

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estandarización de un protocolo de sexaje molecular en gallinazo
rey (*Sarcoramphus papa*) a partir de muestras de sangre**

Juan Mateo Arias Jácome

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 17 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Estandarización de un protocolo de sexaje molecular en gallinazo
rey (*Sarcoramphus papa*) a partir de muestras de sangre**

Juan Mateo Arias Jácome

Nombre del profesor, Título académico

María José Pozo, MBS
Gabriela Pozo, MBS

Quito, 17 de mayo de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Juan Mateo Arias Jácome

Código: 00211452

Cédula de identidad: 1750255968

Lugar y fecha: Quito, 17 de mayo de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El gallinazo rey (*Sarcoramphus papa*) es una especie de ave carroñera de suma importancia ecológica en Latinoamérica. Su estudio y manejo requieren herramientas precisas para la identificación del sexo en individuos, fundamental para comprender su biología reproductiva, dinámica poblacional y estrategias de conservación. El sexaje molecular basado en la amplificación de regiones del cromosoma sexual Z (CHD1-Z) y W (CHD1-W) ha demostrado ser una técnica eficiente en diversas aves. Este estudio tuvo como objetivo extraer ADN exitosamente de muestras de sangre pura y sangre en tarjetas Whatman y estandarizar tres sets de primers para la región CHD1-Z y CHD1-W a partir de muestras de sangre pura. Se observaron concentraciones de ADN suficientes para protocolos de amplificación. Se probaron distintas condiciones de ciclado y concentraciones de reactivos para la amplificación con los 3 sets de primers de los fragmentos CHD1-Z y CHD1-W hasta determinar la mejor combinación y se analizaron los resultados por electroforesis en gel de agarosa. Los protocolos con los tres sets de primers fueron optimizados permitiendo el sexaje molecular preciso de *S. papa*. El tercer set de primers identificó adicionalmente hembras con mutación puntual en CHD1-W. Esta investigación tiene implicaciones importantes para la conservación de *S. papa* al proporcionar protocolos eficientes para el sexaje molecular del gallinazo rey. Los resultados obtenidos pueden ayudar como primeros pasos para comprender mejor la ecología y biología reproductiva de esta especie, lo que a su vez puede contribuir a estrategias de conservación más efectivas.

Palabras Clave: Sexaje molecular, CHD1-Z, CHD1-W, *Sarcoramphus papa*, Conservación.

ABSTRACT

The king vulture (*Sarcoramphus papa*) is a scavenger bird species of great ecological importance in Latin America. Its study and management require precise tools for sex identification in individuals, which is fundamental to understand its reproductive biology, population dynamics and conservation strategies. Molecular sexing based on the amplification of regions of the sex chromosome Z (CHD1-Z) and W (CHD1-W) has proven to be an efficient technique in several birds. This study aimed to standardize three sets of primers for the CHD1-Z and CHD1-W region from blood samples, in addition to successfully extracting DNA from pure blood and blood samples on Whatman cards. DNA concentrations sufficient for amplification protocols were observed. Different cycling conditions and reagent concentrations for amplification with the 3 sets of primers for the CHD1-Z and CHD1-W fragments were tested to determine the best combination, and the results were analyzed by agarose gel electrophoresis. The protocols with the three primer sets were optimized to allow accurate molecular sexing of *S. papa*. The third set of primers additionally identified females with point mutation in CHD1-W. This research has important implications for the conservation of *S. papa* by providing efficient protocols for molecular sexing of kingfishers. The results obtained may help as first steps to better understand the ecology and reproductive biology of this species, which in turn may contribute to more effective conservation strategies.

Key words: Molecular sexing, CHD1-Z, CHD1-W, *Sarcoramphus papa*, conservation.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	4
MÉTODOS	8
RESULTADOS.....	11
Cuantificación de ADN	11
Estandarización de condiciones PCR utilizando 3 sets de primers	11
DISCUSIÓN.....	13
TABLAS.....	18
FIGURAS.....	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de reactivos para cada set de primers.	18
Tabla 2. Condiciones de ciclado para la amplificación por cada set de primers.....	19
Tabla 3. Concentraciones y calidad de ADN purificado de las muestras de sangre y sangre en tarjetas Whatman.....	20
Tabla 4. Tamaños de bandas obtenidos por cada set de primers e identificación genotípica de sexo.	21

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% obtenido para la amplificación de los alelos del gen CHD1 implementando el primer set de primers (2550F y 2718R).....**22**
- Figura 2.** Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% obtenidos para la amplificación de los alelos del gen CHD1 mediante el segundo set de primers (NP y 1272H).....**22**
- Figura 3.** Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% obtenidos para la amplificación de los alelos del gen CHD1 implementando el tercer set de primers (NP, MP y P2).....**23**

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Ubicación, tipo de muestra y fecha de recolección de la toma de muestras de los individuos de gallinazo rey.....**28**
- Anexo 2.** Set de primers escogidos para los protocolos de sexaje molecular en *S. papa***28**

INTRODUCCIÓN

El gallinazo rey (*Sarcoramphus papa*) es una especie de ave carroñera con un aspecto llamativo e imponente resaltando su cabeza y cuello multicolor, además de su majestuoso plumaje cuando se encuentra en estado maduro, se caracterizan por tener colores rojos, amarillos, negros y anaranjados alrededor del pico, especialmente en las carúnculas y papilas carnosas. Posee una longitud entre 70-90 cm y una envergadura alar de hasta 2 metros. En cuanto a su coloración, presenta color blanco en los hombros y la espalda, negro en las coberturas alares y la cola, y gris oscuro en la base del cuello (Ibañez & Iannacone, 2011).

