

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y  
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**T E S I S**

Sexado de aves del Zoológico Regional Miguel  
Álvarez del Toro (ZooMAT) mediante métodos moleculares

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**Jesús Alejandro Cáceres Pozo**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Enero de 2025





**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR**  
**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;  
Fecha: 28 de enero de 2025

C. **Jesús Alejandro Cáceres Pozo**

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

**Sexado de aves del Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro (ZoomAT) mediante  
métodos moleculares**

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

Dr. Eduardo Estanislao Espinoza Medinilla

Dra. Dolores Guadalupe Vidal López

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

**Firmas:**

Ccp. Expediente

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Sexado de aves del Zoológico Regional Miguel Álvarez  
del Toro (ZooMAT) mediante métodos moleculares

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

Jesús Alejandro Cáceres Pozo

**Directora:**

**Dra. Nancy Gabriela Santos Hernández**  
BA'ALCHE Conservación, Manejo y Uso Sustentable A.C.

**Asesor:**

**Dr. José Antonio De Fuentes Vicente**  
Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM),  
UNICACH.

**Asesora:**

**M. en C. Christian Ruiz Castillejos**  
Doctorado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación de  
Ecosistemas Tropicales  
UNICACH.



Tuxtla Gutiérrez Chiapas

Enero de 2025

# ÍNDICE

RESUMEN.....	V
ABSTRACT .....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS AVES.....	3
2.2. DIVERSIDAD .....	3
2.3. AVES DE CHIAPAS BAJO CUIDADO HUMANO EN EL ZOOMAT .....	4
<i>Especie: Ara macao (Linnaeus, 1758)</i> .....	4
<i>Especie: Ara militaris (Linnaeus, 1766)</i> . .....	6
<i>Especie: Amazona auropalliata (Lesson, 1842)</i> .....	7
<i>Especie: Amazona farinosa (Boddaert, 1783)</i> .....	8
<i>Especie: Ramphastos sulfuratus (Lesson, 1830)</i> .....	10
<i>Especie: Psittacara strenuus (Ridway, 1915)</i> .....	11
<i>Especie: Pionus senilis, (SPIX, 1824)</i> .....	12
<i>Especie: Brotogeris jugularis (Müller, 1776)</i> .....	13
<i>Especie: Strix virgata, (Cassin, 1849)</i> .....	14
<i>Especie: Asio clamator</i> .....	15
<i>Especie: Buteo jamaicensis (Gmelin, 1788)</i> .....	16
<i>Especie: Buteogallus urubitinga (Gmelin, 1788)</i> .....	17
<i>Especie: Geranoaetus albicaudatus (Vieillot, 1816)</i> .....	18
2.4. DIMORFISMO SEXUAL .....	19
2.5. DETERMINACIÓN DEL SEXO .....	20
<b>2.5.1 Determinación del sexo mediante análisis genéticos</b> .....	22
III. ANTECEDENTES .....	25
IV. OBJETIVOS.....	28
GENERAL.....	28
ESPECÍFICOS .....	28

<b>V. ZONA DE ESTUDIO .....</b>	<b>29</b>
5.1 UBICACIÓN .....	29
<b>VI. MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
6.1 MUESTREO.....	30
6.2 TOMA DE MUESTRA .....	30
6.3 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	31
6.4 AMPLIFICACIÓN DEL ADN .....	31
6.5 VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE ADN AMPLIFICADOS.....	32
6.6 CONOCIMIENTO EMPÍRICO DEL PERSONAL DE CUIDADO PROFESIONAL EN EL ZOOMAT.....	33
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
7.1 EXTRACCIÓN DEL ADN.....	34
7.2 AMPLIFICACIÓN DEL ADN .....	34
7.3 SEXADO MOLECULAR .....	36
7.4 CONOCIMIENTO EMPÍRICO.....	38
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES .....</b>	<b>45</b>
<b>XII. ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE LISIS CELULAR FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMÍLICO (PROPORCIONADO POR LA DRA. GABRIELA PARRA OLEA).....	50
ANEXO 2. CUESTIONARIO CONOCIMIENTOS EMPÍRICOS SOBRE EL SEXO DE LAS AVES .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ARA MACAO (LINNAEUS, 1758) .....	5
<b>FIGURA 2.</b> GUACAMAYA VERDE (ARA MILITARIS) (LINNAEUS, 1766).....	7
<b>FIGURA 3.</b> LORO NUCA AMARILLA (AMAZONA AUROPALLIATA) (LESSON, 1842).....	8
<b>FIGURA 4.</b> LORO CORONA AZUL (AMAZONA FARINOSA) (BODDAERT, 1783).....	9
<b>FIGURA 5.</b> TUCÁN PICO CANOA (RAMPHASTUS SULFURATUS) (LESSON, 1830).....	10
<b>FIGURA 6.</b> (PSITTACARA STRENUUS) (RIDWAY, 1915).....	11
<b>FIGURA 7.</b> LORO CORONA BLANCA ( <i>PIONUS SENILIS</i> ) (SPIX, 1824).....	13
<b>FIGURA 8.</b> PERIQUITO ALAS AMARILLAS (BROTOGERIS JUGULARIS) (MÜLLER, 1776) .....	14
<b>FIGURA 9.</b> CÁRABO CAFÉ (STRIX VIRGATA) (CASSIN 1849). .....	15
<b>FIGURA 10.</b> BÚHO CARA BLANCA (ASIO CLAMATOR) .....	16
<b>FIGURA 11.</b> AGUILILLA COLA ROJA (BUTEO JAMAICENSIS) (GMELIN, 1788) .....	17
<b>FIGURA 12.</b> AGUILILLA NEGRA MAYOR (BUTEOGALLUS URUBITINGA) (GMELIN, 1788) ...	18
<b>FIGURA 13.</b> AGUILILLA COLA BLANCA (GERANOAEETUS ALBICAUDATUS) (VIEILLOT, 1816)	19
<b>FIGURA 14.</b> COMPARATIVA DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES ENTRE LAS AVES NO VOLADORAS (RATITES: A-EMÚ Y B-AVESTRUZ) Y LAS AVES VOLADORAS (C-GALLINA). FUENTE: SMITH (2010). .....	21
<b>FIGURA 15.</b> MECANISMOS DE LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN AVES: (A) HIPÓTESIS DE W DOMINANTE; (B) HIPÓTESIS DE LA DOSIS Z. FUENTE: SMITH (2010). .....	22
<b>FIGURA 16.</b> DOMINIOS PRESENTES EN LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LA FAMILIA DE LOS GENES CHD. FUENTE: MATTA CAMACHO ET AL. (2009).....	23
<b>FIGURA 17.</b> DELIMITACIÓN DE LA RESERVA ECOLÓGICA “EL ZAPOTAL”, TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, MÉXICO. TOMADO DE: PALACIOS ET AL. (2016). .....	29
<b>FIGURA 18.</b> TOMA DE MUESTRA DE LA VENA ALAR DE UN EJEMPLAR DE GUACAMAYA VERDE (ARA MILITARIS).....	31

# ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> PROGRAMA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN CON LOS PRIMERS P2-P8.....	32
<b>CUADRO 2.</b> PROGRAMA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN CON LOS PRIMERS 2550 F- 2718 R.....	32
<b>CUADRO 3.</b> RESULTADOS DEL SEXADO DE AVES MUESTREADAS.....	36
<b>CUADRO 4.</b> INDIVIDUOS CON INFORMACIÓN EMPÍRICA DE SEXADO. ....	39

## RESUMEN

El dimorfismo es el resultado de la selección sexual entre ambos sexos. Se refiere a una identificación mediante rasgos fenotípicos como la coloración, el tamaño y otras características que pueden diferenciar entre un macho y una hembra de una misma especie. Sin embargo, en numerosos casos, particularmente algunas especies de aves, es imposible diferenciar el sexo debido a la ausencia de dimorfismo sexual. La correcta identificación del sexo de las especies es de gran importancia para su manejo y conservación, en el caso particular de las aves, tanto en su etapa juvenil como durante su etapa adulta. El desarrollo de métodos moleculares ha permitido tener un método menos invasivo para el sexado aviar. En este trabajo determinamos el sexo de aves que se encuentran bajo cuidado humano en el Zoológico Miguel Álvarez del Toro, usando técnicas moleculares. Se estandarizó el uso de los marcadores moleculares de cromosomas sexuales 2550 F - 2718 R y P2 - P8, para el sexado de algunas especies de las familias de aves Psittacidae, Ramphastidae, Strigidae y Accipitridae. Se analizaron 48 individuos de 14 especies encontrando un total de 30 individuos machos y 18 hembras. En ocho especies se encontró una mayor proporción de individuos machos que de hembras. Por su parte, el personal de cuidado resaltó la importancia de realizar estas pruebas para conocer de manera certera el sexo de los ejemplares y poder trabajar mejor su manejo, siempre y cuando se realice de forma adecuada para provocar el menor estrés posible en ellos. De esta forma, los trabajos de investigación molecular han contribuido directamente en la conservación de especies amenazadas, pues este tipo de estudios tienen un impacto en el manejo reproductivo de estas especies.



