resultados análisis de componentes principales que demuestra las dos características más fuertes para separar machos de hembras en base a todas las variables medidas.**

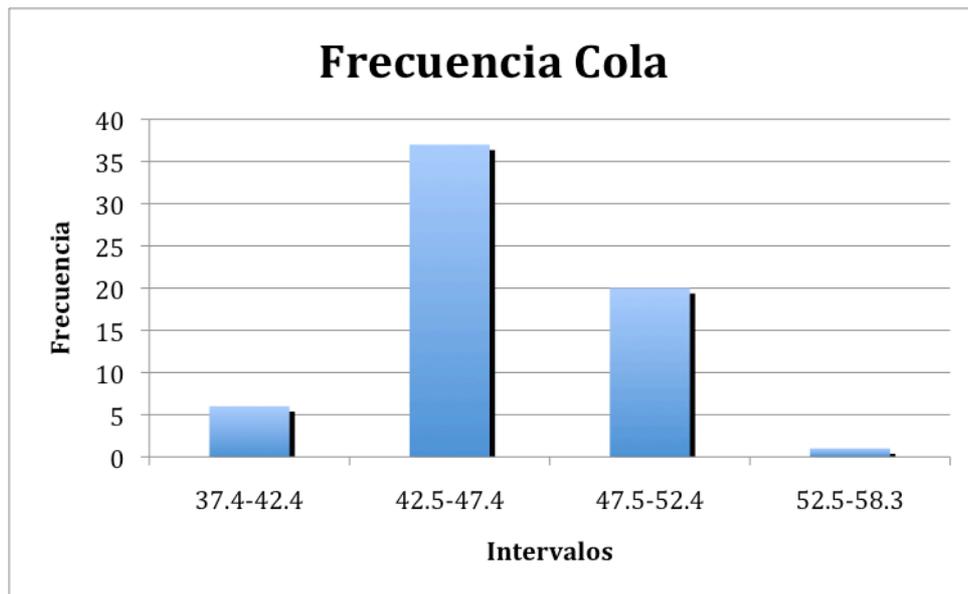
**Figura 1: Tabla de frecuencias para todas las medidas del tarso de los machos y las hembras.**



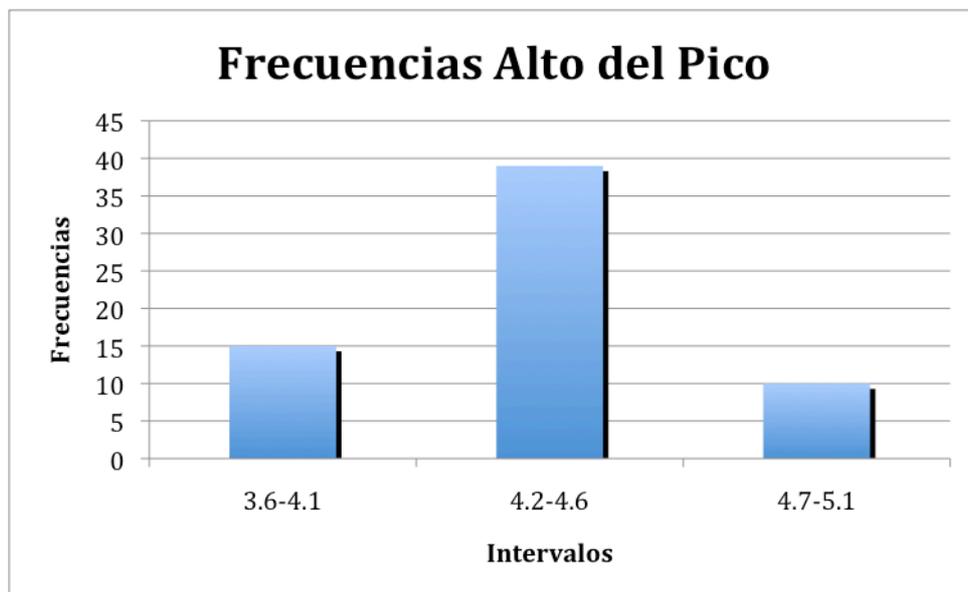
**Figura 2: Tabla de frecuencias para todas las medidas del ala de los machos y las hembras.**