Esta especie cumple un rol ecológico de carroñero en el ecosistema, es decir, se alimenta de animales muertos antes de que entren en procesos de descomposición. Recibe el término “rey” en su nombre común porque posee un pico muy fuerte, y ante la presencia de un cadáver otros catártidos esperan que lleguen miembros de esta especie para abrirlo ya que su pico permite romper el tejido de la piel de ciertos animales que puede ser duro. Por esta razón su existencia es determinante para la supervivencia de otras especies. Además, es la única especie viva del género *Sarcoramphus* (Ibañez & Iannacone, 2011).

El gallinazo rey se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Argentina y el sureste de Brasil. El hábitat en el que se encuentra es en bosques tropicales de tierras bajas y zonas cercanas como pastizales a 1200 msnm de altura hasta aproximadamente 1500 msnm (Ibañez & Iannacone, 2011) (Brown, 1976) (Ridgely & Greenfield, 2001). En cuanto a su presencia en Ecuador, este carroñero se ubica principalmente en el oeste y centro del país desde la provincia de Esmeraldas hacia el sur de la costa ecuatoriana, con una mayor incidencia en la provincia de Loja, y es poco común en el oriente de la nación. Fue numeroso en el pasado, sin embargo, su población ha disminuido en los últimos 50 años por actividad humana incluyendo deforestación y expansión agrícola (Ridgely y Greenfield, 2001).

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el estado de esta especie es de preocupación menor porque tiene una distribución geográfica de aproximadamente 14 millones km² y una población de individuos silvestres entre 10,000 y 100,000 individuos (Ridgely y Greenfield, 2001). Por otro lado, según la Lista Roja de Aves del Ecuador (2022), elaborada por el Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador, el estado de esta especie es casi amenazada, esto quiere decir que está próximo a satisfacer criterios de peligro.

Los individuos de esta especie son monomórficos, por tanto, no presenta dimorfismo sexual. Esto quiere decir que no poseen características físicas que permitan diferenciar a los individuos machos y hembras. Tampoco se los puede diferenciar por su comportamiento durante el apareamiento ya que evidencian conductas similares. El método que se usa para determinar el sexo de un individuo de esta especie es mediante laparoscopia, que consiste en una cirugía mediada por una incisión para observar las gónadas, pero requiere la aplicación de anestesia, así como el riesgo de lesiones accidentales en órganos vitales. Por esa razón, puede resultar invasivo y perjudicial para estas aves (Richner, 1989).

Existen otros métodos que resultan menos invasivos como examen cloacal, sexado fecal de esteroides y análisis citogenético. Estos métodos no son ideales, debido a que obtener resultados lleva mucho tiempo y en ciertos casos puede ser costoso (Richner, 1989). Es por esto que encontrar métodos menos invasivos y eficientes para la determinación sexual de individuos de esta especie es importante para poder implementar programas de conservación en la vida silvestre de estas aves. Identificar el sexo de las aves es crucial para investigar aspectos como su evolución y ecología. Por ejemplo, el estudio de la evolución de la proporción de sexos en las poblaciones tiene un impacto directo en la dinámica de selección sexual y en la estructura demográfica de las especies. Conocer las proporciones de sexos facilita una mejor

comprensión de las interacciones ecológicas y el comportamiento diferencial entre machos y hembras, aspectos fundamentales en la investigación ecológica. En términos de conservación, estos métodos son esenciales para diseñar estrategias efectivas que aseguren la viabilidad a largo plazo de las poblaciones silvestres, permitiendo también la mejora de los programas de cría en cautiverio ex situ. (Shizuka & Lyon, 2008).

Las técnicas moleculares surgieron como una respuesta innovadora para la tipificación sexual de individuos de especies monomórficas de aves, como es el caso del gallinazo rey. El sexaje molecular ha contribuido a la conservación de especies consideradas extintas en la naturaleza como *Cyanopsitta spixii* y *Melanprosops placosoma* (Shizuka & Lyon, 2008). Los métodos moleculares usan marcadores específicos del cromosoma, en el caso de las aves no ratites, esta clase taxonómica tienen opción a dos cromosomas sexuales: cromosoma Z y cromosoma W. El cromosoma W es más pequeño que el cromosoma Z y tiene genes diferentes. Las hembras poseen un cromosoma Z y un cromosoma W (ZW), mientras que los machos poseen dos cromosomas Z (ZZ). La diferencia en el tamaño de los alelos que se encuentran en los cromosomas sexuales ha permitido el desarrollo de diversas metodologías para la determinación del sexo de un individuo (Marinha, et al., 2012) (Reddy, et al., 2007).

Griffiths & Tiwari (1995) descubrieron un gen que está ligado a los cromosomas sexuales de las aves, chromodomain helicase DNA binding 1 (CHD1). Este gen posee dos dominios importantes: cromobox y helicasa, y está involucrado en el empaquetamiento del ADN, específicamente en la remodelación de la cromatina y organización del ADN dentro de las células, así como la expresión génica de los cromosomas sexuales Z y W. La alta conservación de los genes CHD1-Z y CHD1-W en aves, junto con las diferencias en sus intrones, los convierte en herramientas útiles para la identificación del sexo y estudios genéticos en aves. Las aves poseen dos o más genes de la familia CHD y uno de ellos (1) posee

dos alelos distintos. Una variante alélica se encuentra en el cromosoma Z, mientras que la otra se encuentra en el cromosoma W, y las dos variantes son de distintos tamaños. La variante del gen CHD1 ubicado en el cromosoma W se denomina CHD1-W y sirve como marcador molecular de aves hembra, mientras que la contraparte del gen CHD1 ubicada en el cromosoma Z nombrado como CHD1-Z se encuentra tanto en aves hembra como en macho (Pambuko, et al, 2023).