## **ABSTRACT**

Dimorphism is the result of sexual selection between both sexes. It refers to an identification through phenotypic traits such as coloration, size and other characteristics that can differentiate between a male and a female of the same species. However, in many cases, particularly some species of birds, it is impossible to differentiate the sex due to the absence of sexual dimorphism. The correct identification of the species sex is of great importance for their management and conservation. The development of molecular methods has made it possible to have a less invasive method for avian sexing. In this work we determine the sex of birds that are under human care at the Miguel Álvarez del Toro Zoo (ZooMAT), using molecular techniques. The use of the molecular markers of sexual chromosomes 2550 F - 2718 R and P2 - P8 was standardized for the sexing of some species of the bird families Psittacidae, Ramphastidae, Strigidae and Accipitridae. A total of 48 individuals of 14 species were analyzed, finding a total of 30 male and 18 female individuals. In eight species, a greater proportion of male individuals was found. The care staff of the ZooMAT highlighted the importance of carrying out these tests to accurately know the sex of the specimens and to be able to better work on their handling, as long as it is carried out appropriately to cause the least possible stress in them. In this way, molecular research work has directly contributed to the conservation of threatened species since these types of studies have an impact on the reproductive management of these species.

# I. INTRODUCCIÓN

Las aves han estado en contacto con el hombre de muy variadas formas; se cuentan entre los pocos animales verdaderamente silvestres que comparten nuestras actividades cotidianas y que muestran importantes adaptaciones que les permiten colonizar muy exitosamente el medio aéreo debido a la posibilidad de volar (Barbeito y González, 2014). Existen alrededor de 10 507 especies de aves en el mundo, (Donsker y Rasmussen, 2023), teniendo una máxima diversidad de aves en la región Neotropical la cual incluye los mayores bosques tropicales que van del sur de México a través de Centroamérica hasta Sudamérica. Esta región representa alrededor de 35 % de las especies del mundo (Newton, 1998), siendo el estado de Chiapas una de las entidades con mayor diversidad de aves con 694 especies y 14 subespecies, incluidas en 21 órdenes y 78 familias, las cuales poseen una alta importancia ecológica. Las aves en Chiapas desempeñan complejos y diversos papeles en la dinámica y funcionalidad de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Rangel-Salazar *et al.*, 2013).

El dimorfismo sexual en aves es definido por la coloración, el tamaño y otras características que van ligadas a los cromosomas sexuales (los cromosomas Z y W) (Fraye y Wolpoff, 1985), estos caracteres pueden diferenciar machos y hembras de una misma especie (Smith, 2010). Sin embargo, existen muchas especies monomórficas en las que el sexado de manera visual o mediante medidas simples suele ser compleja, ineficaz e invasiva. Por esto, se ha recurrido a la determinación del sexo mediante métodos moleculares como la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) constituyendo un método fiable que ha sido empleado para el estudio de diversas especies como una alternativa para determinar el sexo de las aves jóvenes morfológicamente indistinguibles o adultos de especies que son monomórficas (González, 2014).

En el caso de las aves, los cromosomas sexuales son ZW (Fraye y Wolpoff, 1985), en donde las hembras constituyen el sexo heterogamético, es decir, tienen

dos cromosomas sexuales diferentes (ZW,) mientras que los machos son el sexo homogamético y llevan dos copias del cromosoma sexual Z (ZZ) (Caeiro Aguado, 2015), los cuales han evolucionado a partir de un par autosómico ancestral (Dubiec y Zagalska-Neubauer, 2006). El sexo puede venir determinado por la dosificación del cromosoma Z resultando dos para el macho y uno para la hembra o depender de un gen femenino presente en el cromosoma sexual W (Smith, 2010).

Dada la imposibilidad de diferenciar a simple vista o con rasgos marcados el sexo entre algunos ejemplares de aves nativas de exhibición del Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro, y evitando realizar técnicas invasivas y estresantes para los ejemplares, se recurrió al sexado por medio de PCR mediante el uso de marcadores moleculares, empleando los cebadores conocidos como P2-P8 descritos por Griffiths et al. (1998). Considerando la robustez y universalidad de los datos generados con esta metodología, se consideraron además otros grupos de marcadores que han sido diseñados para flanquear el fragmento del gen con el intrón y que aseguran una gran efectividad, siendo (2550F-2718R) (diseñados por Fridolfsson y Ellegren, 1999; Caeiro Aguado, 2015) una gran alternativa para llevar a cabo el sexado de las aves.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Características generales de las aves

Las aves constituyen una rama reciente de vertebrados con importantes adaptaciones que permiten colonizar muy exitosamente el medio aéreo debido a la posibilidad de volar (Barbeito y González, 2014). Pertenecen a un taxón bien definido de reptiles diápsidos llamados arcosaurios, en el cual se incluyen también grupos tan conocidos como los cocodrilos, los pterosaurios y los dinosaurios, este taxón está caracterizado por una serie de sinapomorfias que incluyen la presencia de fenestras ante orbitales y una articulación intertarsal, entre otros atributos (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

Las aves vivientes se han diversificado ampliamente y se encuentran distribuidas por todo el planeta y en todos los ambientes terrestres y acuáticos, excepto los desiertos más extremos y en el centro de la Antártida, constituyendo el grupo de vertebrados terrestres más rico en especies debido a una acelerada radiación y diversificación tanto evolutiva como geográfica (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014), por ello este grupo se caracteriza por tener plumas, picos, extremidades superiores transformadas en alas, patas escamosas y ser ovíparos, son un excelente grupo para evaluar la variación temporal y espacial de la diversidad biológica (Rangel-Salazar, *et al.*, 2013).

### 2.2. Diversidad

La máxima variación en la diversidad de aves se encuentra en la región Neotropical, que incluye los bosques tropicales que van del sur de México hasta Sudamérica, esta región representa alrededor de 35 % de las especies del mundo (Newton, 1998). A nivel mundial existen alrededor de 10 500 especies de aves, de las cuales 1 123 a 1 150 están en México, representando un 11 % de la diversidad de aves a nivel mundial (Donsker y Rasmussen, 2023). Esto coloca a México en el onceavo lugar, por su riqueza avifaunística, entre los países megadiversos del mundo y en el cuarto lugar en cuanto a la proporción de especies endémicas. De las categorías

supra específicas de aves del mundo, en México se presentan 26 órdenes (65 %), 95 familias (41 %) y 493 géneros (22 %) (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

Una de las entidades federativas que contiene una gran muestra de la diversidad biológica existente en México es el estado de Chiapas, este alberga una riqueza estimada de 714 especies de aves con 14 subespecies, incluidas en 21 órdenes y 78 familias, siendo uno de los estados del país mejor estudiados (Altamirano y Guzmán, 2009). El orden con el mayor número de especies es Passeriformes (aves canoras) con 351 registros. La distribución de las especies por región fisiográfica se traduce en una riqueza de especies en Chiapas que se incrementa de la Depresión Central con 305 especies, hacia las Montañas de Oriente con 482, la Sierra Madre de Chiapas con 537 y alcanza un máximo en las Montañas del Norte con 580 especies (Rangel-Salazar *et al.*, 2013).