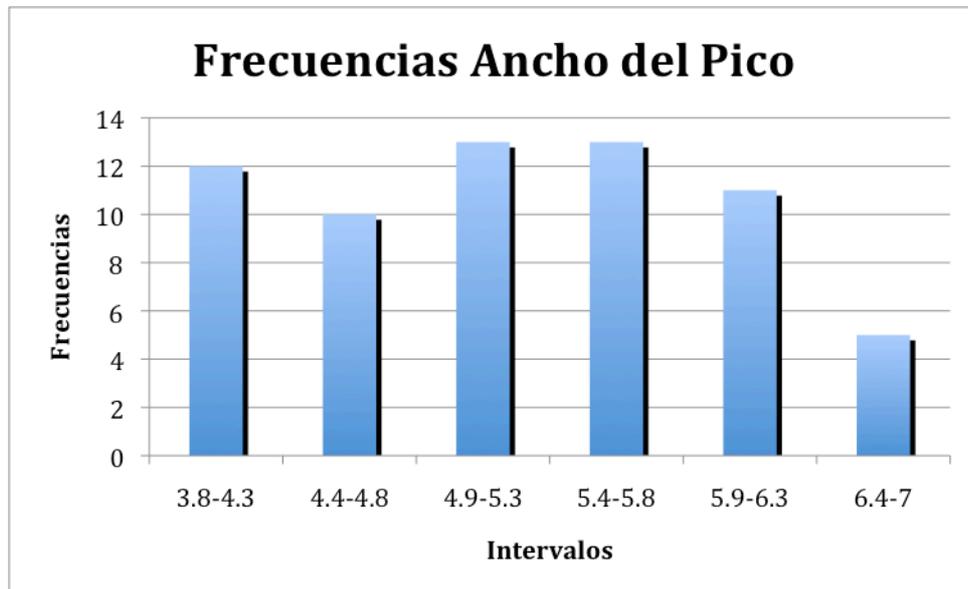
**Figura 3: Tabla de frecuencias para todas las medidas del tarso de los machos y las hembras.**



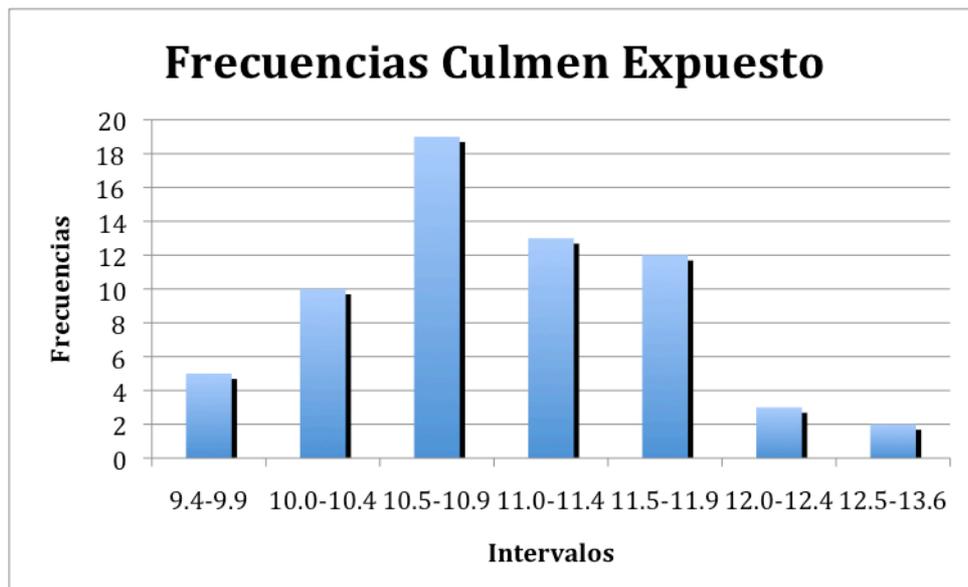
**Figura 4: Tabla de frecuencias para todas las medidas del alto del pico de los macho y las hembras.**