Los genes CHD1-Z y CHD1-W están altamente conservados en las especies de aves, lo cual les hace regiones ideales para la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Purwaningrum, et al., 2019). El genotipado mediante PCR consiste en la obtención de varias copias de las secuencias de los alelos de interés (CHD1-Z y CHD1-W) utilizando primers específicos que flanquean el fragmento de los genes permitiendo detectar variaciones intrónicas y el revelado mediante la técnica de electroforesis. Para esto se requiere una muestra que contenga ADN del individuo, y las fuentes más comunes para la obtención de muestras de ADN de aves son: sangre y plumas (Marinha, et al., 2012).

Por lo expuesto, el propósito del presente estudio fue obtener un protocolo de obtención de ADN purificado de sangre y sangre en tarjetas Whatman para el sexaje molecular de individuos de *S. papa* mediante la estandarización de 3 sets de primers para la amplificación de las variantes de la región CHD.

MÉTODOS

Toma de muestras de sangre pura, sangre en tarjetas Whatman y plumas

La Fundación Cóndor Andino capturó 8 individuos silvestres en el Bosque Protector Cerro Blanco para el desarrollo de la presente investigación como está descrito en el Anexo 1. Muestras de sangre pura, sangre en tarjetas y 3-4 plumas fueron tomadas de cada uno de los individuos en diferentes fechas en el periodo de septiembre a diciembre del 2023.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de muestras de sangre, se utilizó el protocolo descrito en Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol) del kit DNeasy Blood & Tissue para eritrocitos nucleados (Yap & Zhang, 2021).

Para la extracción de ADN de muestras de sangre de tarjetas Whatman, se utilizó el protocolo descrito en Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol) del kit DNeasy Blood & Tissue para eritrocitos nucleados (Yap & Zhang, 2021) al igual que para las muestras de sangre. En este caso, se usó una modificación previa propuesto por Choi et al. (2014) que consistió en que los filtros de las tarjetas Whatman fueron incubados en 200 uL de PBS a 37 °C durante toda la noche antes de continuar con el protocolo del kit.

Cuantificación de ADN

Se realizaron las cuantificaciones de las muestras de ADN extraídas en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000, usando el buffer de elución del kit de extracción mencionado previamente como solución blanco y fueron almacenadas a -20°C.

Estandarización de condiciones PCR utilizando 3 sets de primers

Para la amplificación de las regiones CHD1-Z y CHD1-W utilizando el primer set de primers (2550Fy 2781R) se utilizó el protocolo descrito por Fridolfsson & Ellegren (1999) como referencia. Se realizaron modificaciones para optimizar la amplificación con lo cual se obtuvo como resultado una mezcla de la reacción PCR referenciada en la Tabla 1 con un volumen final de 30 μ L (1X de Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM de primer forward, 0,2 mM de primer reverse, 1 μ L de DNA y 0,5 unidades de taq DNA polimerasa Invitrogen). En cuanto a las condiciones de ciclado se realizó una PCR Touchdown que se basa en el descenso gradual de la temperatura. El protocolo estandarizado descrito en la Tabla 2 consiste en 1 ciclo de 2 minutos de denaturación inicial a 94 °C; luego 10 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, annealing de 60-51 °C (menos 1 °C cada ciclo) por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto con 30 segundos; seguido por 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, annealing de 50 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por cinco minutos; finalmente un paso de extensión final a 72 °C por 5 minutos. Las secuencias de los primers se encuentran descritas en el Anexo 2.

Para la amplificación de las regiones CHD1-Z y CHD1-W con el segundo set de primers (NP y 1272H descritos en el Anexo 2) se siguió el protocolo de QALLARIY (s.f.). Como se menciona en la Tabla 1 la PCR se llevó a cabo con modificaciones para optimizar la amplificación con volumen final de 20 μ L (1X de Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 mM de primer forward, 0,25 mM de primer reverse, 1 μ L de DNA y 1,25 unidades de taq DNA polimerasa -Invitrogen). El protocolo de ciclado descrito en la Tabla 2 fue: denaturación inicial a 98 °C durante 30 segundos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 98 °C por 10 segundos, 55 °C de annealing durante 30 segundos y extensión a 72 °C por un minuto y 30 segundos, finalmente, el paso de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Para la amplificación de las regiones CHD1-Z y CHD1-W con el tercer set de primers (NP, P2 y MP), se utilizó como referencia el protocolo propuesto por Ito et al. (2003). En referencia a la Tabla 1 se preparó la mezcla de la reacción para una PCR con algunas modificaciones para optimizar la amplificación con volumen final de 20 μ L (1X de Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,25 mM de primer forward, 0,25 mM de primer reverse, 1 μ L de DNA y 1,25 unidades de taq DNA polimerasa-Invitrogen). Las secuencias de los primers están descritas en el Anexo 2. Las condiciones de ciclado descritas en la Tabla 2 fueron estandarizadas de la siguiente manera: denaturación inicial a 94 °C durante 1 minuto 30 segundos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos, 48 a 52 °C de annealing durante 45 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos, finalmente, el paso de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Los amplicones obtenidos con los tres sets de primers fueron observados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa a 3% teñido por el tinte fluorescente SYBRTM Safe DNA a 100 milivoltios (mV) por 1 hora. Para contrastar el tamaño de la(s) banda(s) obtenida(s) se usó Ladder comercial Invitrogen de 100 pares de bases (pb).

RESULTADOS

Cuantificación de ADN

El ADN purificado fue obtenido exitosamente tanto de muestras de sangre pura como sangre en tarjetas Whatman. Para las muestras de ADN extraídas a partir de sangra pura se obtuvieron valores de concentración en un rango de 12,4 a 89,2 ng/ μ l e índices de calidad relación 260/280 un rango de 1,8 a 2,0, mientras que la relación 260/230 un rango de 1,02 a 2,2 como se encuentra descrito en la Tabla 3.