La importancia ecológica de las aves en Chiapas, radica en que desempeñan complejos y diversos papeles en la dinámica y funcionalidad de los ecosistemas terrestres y acuáticos, por ejemplo; algunas especies son polinizadoras, como los colibríes; otras son frugívoras dispersoras de semillas, como los trogones y quetzales, algunas más son insectívoras, como los papamoscas o depredadores de pequeños y medianos mamíferos, como los gavilanes y búhos (Rangel-Salazar *et al.*, 2013).

## **2.3. Aves de Chiapas bajo cuidado humano en el ZooMAT**

### **2.3.1 Guacamaya roja**

**Orden:** *Psittaciformes*

**Familia:** *Psittacidae*

**Género:** *Ara*

**Especie:** *Ara macao* (Linnaeus, 1758).

La guacamaya roja se distingue por su plumaje de color rojo escarlata y el color amarillo de las plumas cobertoras y secundarias de las alas, además de la

ausencia de plumas en el rostro en donde se distinguen de 3 a 8 líneas de plumas pequeñas que forman patrones sinuosos. Las plumas cobertoras de la cola presentan un color azul claro, mientras que las plumas cobertoras primarias son rojas, el pico es grande, fuerte y curvo terminado en punta; en la parte de la mandíbula superior es de color hueso, mientras la mandíbula inferior es negro mate (Figura 1). Esta especie se distribuye sobre gran parte de Centro y Sudamérica, su rango de distribución comprende desde el sureste de México en los estados de Tabasco y este de Chiapas y Oaxaca, Guatemala, Belice, Honduras y El Salvador; también se encuentran en el noreste de Colombia, Panamá, Venezuela y las Guayanas y más al sur hacia el este de los Andes. Se alimenta principalmente de diferentes frutas y granos, sin embargo, su dieta también incluye brotes tiernos de hojas, vainas, flores, madera, néctar y algunos insectos (larvas). Es una especie monógama, la reproducción se realiza en los meses de noviembre a mayo. Los huevos son casi esféricos, blancos y algo brillantes; la nidada varía de dos a tres huevos, la incubación es realizada únicamente por la hembra y tiene una duración de 25 a 26 días (CONANP, 2010).



**Figura 1.** *Ara macao* (Linnaeus, 1758)

Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/64735784> (Dubón, 2014)

### 2.3.2 Guacamaya verde

**Orden:** Psittaciformes

**Familia:** Psittacidae

**Género:** *Ara*

**Especie:** *Ara militaris* (Linnaeus, 1766).

Es una especie de amplia distribución, pero muy fragmentada, va desde México hasta América del Sur: Colombia, el norte de Venezuela, este del Ecuador, Perú, Bolivia y el noreste de Argentina. En México, la subespecie *A. m. mexicana* ha sido reportada en poblaciones aisladas en la vertiente del Pacífico, desde el sureste de Sonora y el sureste de Chihuahua hasta Oaxaca, en la costa del Golfo en Tamaulipas, y en el centro del país en San Luis Potosí, Estado de México, Querétaro y Michoacán (CONANP, 2010).

La longitud total del cuerpo va de 685 a 760 mm, con lo cual ocupa el sexto lugar en tamaño dentro del género *Ara*, el plumaje es color verde por lo general, con tonos amarillos en el dorso, los extremos de las alas son de color turquesa, al igual que las plumas más largas de la cola. En la base de la cola hay algunas plumas de color rojo. Los ojos están en áreas desnudas de la cara, que tienen color blanquecino con unas cuantas plumas dispersas, de color rojo y negro, la frente es roja y normalmente el pico es negruzco (Figura 2), la dieta consiste en diversos tipos de frutas, vainas, semillas y nuevos brotes de hojas y flores. La temporada de reproducción es muy variada, estando directamente relacionada con la temperatura y el régimen de lluvias, que afecta a su vez la disponibilidad de alimento, y la latitud. En el noroeste del país, la puesta de huevos ocurre a principios de abril o mayo; al centro, entre los meses de diciembre y enero; y hacia el sur, en los meses de noviembre a enero; la nidada consiste en dos huevos, la incubación comienza inmediatamente y los polluelos eclosionan en promedio después de 24 días, pasan aproximadamente un año en el nido y alcanzan la madurez sexual hasta los tres o cuatro años.



**Figura 2.** Guacamaya verde (*Ara militaris*) (Linnaeus, 1766)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/170482241> (Artigas-Azas, 2021)

### 2.3.3 Loro nuca amarilla

**Orden:** Psittaciformes

**Familia:** Psittacidae

**Género:** *Amazona*

**Especie:** *Amazona auropalliata* (Lesson, 1842)

Es un loro de tamaño grande, que tiene 35.5 - 38 cm de largo y pesa alrededor de 480 g, sus alas son de forma redonda, y la cola es corta y cuadrada. Su plumaje es de color verde brillante, y se caracteriza por una banda de color amarilla brillante en la nuca. Las alas miden de 209 - 234 mm y cuando las despliegan es posible ver que la punta externa de las primarias es de color azul y las 4 secundarias más externas son rojas, con la punta azul. El pico es de color gris, y presenta un anillo ocular de color gris y el iris ámbar, la cola presenta una faja terminal ancha verde amarillenta, con un color rojo por la base de la cola que normalmente está cubierta (Figura 3), no presenta dimorfismo sexual. En México, el loro nuca amarilla se distribuye por la costa Pacífica del lado este extremo de Oaxaca y por la costa de Chiapas. La especie está reportada desde el nivel del mar hasta 600 msnm. Habita en bosques secos deciduos y semideciduos o de galería siempreverdes. En el sureste de la costa de Oaxaca, la especie habita sabanas arboladas que se



encuentran entre bosques deciduos y manglares en tierras bajas hasta 600 msnm, la época reproductiva ocurre en la época seca, anida en cavidades naturales en los árboles, tales como huecos en troncos viejos o muertos. En cautiverio se ha observado que el ciclo de anidación del loro nuca amarilla consiste en 29 días de incubación de los huevos, seguido por dos meses de crecimiento de las crías en el nido (CONABIO, 2023).



**Figura 3.** Loro Nuca Amarilla (*Amazona auropalliata*) (Lesson, 1842)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/110660889> (Van den Berghe Eric, 2013)

#### 2.3.4 Loro corona azul

**Orden:** Psittaciformes

**Familia:** Psittacidae

**Género:** *Amazona*

**Especie:** *Amazona farinosa* (Boddaert, 1783)

Es un loro grande que mide 38-43 cm de cabeza a cola, con longitud de ala de 221-248 mm, y pesa 705-766 g. Es el quinto en tamaño entre los loros Amazonas de las Américas y el más grande en México. El plumaje de su cuerpo es color verde con un leve tono amarillo, presenta algunas plumas amarillas en la corona, aunque puede no estar muy bien definido, se caracteriza por su corona de color azul claro que continua hacia los lados de la nuca, sus alas son de forma redonda, y la cola

es corta y cuadrada, las plumas primarias y secundarias tienen la punta azul-violeta, con una banda roja en las 4 – 5 secundarias exteriores, las plumas de la cola presentan una banda ancha de verde-amarillento en la punta (Figura 4), no presenta dimorfismo sexual y los juveniles son parecidos a los adultos. En México, el loro corona azul se localiza en la vertiente del Atlántico desde el sur de Veracruz, adentrándose hacia el norte de Oaxaca y Chiapas, por Tabasco, y hacia el sur de la Península de Yucatán, Se le encuentra principalmente en el bosque tropical perennifolia, de vegetación primaria densa, prefiere el dosel del bosque y en general está restringido a donde aún existen áreas extensas de bosque tropical perennifolio conservado, la temporada de reproducción indican que la anidación ocurre en la época seca (CONABIO, 2023).