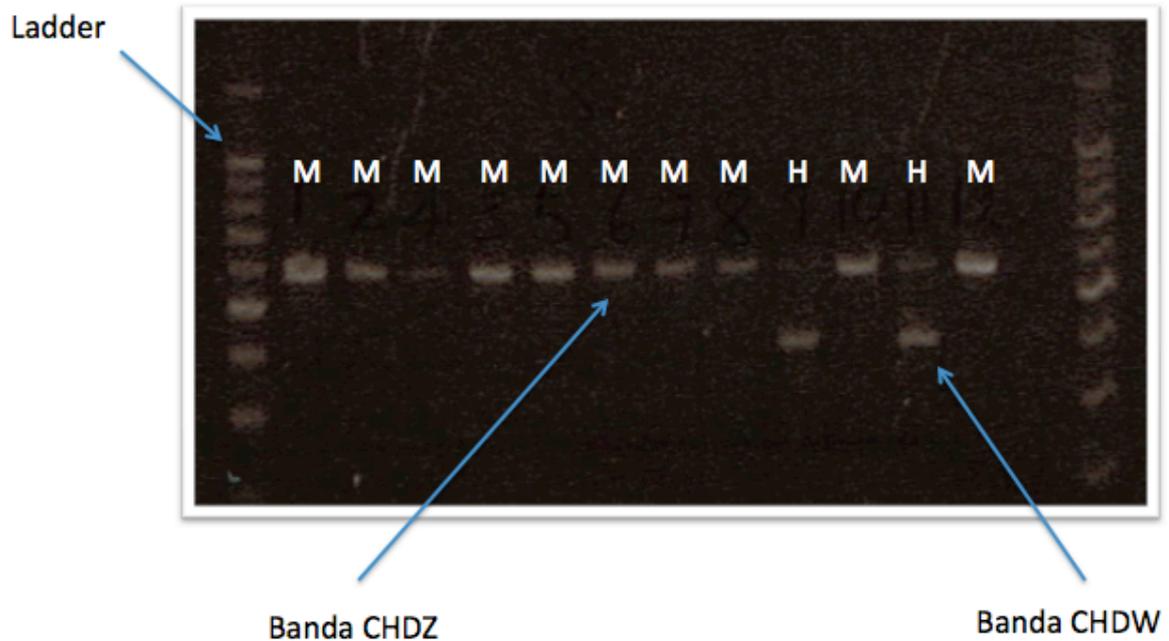
**Figura 5: Tabla de frecuencias para todas las medidas del ancho del pico de los machos y las hembras.**



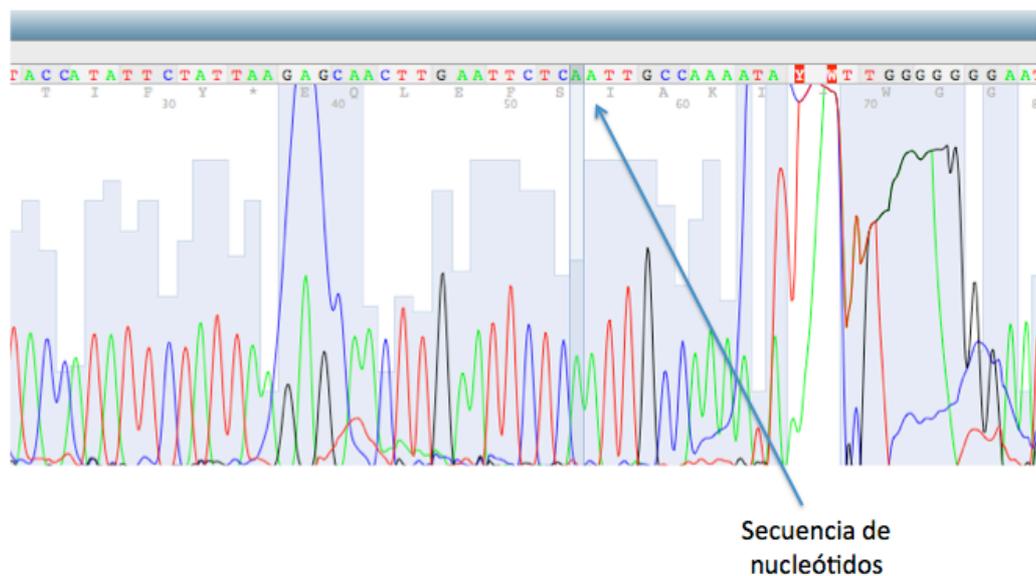
**Figura 6: Tabla de frecuencias para todas las medidas del culmen expuesto de los machos y las hembras.**



**Figura 7: Resultados de geles de agarosa al 2%. Se puede ver la amplificación de los genes CHDZ y CHDW.**



**Figura 8: Resultados de la secuencia de la banda CHDW utilizando el programa 4peak. T ( Timina, rojo), C (Citocina, azul), G (Guanina, negro), A (Adenina, verde), Y (C o T) y W (T o A).**



**Figura 9: Resultados del análisis de componentes principales para todas las medidas morfológicas.**