La concentración de ADN de muestras extraídas de sangre en tarjetas Whatman fue en un rango de 2,6 a 67,1 ng/ μ l, e índices de calidad relación 260/280 rango de -9,8 a 2,73, finalmente la relación 260/230 presenta un rango de -5,6 a 20,43 como se menciona en la Tabla 3.

Estandarización de condiciones PCR utilizando 3 sets de primers

Se obtuvo la amplificación exitosa de la región CHD1 con los tres sets de primers, por tanto, los protocolos de sexaje molecular fueron optimizados para el gallinazo rey. Específicamente, para la identificación de los alelos de la región CHD1 con el primer set de primers en los 8 individuos se observaron dos bandas en los individuos 2, 3, 6 y 8, y una banda en los individuos 1, 4, 5 y 7. El tamaño de las bandas fue de: ~1200 pares de bases y ~450 pares de bases como se describe en la Figura 1 y Tabla 4. Para conseguir esto se modificaron las condiciones de ciclado, puntualmente se cambió el tiempo de extensión descrito en el protocolo de Fridolfsson & Ellegren (1999) de 30 segundos a 5 minutos.

Con el segundo set de primers se observaron dos bandas en los individuos 2, 3, 6 y 8, y una banda en los individuos 1, 4, 5 y 7. El tamaño de las bandas fue de: ~180 pares de bases y ~200 pares de bases referenciado en la Figura 2 y Tabla 4. Para el sexaje molecular exitoso del gallinazo rey se realizó modificación en el protocolo de ciclado, se cambió de 1

minuto y 30 segundos de extensión como se propone en el protocolo de QALLARIY (s.f.) a 30 segundos de extensión.

Con el tercer set de primers se observaron tres bandas en los individuos 2, 3, 6 y 8, y una banda en los individuos 1, 4, 5 y 7. El tamaño de las bandas fue de: ~300 pares de bases, ~220 pares de bases y ~280 pares de bases descritos en la Figura 3 y Tabla 4.

DISCUSIÓN

Para la determinación de protocolos eficientes de sexaje molecular para *S. papa* fue fundamental tener concentraciones de ácidos nucleicos de calidad, lo que se consiguió tanto con la muestra de sangre y tarjetas Whatman. Para ambos tipos de muestra se realizó la extracción siguiendo las indicaciones del fabricante, sin embargo, para la extracción a partir de tarjetas Whatman se realizó una modificación adicional sugerida en Choi et al (2014) que consistió en incubar en 200 uL de PBS los trozos de tarjetas Whatman a temperatura ambiente durante toda la noche. Esto influyó en gran medida en la concentración de ADN purificado obtenido. La solución salina PBS se utilizó para ayudar en la lisis celular liberando el ADN contenido en el interior de la célula, de igual manera precipitó las proteínas y previno la degradación del material genético, por esa razón fue usada con mayor tiempo en las tarjetas Whatman para poder desprender los ácidos nucleicos de los tejidos de este filtro manteniendo la integridad del ADN (Hallmaier, et al., 2018).

Los rangos que se obtuvieron de concentración de ADN son suficientes para poder llevar a cabo procesos de amplificación por PCR. Como se esperaba, en base a la Tabla 3 se obtuvieron mayores concentraciones de ácidos nucleicos en las muestras de sangre pura que en las muestras de tarjetas Whatman. Esto se debe a que se utilizó un mayor volumen de sangre pura para la extracción de ADN, lo que permitió obtener una mayor cantidad de material genético. Por otro lado, la cantidad de sangre depositada en las tarjetas Whatman es de una o dos gotas, lo que limita la cantidad de ADN disponible para la extracción (Tang et al., 2022) (Choi et al., 2014).

En cuanto a los índices de calidad se pudo evidenciar en la Tabla 3 que las muestras de sangre pura son de mayor calidad, esto puede indicar que tienen menos contaminación de proteínas, y, por lo tanto, ADN de mejor calidad (Koetsier & Cantor, s.f.) que las muestras de

tarjetas Whatman en donde posiblemente hay impurezas como péptidos o ARN. Estas impurezas podrían provenir de los filtros de Whatman, o del proceso de recolección de la muestra (Osorio, et al., 2013).

Como se evidencia en las Figuras 1, 2 y 3, y la Tabla 4 se obtuvieron resultados consistentes entre los 3 sets de primers, dado que de las 8 muestras se determinaron 4 individuos machos: 1, 4, 5 y 7. Y 4 individuos hembras: 2, 3, 6 y 8. Por lo tanto, existe especificidad de los primers para identificar fragmentos CHD1-Z y CHD1-W y los protocolos son óptimos para el sexaje molecular de individuos de *S. papa*.

El primer set de primers en la Figura 1 y Tabla 4 se mostró una diferencia de 800 pb entre las bandas de CHD1-y CHD1-W. No existen estudios sobre el sexaje molecular para el orden de los catartiformes, sin embargo, en el estudio de Fridolfsson & Ellegren (1999), para el sexaje molecular en especies de falconiformes, orden cercana a los catartiformes, se reportó 1 fragmento CHD1-W de tamaño 400 a 450 pares de bases, concordando con el fragmento obtenido en el gallinazo rey para nuestro estudio. Por otro lado, en el mismo estudio, encontraron que tamaño del fragmento CHD1-Z era de aproximadamente 700 pares de bases. Este resultado difiere con nuestro estudio ya que obtuvimos una banda de aproximadamente 1200 pares de bases CHD1-W. Es posible que en el caso del gallinazo rey haya más secuencias de nucleótidos en los intrones por ende los fragmentos amplificados son de mayor tamaño (Pambuko, et al, 2023). La aparición de bandas definidas indica una concentración considerable de las secuencias CHD1-Z y CHD1-W, por lo tanto, los parámetros definidos para los protocolos de PCR son los correctos. Esto muestra que este set de primers fue optimizado con éxito (LabXChange, 1999).