**Figura 4.** Loro corona azul (*Amazona farinosa*) (Boddaert, 1783)

Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/40998489> (Beadle, 2019)

### 2.3.5 Tucán pico canoa

**Orden:** Piciformes

**Familia:** Ramphastidae (Vigors, 1825)

**Género:** *Ramphastos*

**Especie:** *Ramphastos sulfuratus* (Lesson, 1830)

Son un grupo particularmente interesante, porque muchos pares simpátricos de taxa de *Ramphastos* se ven sorprendentemente similares entre sí en el plumaje y la coloración de las partes desnudas (Haffer, 1974), pero varían dramáticamente en el tamaño del cuerpo, la forma del culmen y las vocalizaciones. Los tucanes *Ramphastos* son aves de cuerpo grande del orden Piciformes (pájaros carpinteros y aliados) que habitan en el dosel y se distribuyen desde el sur de México hasta Argentina, la mayoría de las formas geográficas de *Ramphastos* tienen diferencias de coloración notorias y, por lo tanto, se describieron originalmente como especies completas (Weckstein, 2005). De las tres especies de tucanes que se distribuyen en México, esta es la más grande con una longitud de entre 50 y 59 cm y un peso aproximado de 500 g, su plumaje negro que contrasta con el amarillo del cuello y pecho, parte superior de la cabeza marrón, piel alrededor del ojo verde, iris y tarsos azules, pico largo y aserrado color verde claro con una combinación de tonos azul y amarillo, destacando la punta anaranjado-rojizo; las plumas cobertoras superiores de la cola blancas e inferiores rojas (Figura 5) (CONABIO, 2023). Habitan en bosques primarios, secundarios y zonas perturbadas, selvas altas perennifolias tropicales, riberas de ríos, lagos y lagunas de vegetación exuberante (CONABIO, 2023).



**Figura 5.** Tucán pico canoa (*Ramphastos sulfuratus*) (Lesson, 1830)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/107357345> (Alex Harman, 2015)

### 2.3.6 Periquito pacífico

**Orden:** Psittaciformes

**Familia:** Psittacidae

**Género:** *Psittacara*

**Especie:** *Psittacara strenuus* (Ridway, 1915).

Es un perico de color verde, con tonos verde amarillentos en la garganta, pecho y abdomen, algunos individuos tienen plumas rojo-anaranjadas en garganta y cuello. interior del de las cobertoras de las alas verde amarillento, parte interior de las rémiges amarillas, pico color hueso, iris café y anillo ocular café grisáceo sin plumas (Figura 6), tiene una longitud en los machos de 30 cm y las hembras de 30 a 33 cm (CONABIO, 2023), su distribución en Mesoamérica es principalmente en tierras bajas del Pacífico, desde el este de Chiapas en México al sur por Guatemala hasta Nicaragua (Cantú Guzmán *et al.* 2021). Hacen sus nidos dentro de termiteros, huecos de árboles y paredes de acantilados en las ocasiones que se reproducen de forma colonial. Suelen alimentarse y perchar en los árboles, pero suelen aprovechar plantaciones en temporada (CONABIO, 2023).



**Figura 6.** (*Psittacara strenuus*) (Ridway, 1915)

Fuente: <https://www.naturalista.mx/observations/109144382>

### 2.3.7 Loro corona blanca

**Orden:** Psittaciformes

**Familia:** Psittacidae

**Género:** *Pionus*

**Especie:** *Pionus senilis*, (SPIX, 1824)

Es una especie de tamaño mediano que mide 24 cm de cabeza a cola y pesa 193-229 gr (CONABIO, 2023). El loro corona blanca o cabeza de viejo es en su mayor parte verde, con cola corta y algo cuadrada; las coberteras infracaudales son rojas y la coronilla blanca; presenta un prominente anillo periocular color parduzco rosa, así como una mancha blanca en el mentón y el centro de la garganta; los pómulos y el pecho son también verdes, salpicados de azul fuerte, y las coberteras alares superiores tienen color café dorado, el pico es verde o amarillo, con la base gris, y los ojos son cafés (Figura 7) (CCA, 2017), se localiza en la vertiente del Atlántico desde el sur de Tamaulipas, adentrándose hacia Chiapas y la península de Yucatán. Su distribución se extiende hasta el oeste de Panamá, se le encuentra principalmente en bosques húmedos como el bosque tropical perennifolio, pero localmente se le puede encontrar en bosques de pino encino, y bosque bajo de montaña. Habita principalmente en tierras bajas, pero puede realizar movimientos estacionales hacia 1,250 - 1,560 msnm, este se alimenta de semillas maduras de *Inga*, *Erythrina*, y *Dendropanax*, así como frutos maduros de palma, también se le ha visto alimentándose en cultivos como el maíz y el sorgo, esta especie se reproduce haciendo sus nidos en cavidades de árboles o en los troncos huecos de palmeras, el periodo de reproducción ocurre entre febrero a mayo, y comprende de 26-28 días de incubación, seguido por 54-68 días de crecimiento de las crías (CONABIO, 2023).





**Figura 7.** Loro Corona Blanca (*Pionus senilis*) (Spix, 1824)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/116133883> (Pérez Óscar, 2021)

### **2.3.8 Periquito alas amarillas**

**Orden:** Psittaciformes

**Familia:** Psittacidae

**Género:** *Brotogeris*

**Especie:** *Brotogeris jugularis* (Müller, 1776)

Esta especie se encuentra en selvas secas y vegetación secundaria desde el sur de México hasta Colombia y Venezuela, es de coloración verde con tonos cobrizos en las plumas cobertoras de las alas y azules en las cobertoras de las primarias y las rémiges, en la corona tiene tonos azules pálidos y su barbilla es naranja (Figura 8) con una longitud que va para machos y hembras de 18 a 19 centímetros y un peso que va de los 53 a 65 gramos. En términos de reproducción anidan en termiteros, oquedades de árboles, tocones, u oquedades naturales, se ha reportado su periodo de reproducción que va de enero a mayo, se ha observado la participación de ambos sexos en la excavación del nido cuando usan los termiteros, no tiene dimorfismo sexual marcado (CONABIO, 2023), se alimentan principalmente

de fruta, néctar y semillas y actúan como polinizadoras de algunas especies de la flora (Hernández-Avendaño, *et al*, 2022).



**Figura 8.** Periquito alas amarillas (*Brotogeris jugularis*) (Müller, 1776)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/97995389> (Trejo, 2013)

### 2.3.9 Cárabo café

**Orden:** Strigiformes

**Familia:** Strigidae

**Género:** *Strix*

**Especie:** *Strix virgata*, (Cassin, 1849).

El cárabo café (*Strix virgata*) es una especie de ave estrigiforme de la familia Strigidae (búhos y tecolotes), es residente y estrictamente nocturna. Mide 29-38 cm de largo y pesa entre 175-320 g. Puede presentar dos fases de coloración, clara y oscura, tiene un disco facial café con amarillo, cejas blancas, sin plumas auriculares, ojos grandes café oscuro, pico color verde olivo, el plumaje general del cuerpo es café barrado y vermiculado. Tarsos y muslos emplumados color canela (Figura 9). Se encuentra principalmente a lo largo de las vertientes tanto del Pacífico como del Golfo de México, incluyendo la península de Yucatán; también existen algunas poblaciones en la región del Eje Neovolcánico, habita bosques tropicales

húmedos, de galería, deciduos, de montaña y de pino encino, por lo mismo puede vivir en diversidad de climas y en altitudes de 0 a 2,500 msnm (CONABIO, 2023).



**Figura 9.** Cárabo café (*Strix virgata*) (Cassin 1849).

Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/3024135>

### 2.3.10 Búho cara blanca

**Orden:** Strigiformes

**Familia:** Strigidae

**Género:** Asio

**Especie:** *Asio clamator*

El búho cara blanca (*Asio clamator*) es una rapaz nocturna que está ampliamente distribuida en la región Neotropical (Juncosa-Polzella y Zárate, 2021). Su rango geográfico abarca desde el norte de México en Centroamérica, se amplía en Sudamérica hacia Venezuela y las Guyanas, y hacia el sur por el faldeo oriental de la cordillera de los Andes llegando hasta el centro de Argentina, siendo el límite más austral de la distribución de la especie corresponde a la región pampeana al sur de la provincia de Buenos Aires donde es considerada rara (Baladrón y Bó, 2017).

Su nidificación es relativamente flexible en comparación a otras rapaces nocturnas pudiendo nidificar en árboles, sobre el suelo ocultos por la vegetación,



así como también en nidos abandonados que dejaron otras aves, aunque no se conoce con certeza la temporada de nidificación, se ha mencionado que esta ocurre generalmente en la época otoño-invierno (Juncosa-Polzella y Zárate, 2021), a pesar de su amplia distribución es una especie relativamente poco estudiada (Figura 10).



**Figura 10.** Búho cara blanca (*Asio clamator*)  
Fuente: The Cornell Lab (Álvarez, 2022)

### 2.3.11 Aguililla cola roja

**Orden:** Accipitriformes

**Familia:** Accipitridae

**Género:** *Buteo*

**Especie:** *Buteo jamaicensis* (Gmelin, 1788)

Es una aguililla grande de alas anchas y cola redondeada, esta ave presenta muchas variaciones en su plumaje, aunque una característica distintiva es el color rojizo en la parte superior de la cola. El adulto es de color café en la parte dorsal, con la corona y la nuca barradas en color ámbar-café claro y blanco, la parte baja de la espalda también está barrada con estos colores, las alas presentan barras de color café oscuro, la cola es ámbar-café oscuro con una banda delgada negra subterminal y con las puntas blancas (Figura 11). La cara es ámbar-café claro, densamente rayada en café. La barbilla y toda la parte ventral son de color blanco o arena claro con parches a los lados del cuello, manchas en el abdomen y un

barrado fino de color canela-café en los muslos. El pico es azul-negro, los ojos son cafés, las patas son amarillas y las garras son negras (CONABIO, 2023), los machos miden 0.45-0.56m y las hembras 0.50-0.65m. Pesan los machos alrededor de 69 g a 1.3 kg, y 900 g a 1.46 kg las hembras.



**Figura 11.** Aguililla cola roja (*Buteo jamaicensis*) (Gmelin, 1788)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/101327658> (Hunt, 2020)

### 2.3.12 Aguililla negra mayor

**Orden:** Accipitriformes

**Familia:** Accipitridae

**Género:** *Buteogallus*

**Especie:** *Buteogallus urubitinga* (Gmelin, 1788)

Es una rapaz robusta con piernas largas, relativamente grande, con un tamaño promedio de 51 a 64 cm de largo total, una envergadura de alas de 120 a 137 cm y un peso de 853 a 996 g. en machos y en hembras de 900 a 1250 g, los adultos por lo general tienen el plumaje de color negro, con las plumas cobertoras superiores de la cola blancas y un fino barrado blanco en los muslos, la cola es blanca con una

amplia banda subterminal de color negro, el iris es de color café oscuro, las piernas son de color amarillo diluido, la región de los lores es de tonalidad gris a amarillo diluido, la garganta y la región ventral del cuerpo, así como la parte inferior de las alas, presentan una tonalidad blanquecina con un manchado y barrado abundante en tonalidades ocre, arena y café oscuro (Figura 12), este tiene una distribución en México que abraza los estado de Campeche, Chiapas, Michoacán, Nayarit, Jalisco, Oaxaca, Sonora, Yucatán y Veracruz (CONABIO, 2023).



**Figura 12.** Aguililla Negra Mayor (*Buteogallus urubitinga*) (Gmelin, 1788)  
Fuente: <https://www.naturalista.mx/photos/37787403> (Cools Paul, 2019)

### 2.3.13 Aguililla cola blanca

**Orden:** Accipitriformes.

**Familia:** Accipitridae.

**Subfamilia:** Buteoninae.

**Género:** *Geranoaetus*.

**Especie:** *Geranoaetus albicaudatus* (Vieillot, 1816)

Gavilán con forma robusta y anchas alas, parte superior gris pizarra; las alas un poco más oscuras y con una gran mancha canela que abarca las coberteras menores y las escapulares. la rabadilla y la cola blancas y con una banda oscura

cerca de la punta, las partes inferiores blancas, la cera gris verdoso y las patas amarillas (Figura 13), su distribución va desde los Estados Unidos a la Argentina, su distribución local es relativamente común en todo el estado, exceptuando las grandes selvas y las regiones más frías, esta rapaz se alimenta de pequeños reptiles y ratas que captura en los campos abiertos, es más común observar planeando, es un verdadero habitante de los campos despejados, por lo que no se encuentra en el interior de los bosques (Álvarez del Toro, 1980).



**Figura 13.** Aguililla cola blanca (*Geranoaetus albicaudatus*) (Vieillot, 1816)  
Fuente: <https://colombia.inaturalist.org/photos/173185575>

## 2.4. Dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual en aves es definido por la coloración, el tamaño y otras características que pueden diferenciar entre un macho y una hembra de una misma especie. Todos los rasgos específicos del sexo que se observan en las aves y otros animales tienen su origen en un proceso clave del desarrollo: la determinación del sexo (Smith, 2010). Las observaciones del comportamiento, laparoscopia, laparotomía y examinación cloacal (Caeiro Aguado, 2015), permiten distinguir las llamadas características sexuales primarias (genitales externos) y las características sexuales secundarias, las cuales no son estrictamente necesarias para la reproducción pero tienen alguna función durante la misma, ya que la

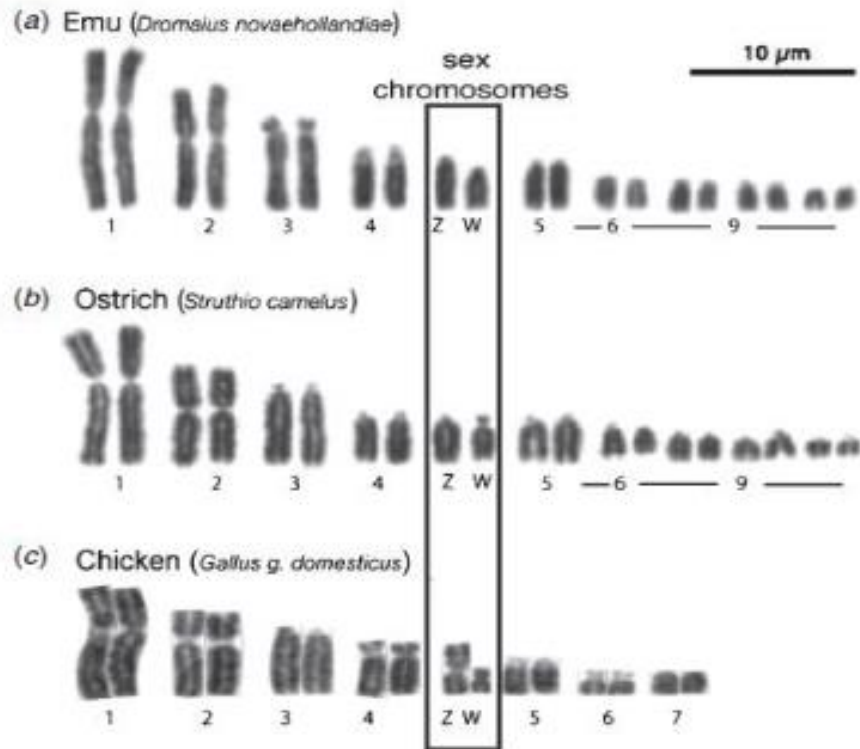
expresión de caracteres como tamaño, fuerza y colorido son un conjunto de aspectos que juegan un papel fundamental al garantizar el éxito en los procesos de apareamiento (Matta Camacho *et al.*, 2009). Este conjunto de parámetros es ampliamente controlado por genes ligados a los cromosomas sexuales; en el caso de las aves los cromosomas ZW (Frayer y Wolpoff, 1985). En aves, a diferencia de los mamíferos, las hembras constituyen el sexo heterogamético, es decir, tienen dos cromosomas sexuales diferentes ZW, mientras que los machos son el sexo homogamético y llevan dos copias del cromosoma sexual Z (ZZ) (Caeiro Aguado, 2015).