En el caso del segundo set de primers desarrollados específicamente para el sexaje molecular del gallinazo rey, se obtuvo un gel de electroforesis descrito en la Figura 2.

Teniendo de referencia el estudio de Bernie (2023), en el cual se hizo una tipificación sexual con el uso de los primers NP y 1272H para *Cathartes melambrotus* de la familia de los catártidos, a la cual también pertenece el gallinazo rey, en el mencionado trabajo se determinó un tamaño del fragmento CHD1-W de 258 pares de bases y fragmento CHD1-Z de 285-288 pares de bases. Por otro lado, respecto a la calidad de las bandas, en contraste con las bandas obtenidas en la amplificación del primer set de primers, las bandas obtenidas en el segundo set de primers no son igual de claras. Sobre todo, la banda de CHD1-Z de los individuos hembras no presentan una delimitación nítida (LabXChange, 1999). Como se evidencia en la Tabla 4 el tamaño del fragmento CHD1-Z fue cercano a 180 pares de bases mientras en fragmento CHD1-W aproximadamente de 200 pares de bases, en comparación con el estudio de Bernie (2023), donde el alelo W fue de menor tamaño respecto al alelo Z, en el gallinazo rey sucedió lo contrario, la razón podría atribuirse a secuencias de los genes que varía según la especie, específicamente el tamaño de los intrones (Pambuko, et al, 2023).

Finalmente, para la amplificación mediante la implementación de tercer set de primers (P2, NP y MP) en el revelado del gel de electroforesis presentado en la Figura 3 se evidencia 1 una banda en los individuos machos de tamaño aproximado de 280 pares de bases, fragmento asociado CHD1-Z. En las hembras se observan tres bandas: una banda de 280 pares de bases que es del fragmento CHD1-Z, otra banda cercana a 300 pares de bases que es del fragmento CHD1-W, y la tercera de 220 pares de bases que es de un fragmento con una mutación puntual en CHD1-W evidenciados en la Tabla 4. Esto se explica en el funcionamiento de amplificación de los 3 primers. Los primers P2 y NP son análogos a los primers P2 y P8 desarrollado por Griffiths et al (1995) originalmente para la amplificación de las variantes de CHD, estos primers amplifican una secuencia intrón de los alelos CHD1-W y CHD1-Z. Mientras que los primers P2 y MP pueden amplificar un alelo específico dado por el primer MP que fue desarrollado con una mutación mismatch 3' terminal. Esta combinación de primers

flanquea y amplifica un fragmento de CHD1-W con una mutación puntual presente. No se ha realizado estudios de sexaje molecular utilizando este set de primers en el orden de los catartiformes. No obstante, si se ha trabajado en el orden cercano de los falconiformes como se indica en el estudio de Ito et al. (2003). En dicho estudio se realizó el sexaje de la especie *Peregrine falcon*, donde el tamaño del fragmento CHD1-W obtenido fue de 392 pares de bases, mientras que el fragmento CHD1-Z fue de aproximadamente 350 pares de bases. Por último, el fragmento de CHD1-W con la mutación puntual tiene un tamaño de 300 pares de bases aproximadamente. Comparando los tamaños del mencionado estudio con el presente, coinciden en que la banda correspondiente a CHD1-W es la de mayor tamaño entre las 3, seguido por el fragmento CHD1-Z y finalmente, la banda de CHD1-W con la mutación puntual. No coinciden en los tamaños por la diferencia en los intrones presentes dentro de las secuencias de los genes que varía según la especie (Pambuko, et al, 2023).

En este estudio se logró estandarizar protocolos de sexaje molecular a partir de muestras de sangre. La determinación sexual de individuos de gallinazo rey es clave y sirve como un primer paso para comprender cómo se manejan las poblaciones, es decir, cómo se distribuyen los individuos no solo en Ecuador sino en toda la región en que habita. Además, permite profundizar en su ecología, específicamente, determinar cuál es la proporción de individuos macho y hembra. Además, es el punto de partida para desarrollar estudios para entender la viabilidad reproductiva y la tasa de natalidad de poblaciones de esta especie (Petrou, et al., 2024).

CONCLUSIONES

En cuanto a la extracción de ADN purificado de sangre y sangre en tarjetas Whatman fue realizada con éxito. En cuanto a la lectura de concentraciones y calidades, se determinaron concentraciones suficientes para protocolos de amplificación para ambos tipos de muestra, en cuanto a las relaciones de índice, únicamente la relación calidad 260/280, se encontraron valores dentro de los ideales en las muestras de sangre, sin embargo, en las demás relaciones estaban fuera de los ideales, lo que indica presencia de contaminantes.

Este estudio presentó una metodología eficiente para el sexaje molecular de individuos de *S. papa* utilizando tres sets de primers específicos para los fragmentos CHD1-Z y CHD1-W. Los resultados obtenidos en cuanto al sexo de los 8 individuos son consistentes y entre los 3 protocolos estandarizados, lo que demuestra la potencialidad de esta metodología para el estudio de la diversidad genética y la ecología de las poblaciones de *S. papa*, se identificaron 4 machos y 4 hembras. Las bandas obtenidas son de diferentes tamaños dependiendo del set de primers utilizado. Se deben probar los protocolos de amplificación en las muestras de sangre en tarjetas Whatman y plumas, ya que los protocolos fueron desarrollados exclusivamente a partir de las muestras de sangre pura. En caso de que los tres protocolos de amplificación funcionen se recomienda utilizar el primer set de primers porque es el que presenta diferencia considerable en el tamaño de las bandas, específicamente una diferencia de 750 pares de bases por lo cual sería la mejor opción para el sexaje molecular de gallinazo rey, pero en cuanto a los otros dos protocolos la diferencia de las bandas es más pequeña.

Se debe realizar estudios de secuenciación para confirmar las secuencias amplificadas por cada set de primers y determinar la longitud exacta. Por último, se recomienda realizar pruebas de sexaje convencionales como laparoscopia en un individuo macho y uno hembra, para contrastar y confirmar la evidencia de los protocolos.

TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de reactivos para cada set de primers.

Reactivos	Conc. inicial	Conc. Final	Reacción: 1 rxn
H ₂ O	-	-	23,05 µL
Buffer 10X			
PCR - MgCl ₂	10X	1X	3 µL
50 mM MgCl ₂	50 mM	1,75 mM	1,05 µL
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,6 µL
Primer forward	10 mM	0,2 mM	0,6 µL
Primer reverse	10 mM	0,2 mM	0,6 µL
Taq Platinum	5 U/µL	0,5 U	0,1 µL
ADN Muestra	-	-	1 µL
Vol final: 30 µL			30 µL

Nota. Concentraciones de reactivos para realizar la mezcla de PCR

Tabla 2. Condiciones de ciclado para la amplificación por cada set de primers.

Set de primers	Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Primer set de primers	Denaturación inicial	94 °C	2 min	
	Denaturación	94 °C	30 s	Menos 1 °C cada ciclo
	Annealing	60 - 51 °C	30 s	
	Extensión	72 °C	5 min	
	Denaturación	94 °C	30 s	30 ciclos
	Annealing	50 °C	30 s	
	Extensión	72 °C	5 min	
	Extensión final	72 °C	5 min	
Segundo set de primers	Denaturación inicial	98 °C	30 s	
	Denaturación	98 °C	10s	35 ciclos
	Annealing	55 °C	30 s	
	Extensión	72 °C	1 min 30 s	
	Extensión final	72 °C	5 min	
Tercer set de primers	Denaturación inicial	94 °C	1 min 30 s	
	Denaturación	94 °C	30 s	35 ciclos
	Annealing	48-52 °C	45 s	
	Extensión	72 °C	45 s	
	Extensión final	72 °C	5 min	

Nota. Menos 1 °C cada ciclo en el protocolo de ciclado con el primer set de primers, una PCR convencional con el segundo set de primers y una gradiente de temperatura de annealing para la amplificación con el tercer set de primers.

Tabla 3. Concentraciones y calidad de ADN purificado de las muestras de sangre y sangre en tarjetas Whatman.

ID Muestra (Sangre)	Concentración de ácidos nucleicos de muestras de sangre pura (ng/μL)	Índice de calidad 260/280 (sangre pura)	Índice de calidad 260/230 (sangre pura)	Concentración de ácidos nucleicos de sangre en T.W. (ng/μL)	Índice de calidad 260/280 (sangre en T.W.)	Índice de calidad 260/230 (sangre en T.W.)
SP_CB 1	89,2	1,87	1,16	67,1	1,91	3,95
SP_CB 2	48	1,89	1,8	7,6	2,53	-5,6
SP_CB 3	95,7	1,9	2,15	17,6	1,87	0,93
SP_CB 4	32,6	1,93	1,02	9,6	2,73	-2,57
SP_CB 5	39	1,81	1,36	12,6	2,07	20,43
SP_CB 6	33,8	1,94	1,55	2,6	-9,6	-1,37
SP_CB 7	12,4	2,14	1,11	3,5	6,1	0,89
SP_CB 8	19,1	1,99	2,2	2,8	-9,8	0,39

Nota. Esta tabla muestra las concentraciones de ácidos nucleicos en ng/μL, así como los índices de calidad 260/280 e índices de calidad 260/230 de las muestras de ADN provenientes de sangre pura y sangre en tarjetas Whatman.

Tabla 4. Tamaños de bandas obtenidos por cada set de primers e identificación genotípica de sexo.

SET Primers	Individuos							
	SP_CB 1	SP_CB 2	SP_CB 3	SP_CB 4	SP_CB 5	SP_CB 6	SP_CB 7	SP_CB 8
SET 1	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases
	Z: ~1200 pares de bases	W: ~450 pares de bases	W: ~450 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	W: ~450 pares de bases	Z: ~1200 pares de bases	W: ~450 pares de bases
SET 2	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases
	Z: ~180 pares de bases	W: ~200 pares de bases	W: ~200 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	W: ~200 pares de bases	Z: ~180 pares de bases	W: ~200 pares de bases
SET 3	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases
	Z: ~280 pares de bases	W: ~300 pares de bases o W: ~ 220 pares de bases	W: ~300 pares de bases o W: ~ 220 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	W: ~300 pares de bases o W: ~ 220 pares de bases	Z: ~280 pares de bases	W: ~300 pares de bases o W: ~ 220 pares de bases

Nota. Una banda para individuos machos y dos bandas en individuos hembras en la amplificación con el primer y segundo set de primers. Una banda para individuos machos y tres para hembras con el tercer de primers.