## **2.5. Determinación del sexo**

Dado a la imposibilidad de sexar muchas de las especies sexualmente monomórficas de manera visual o mediante medidas morfológicas y morfométricas, la determinación del sexo en aves mediante técnicas moleculares como la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un método fiable que ha sido probado en multitud de especies. Por tanto, el problema de determinar el sexo de aves jóvenes morfológicamente indistinguibles, así como de embriones, ha sido resuelto por técnicas genéticas, que permiten el sexado de polluelos de solo unos días de edad, así como de embriones, minimizando la posterior mortalidad diferencial entre polluelos (González Suurbach, 2014). Todas las aves tienen cromosomas sexuales y el sexo se determina en la fecundación por la herencia de estos cromosomas; la determinación del sexo por esta herencia está regulada a nivel genético por uno o varios genes situados en los cromosomas sexuales: los machos son el sexo homogamético, portador de dos cromosomas sexuales Z, las hembras son heterogaméticas, heredan dos cromosomas sexuales diferentes Z y W (Smith, 2010).

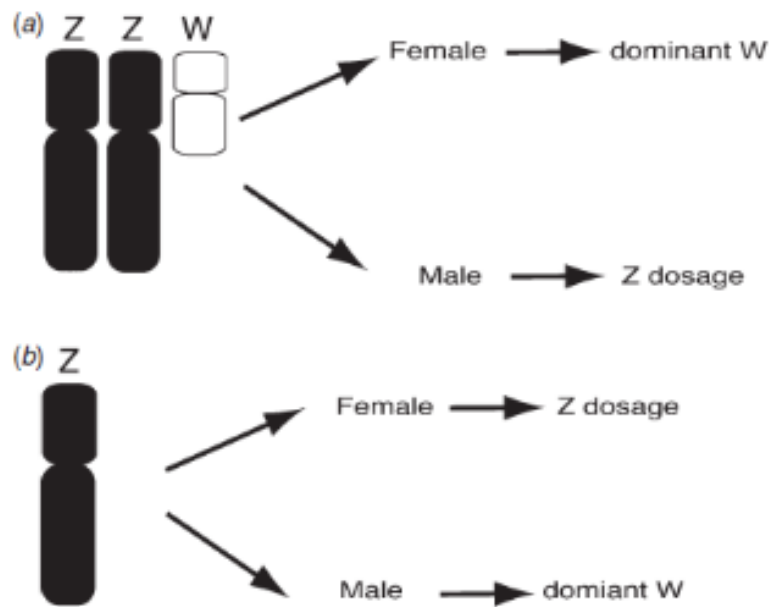
En aves, la mayoría de las especies tiene más de 70 cromosomas, los cromosomas sexuales por lo general son fáciles de distinguir entre ellos, debido a que difieren en su tamaño (Figura 14) (Caeiro - Aguado, 2015). Los cromosomas sexuales de las aves han evolucionado a partir de un par de autosomas, durante este proceso, el cromosoma W perdió muchos de sus genes por lo que su tamaño

se redujo mientras que el cromosoma Z no ha cambiado el contenido genético, por su parte, el cromosoma W es rico en ADN repetitivo heterocromático de tipo satélite y ambos cromosomas contiene una pequeña región pseudoautosómica (Dubiec y Zagalska-Neubauer, 2006).



**Figura 14.** Comparativa de los cromosomas sexuales entre las aves no voladoras (ratites: a-emú y b-avestruz) y las aves voladoras (c-gallina). Fuente: Smith (2010).

El sexo puede venir determinado por la dosificación del cromosoma Z resultando dos para el macho y uno para la hembra o depender de un gen femenino presente en el cromosoma sexual W, a estas dos posibilidades se les conoce como dosificación de Z e hipótesis de W dominante (Figura 15), respectivamente, y no son necesariamente excluyente entre sí (Smith, 2010).



**Figura 15.** Mecanismos de la determinación del sexo en aves: (a) Hipótesis de W dominante; (b) Hipótesis de la dosis Z. Fuente: Smith (2010).

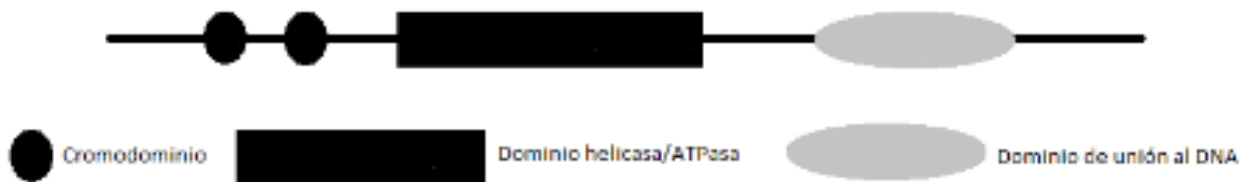
### 2.5.1 Determinación del sexo mediante análisis genéticos

Los mecanismos de sexado están dispersos en diferentes grupos de animales, por ejemplo, la determinación del sexo cromosómico se puede encontrar entre taxones filogenéticamente divergentes como Platyhelminthes, Nematoda, Crustácea, Insecta, Teleostomi, Amphibia, Reptilia, Aves y Mammalia.

La identificación del sexo en aves basada en el CHD por medio de técnicas moleculares se ha revolucionado al descubrirse en 1995 el primer gen localizado en el cromosoma W, muy poco después se descubrió una copia muy próxima de este gen también en el cromosoma Z (Figura 16) (Dubiec y Zagalska-Neubauer, 2006). En sí, la prueba de sexado molecular se basa en el análisis del gen cromosoma-helicasa de unión al ADN (CHD), el cual hasta el momento ha sido uno de los pocos genes ligados tanto al cromosoma Z como al W. Este gen se encuentra muy conservado entre los diferentes órdenes evolutivos tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos (Matta Camacho *et al.*, 2009).

La familia de genes CHD codifican para proteínas que comparten secuencias y dominios funcionales asociados con la regulación de la cromatina, estructura y transcripción del gen. Las proteínas codificadas por esta familia de genes tienen tres dominios (Figura 16), a los cuales deben su nombre (Caeiro Aguado, 2015):

- a) Cromodominio: Tiene una secuencia de aminoácidos similar a las proteínas HP1 (Heterochromatin Protein 1) y Polycomb, unas proteínas involucradas en la represión génica, probablemente asociada a la condensación de la cromatina, aunque este mecanismo aún no está muy claro.
- b) Dominio Helicasa/ATPasa: Es similar a las proteínas SNF2 (Sucrosa No Fermentable 2) del humano, que se ha demostrado que activan la transcripción por descondensación de la cromatina.
- c) Dominio de unión al ADN: Se une selectivamente a secuencias ricas en A-T (Adenina y Timina), vía interacción con el surco menor del ADN.



**Figura 16.** Dominios presentes en las proteínas codificadas por la familia de los genes CHD.

Fuente: Matta Camacho et al. (2009)

El gen CHD-W está localizado en el cromosoma W, por lo que es exclusivo de hembras. Por su parte, el gen CHD-Z se encuentra en el cromosoma Z y, por tanto, aparece en ambos sexos (Richard Griffiths *et al.*, 1998), la carencia de recombinación entre las copias Z y W de este gen indica que está localizado fuera



de la región pseudoautosómica. El gen CHD contiene al menos dos intrones por lo que dos pares de primers relacionados con CHD han sido diseñados para flanquear el fragmento del gen entre dos exones que contienen un intrón (Dubiec y Zagalska-Neubauer, 2006). Estas regiones de intrones de los genes CHD están localizadas en el medio de dos regiones conservadas a las que se unen los primers, la longitud de ellos difiere entre los genes CHD-W y CHD-Z, haciendo posibles la identificación del sexo de las aves (González Suurbach, 2014) debido a que la copia de W siempre es más grande, puesto que los intrones están menos conservados comparados con los exones y su longitud varía entre genes. Existen grupos de primers que han sido diseñados para flanquear el fragmento del gen con el intrón y que aseguran, la amplificación en ciertas especies de aves, en los más destacables se encuentran los diseñados por Fridolfsson & Ellegren (1999) (2550F/2718R) o los primers 1237 L/1272 H diseñados por Kahn *et al.*, (1998). Los test realizados con los primers P2-P8 son robustos y casi universales (Richard Griffiths *et al.*, 1998) y la tasa de éxito de determinación del sexo lograda con ellos es del 85.6% (González Suurbach, 2014).

### III. ANTECEDENTES

La determinación temprana del sexo en aves resulta de especial relevancia cuando se consideran programas de conservación *ex situ*, producción, explotación y estudios de ecología de poblaciones. Las técnicas de identificación del sexo han resultado útiles en estudios de biología evolutiva, ecología y de genética de conservación de aves.

El aislamiento de marcadores genéticos moleculares para la identificación del sexo realizado por Griffiths y Tiwani en 1993, permitió en aquellas especies con reproducción sexual, poder distinguir entre los machos y las hembras, cuyas especies no presentan una división morfológica distinguible, para lograr esto aislaron ADN de la sangre del carbonero común (*Parus major*), grajilla (*Corvus monedula*) y el pinzón cebra (*Taenopygia guttata*).

Los mecanismos de sexado están dispersos en diferentes grupos de animales. Por ejemplo, la CSD se puede encontrar entre taxones filogenéticamente divergentes, las aves se caracterizan por la heterogamia femenina: los machos tienen dos copias del cromosoma Z, por lo tanto, denominado ZZ y las hembras tienen una copia del cromosoma Z y una del cromosoma W (ZW). El cromosoma W es generalmente mucho más pequeño que el cromosoma Z y también muestra otros signos típicos de un cromosoma sexual degenerado, es decir, un bajo contenido de genes rico en ADN heterocromático repetitivo de tipo satélite (Fridolfsson *et al.*, 1998).

Griffiths y colaboradores (1998) describieron una nueva prueba basada en los dos genes CHD, que no requieren el uso de una enzima de restricción para separar los productos de PCR y, por lo tanto, es más rápido, menos costoso y más simple. La prueba emplea dos primers de PCR que se hibridan con regiones exónicas conservadas, para posteriormente amplificarse a través de un intrón tanto en CHD-W como en CHD-Z. Dado a que estos intrones no codifican, están menos conservados y sus longitudes generalmente difieren entre los genes, así diseñaron a P8 y P2 obteniendo el sexado exitoso en 27 de las 28 especies prueba.

El reciente descubrimiento del gen CHD1W, aparentemente ligado a W en todas las aves no ratites (no voladoras), ha abierto nuevas posibilidades en esta dirección. Dado que existe el problema de que el gen también existe en una copia muy similar en el cromosoma Z (CHD1Z), Fridolfsson y Ellegren (1999) describieron un nuevo método universal para el sexado molecular que se basa en la detección de una diferencia de tamaño constante entre los intrones CHD1W y CHD1Z utilizando primers altamente conservados que flanquean el intrón amplificando de forma consistente un intrón de diferente tamaño de CHDIW Y CHD 1Z. Con esto se dispuso de un sistema de sexado universal sencillo, rápido para las aves, empleando a 2550F y 2718R obteniendo un resultado exitoso en 47 de las 50 especies analizadas.

Respecto a la universalidad del gen CHD para el sexado de aves, es necesario evaluar si es adecuado utilizarlo en tantas especies como sea posible, en el estudio de Vucicevic *et al* (2013), se evaluó el método de identificación molecular del sexo en 58 especies de aves con dos conjuntos de primers: 2550F-2718R (Fridolfsson y Ellergen, 1999) y P2-P8 (Griffiths *et al.*, 1998) con un total de 284 muestras. Se logró determinar el sexo de 50 de las 58 especies con el juego de primers 2550F-2718R. Esto coincide con lo descrito por Ellegren (1996) que menciona que el gen CHD puede servir como una etiqueta casi universal para la determinación del sexo en las aves (Vucicevic *et al.*, 2013).

Gonzales (2014), realizó la determinación del sexo de aves, con el gen CHD-Z con los primers P2-P8. Hasta donde se sabe, era la primera vez que se realizaba la determinación del sexo de 5 de las especies muestreadas mediante marcadores moleculares -*Carduelis chloris*, *Carduelis cannabina*, *Turdus philomelos*, *Turdus merula* y *Fringilla coelebs* obteniendo resultados positivos en la mayoría de las muestras.

Caeiro-Aguado (2015) realizó el sexado de aves rapaces, el objetivo principal del trabajo consistió en comprobar si las técnicas moleculares generales empleadas para llevar a cabo el sexado de aves constituyen un método fiable, íntegro y útil para la identificación del sexo en diferentes grupos de aves rapaces (órdenes

Falconiformes y Strigiformes) o taxones próximos a ellas (orden Caprimulgiformes), utilizando para dicho fin la amplificación de la secuencia del intrón situado entre dos exones del gen CHD, el trabajo se llevó a cabo en el Centro de Recuperación de la Fauna Salvaje de Santa Cruz, teniendo una alta efectividad (85 %).

## IV. OBJETIVOS

### General

- Determinar el sexo de las aves bajo cuidado humano en el Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro, mediante técnicas moleculares no invasivas.

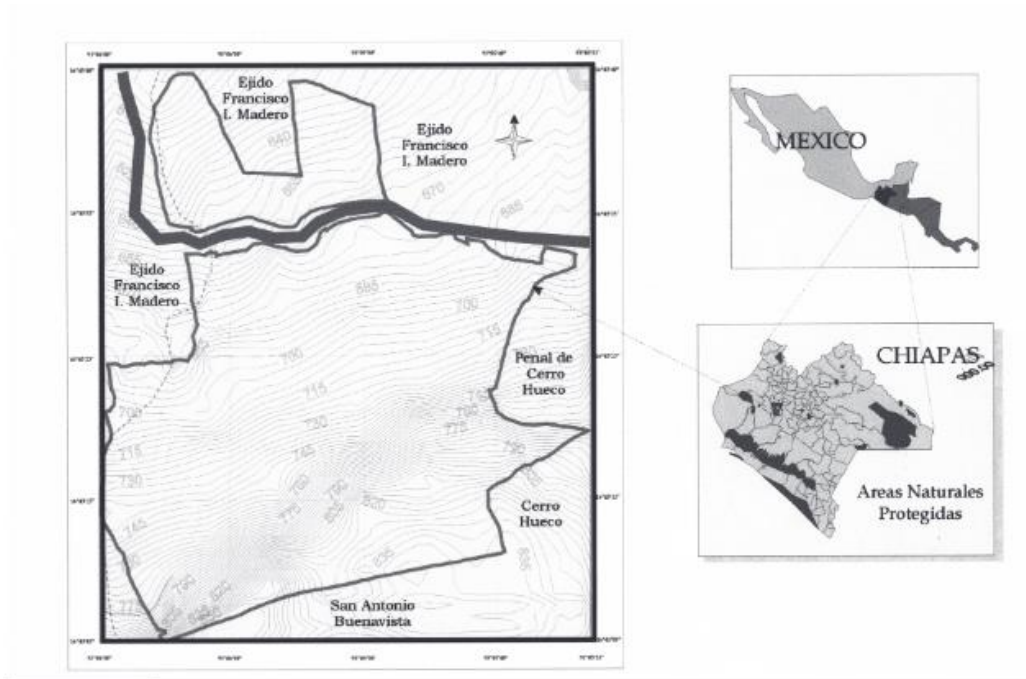
### Específicos

- Estandarizar el uso de los marcadores 2550 F - 2718 R y P2 - P8, para el sexado de diversas familias de aves que se encuentra en el zoológico (ZooMAT).
- Evaluación del conocimiento empírico del personal de cuidado profesional de zoológico (ZooMAT).