FIGURAS

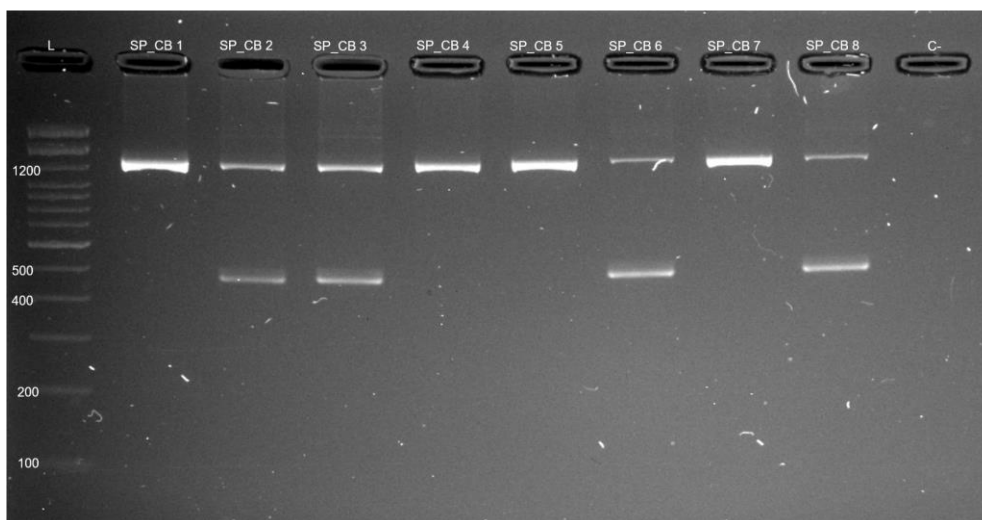


Figura 1. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% obtenido para la amplificación de los alelos del gen CHD1 implementando el primer set de primers (2550F y 2718R). En el primer carril se observa el ladder Invitrogen de 100 pares de bases usado como referencia de tamaños de bandas, en los siguientes 8 carriles se evidencian las bandas obtenidas de la muestra de cada uno de los individuos y en el noveno carril un control negativo, para determinar si no hubo contaminación.

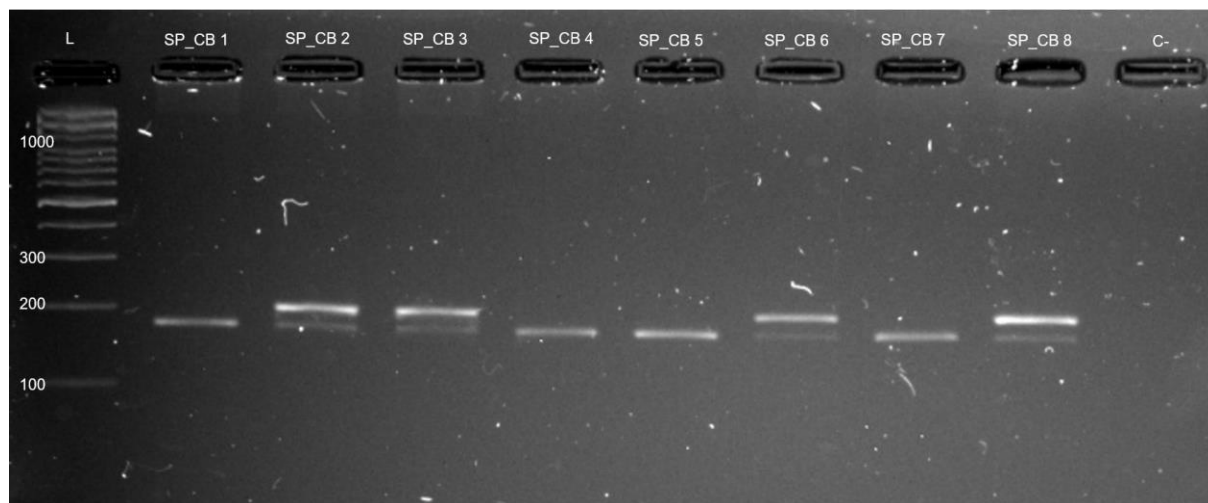


Figura 2. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% obtenidos para la amplificación de los alelos del gen CHD1 mediante el segundo set de primers (NP y 1272H). En el primer carril se observa el ladder Invitrogen de 100 pares de bases usado como referencia de tamaños de bandas, en los siguientes 8 carriles se evidencian las bandas obtenidas de la muestra de cada uno de los individuos y en el noveno carril un control negativo, para determinar si no hubo contaminación.



Figura 3. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 3% obtenidos para la amplificación de los alelos del gen CHD1 implementando el tercer set de primers (NP, MP y P2). En el primer carril se observa el ladder Invitrogen de 100 pares de bases usado como referencia de tamaños de bandas, en los siguientes 8 carriles se evidencian las bandas obtenidas de la muestra de cada uno de los individuos y en el noveno carril un control negativo, para determinar si no hubo contaminación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beirne, Christopher & Thomas, Mark & Bastoe, Arianna & Flatt, Eleanor & Diaz, Giancarlo & Chulla, Diego & Perez Mullisaca, Flor & Quispe, Rosio & Quispe, Caleb & Forsyth, Adrian & Whitworth, Andrew. (2023). Scouts vs Usurpers: Alternative foraging strategies facilitate coexistence between Neotropical Cathartid Vultures. 10.22541/au.168254824.41675519/v1.
- Brown, Leslie (1976). *Birds of Prey: Their biology and ecology*. Hamlyn. p. 59. ISBN 0-600-31306-9.
- Choi, E., Lee, S. K., Ihm, C., & Sohn, Y. (2014). Rapid DNA Extraction from Dried Blood Spots on Filter Paper: Potential Applications in Biobanking. *Osong Public Health And Research Perspectives*, 5(6), 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.09.005>
- Freile, J., Santander, T., Jiménez, G., Carrasco, L., Cisneros, D., Guevara, E., Sánchez, M. & Tinoco, B. (2019) Apéndice 1. Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica. LISTA ROJA DE LAS AVES DEL ECUADOR. https://avesconservacion.org/wp-content/uploads/2022/04/Lista_Roja_Aves_Ecuador_EN.pdf
- Fridolfsson, A., & Ellegren, H. (1999). A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Journal Of Avian Biology*, 30(1), 116. <https://doi.org/10.2307/3677252>
- Griffiths, R. & Tiwari, B. (1995b, junio 6). WO1996039505A1 - Avian ghd genes and their use in methods for sex identification in birds - Google Patents. <https://patents.google.com/patent/WO1996039505A1/en>
- Griffiths, R., & Tiwari, B. (1995). Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 375(6531), 454. <https://doi.org/10.1038/375454a0>

- Hallmaier-Wacker, L. K., Lueert, S., Roos, C., & Knauf, S. (2018). The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. *Scientific reports*, 8(1), 6292. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24573-y>
- Ito, H., Sudo-Yamaji, A., Abe, M., Murase, T., & Tsubota, T. (2003). Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in falconiformes. *Zoological science*, 20(3), 339–344. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.339>
- Koetsier, G. & Cantor, E. (s.f.) *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers*. New England Biolabs. https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mvns_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb
- LabXChange (1999) How to Interpret Agarose Gel Data: The basics. <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:a03c81b4:html:1>
- Morinha, F., Cabral, J., & Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*, 78(4), 703-714. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.015>
- Olivera, Lesly & Iannacone, Jose. (2011). BIOECOLOGÍA Y ESTADO DE CONSERVACIÓN DEL CONDOR DE SELVA *SARCORAMPHUS PAPA LINNAEUS*, 1758 (CATHARTIFORMES: CATHARTIDAE): REVISIÓN A NIVEL DE SUDAMÉRICA. *Biotempo*. 11. 17-35. 10.31381/biotempo.v11i0.732.
- Osorio, Julio & Pachajoa, Harry & Hurtado, Paula. (2017). DNA concentration and purity of blood samples stored in whatman FTA paper between 1 to 3 years. *Revista Estomatología*. 21. 35-38. 10.25100/re.v21i1.5756.

- Pambuko, G., Vanessa, R., & Prastowo, S. (2023). Amplification of CHD-1 gene fragment in Z and W sex chromosomes of Cemani chicken using a different set of PCR primers. IOP Conference Series. Earth And Environmental Science, 1208(1), 012058. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1208/1/012058>
- Petrou, E. L., Scott, L. C., McKeeman, C. M., & Ramey, A. M. (2024). Molecular sexing of birds using quantitative PCR (qPCR) of sex-linked genes and logistic regression models. *Molecular ecology resources*, 24(4), e13946. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13946>
- Purwaningrum, M., Nugroho, H. A., Asvan, M., Karyanti, K., Alviyanto, B., Kusuma, R., & Haryanto, A. (2019). Molecular techniques for sex identification of captive birds. *Veterinary world*, 12(9), 1506–1513. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1506-1513>
- Reddy, A., Prakash, V., & Shivaji, S. (2007). A rapid, non-invasive, PCR-based method for identification of sex of the endangered Old World vultures (white-backed and long-billed vultures) – Implications for captive breeding programmes. *Current Science*, 92(5), 659–662. <http://www.jstor.org/stable/24097855>
- Richner, H. (1989) AVIAN LAPAROSCOPY AS A FIELD TECHNIQUE FOR SEXING BIRDS AND AN ASSESSMENT. *Field Ornithol.*, 60(2):137-142
- Ridgely, Robert; Greenfield, Paul (2001). *Birds of Ecuador: Field Guide*. Cornell University Press. p. 74. ISBN 0-8014-8721-8.
- Shizuka, Daizaburo & Lyon, Bruce. (2008). Improving the Reliability of Molecular Sexing of Birds Using a W-Specific Marker. *Molecular ecology resources*. 8. 1249-53. [10.1111/j.1755-0998.2008.02342.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02342.x).

QALLARIY (s.f) INFORME SEXAJE DE AVES.

Tang, R., Li, M., Yan, X. et al. Comparison of paper-based nucleic acid extraction materials for point-of-care testing applications. *Cellulose* 29, 2479–2495 (2022).
<https://doi.org/10.1007/s10570-022-04444->

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación, tipo de muestra y fecha de recolección de la toma de muestras de los individuos de gallinazo rey

Individuo	Ubicación	Muestra recolectada	Fecha de recolección
SP_CB_1			09/09/2023
SP_CB_2			
SP_CB_3			10/09/2023
SP_CB_4	Bosque protector Cerro Blanco	Sangre pura, sangre en tarjetas	
SP_CB_5		Whatman y plumas	
SP_CB_6			20/12/2023
SP_CB_7			
SP_CB_8			

Nota. Los individuos fueron capturados en el periodo de septiembre a diciembre del 2023, de cada uno se tomó muestras de sangre pura, sangre en tarjetas Whatman y plumas.

Anexo 2. Set de primers escogidos para los protocolos de sexaje molecular en *S. papa*.

Set de primers	Secuencia	Fuente
Set1: 2550F y 2718R	F: 2550F: 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	(Fridolfsson and Ellegren, 1999)
	R: 2718R: 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	
Set2: NP y 1272H	F: NP: 5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	(QALLARIY, s.f.)
	R: 1272H: 5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	
Set3: NP, MP y P2	F: NP: 5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	(Ito et al., 2003)
	R: MP: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	
	R: P2: 5'-AGTCACTATCAGATCCGGAA-3'	

Nota. El primer set de primers y tercer set de primers fueron desarrollados para el sexaje molecular en general de cualquier especie de ave, mientras que el segundo set de primers fue establecido exclusivamente para el sexaje molecular *S. papa*.