## V. ZONA DE ESTUDIO

### 5.1 Ubicación

La toma de muestras fue realizada en las instalaciones del Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro (ZooMAT) ubicado dentro de la Reserva Ecológica denominada El Zapotal, al oriente de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, con una extensión de 140 hectáreas. Se encuentran únicamente especies que habitan en el estado de Chiapas y algunas de los cuales están en peligro de extinción. Entre sus principales funciones se encuentran el mantenimiento y la conservación de la fauna de la región.



**Figura 17.** Delimitación de la Reserva Ecológica “El Zapotal”, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tomado de: Palacios et al. (2016).

## **VI. MÉTODOS**

### **6.1 Muestreo**

Se tomaron muestras de 48 ejemplares de aves de las familias Psittacidae, Ramphastidae, Strigidae y Accipitridae. Las muestras fueron proporcionadas por el personal calificado del área de la Clínica Veterinaria, encargado de las aves del Zoológico Regional Miguel Álvarez del Toro. En cada manejo se utilizaron guantes protectores para sostener las aves, jaulas de manejo y cajas para transportarlas de sus recintos al área de recolección de muestra.

### **6.2 Toma de muestra**

La toma de muestras se realizó por punción con una jeringa de insulina en la vena alar (Figura 18). La sangre fue depositada en un papel filtro; mientras que, en los ejemplares más pequeños, las muestras fueron a través de la extracción de plumas. Todas las muestras se depositaron en bolsas plásticas con las claves de identificación del ejemplar. Los datos de cada muestra fueron especificados en un Formato de Revisión Clínica Veterinaria. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular (LIDiaM) del Instituto de Ciencias Biológicas en la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y su mantuvieron en refrigeración a  $-4^{\circ}$  C hasta su procesamiento.



**Figura 18.** Toma de muestra de la vena alar de un ejemplar de Guacamaya verde (*Ara militaris*).

### **6.3 Extracción del ADN**

Se realizó la extracción del ADN genómico de las muestras sanguíneas de las aves utilizando el método de lisis celular-fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Esta técnica se fundamenta en la lisis total de las células y sus estructuras subcelulares mediante el empleo de detergentes con la posterior eliminación de las proteínas mediante su extracción y la de componentes lipídicos con solventes orgánicos (Anexo 2). Asimismo, se utilizó el kit ADN MiniPreps (Blood) en las muestras en las que el método utilizado anteriormente, no fue efectivo.

### **6.4 Amplificación del ADN**

Una vez extraído el ADN y comprobada la cantidad y calidad de material genético que se obtuvo de cada muestra a través de la cuantificación de ADN de cadena simple en el equipo Eppendorf BioSpectrometer® Basic, se realizó la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) como se



describe a continuación: Buffer 10X, My Taq (Bioline ®), utilizando P2 (5'-TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT-3'), P8 (5'-CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG-3') (Liza R, *et al*, 2008) como oligonucleótidos en la reacción de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 1; y 2550 F (5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3'), 2718 R (5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3') (Fridolfsson and Ellegren, 1999) (Cuadro 2), llevando a cabo el proceso de amplificación en un termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cyclor.

**Cuadro 1.** Programa de PCR para la amplificación de ADN con los primers P2-P8.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	45 segundos	
Alineamiento	48°C	45 segundos	30
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

**Cuadro 2.** Programa de PCR para la amplificación de ADN con los primers 2550 F- 2718 R.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
Alineamiento	55°C	30 segundos	30
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

## 6.5 Visualización de productos de ADN amplificados

Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 3 % utilizando GelRed®&GelGreen®Nucleic Acid Gel Stains que resalta el número de bandas amplificadas, permitiendo determinar el sexo de cada ave muestreada. El marcador de peso molecular utilizado fue el ADN Step Ladder de 50 pb Promega ®,

con 16 fragmentos que van desde 50 pb hasta 800 pb en incrementos de 50 pb. Debido al tamaño de las muestras, se realizó una segunda visualización en todos los casos, en geles de poliacrilamida al 6 % para visualizar una mejor resolución en el patrón de bandeo del ADN, lo que permitió una mejor interpretación de los resultados de sexado de cada individuo.

## **6.6 Conocimiento empírico del personal de Cuidado Profesional en el ZooMAT**

Se realizó una encuesta de tipo simple que consistió en ocho preguntas acerca de sus conocimientos en la identificación de las especies de las familias de los individuos sexados. Las encuestas fueron aplicadas a personal profesional encargado del manejo diario de las aves. La estructura de la entrevista se detalla en el Anexo 3.

## **VII. RESULTADOS**

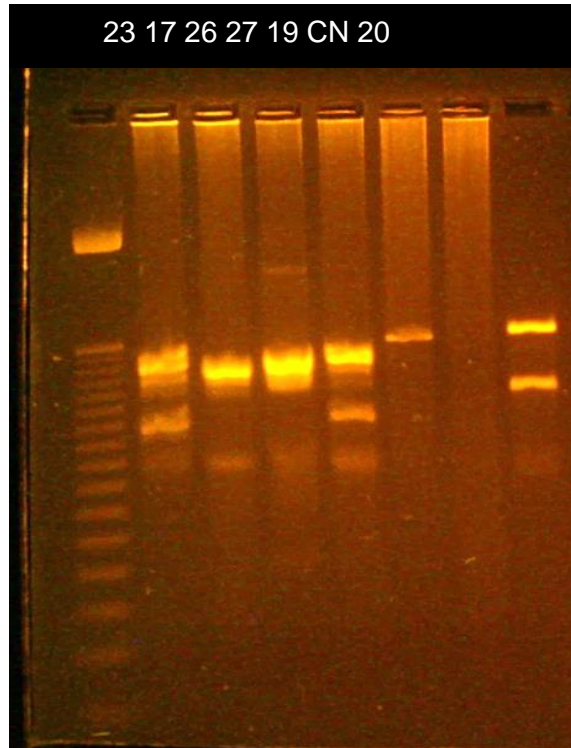
### **7.1 Extracción del ADN**

Se obtuvo el ADN genómico de las 48 muestras de aves, tanto de muestra sanguínea como de pluma. La cantidad y calidad de ADN obtenido fue buena en la mayoría de las muestras con una concentración alta ( $< 50$  ng/ul), mientras que en otras la cantidad fue muy baja. Las concentraciones más bajas se obtuvieron con el método Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, el cual se utilizó para procesar 17 muestras, teniendo mucha variación en cuanto a la concentración. Por el contrario, se obtuvo una mayor concentración y calidad de ADN con el kit EZ-10 Spin Column Genomic ADN Minipreps kit (Blood) de Bio Basic, extrayendo 31 muestras con este método.

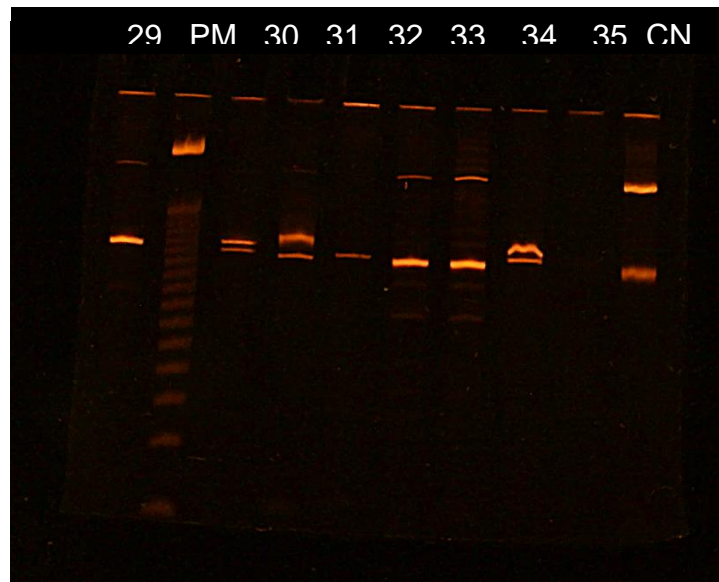
### **7.2 Amplificación del ADN**

Los primers P2-P8 se utilizaron para sexar de manera exitosa a los ejemplares de la familia Psittacidae (36 ejemplares en total). Mientras que los primers 2550F-2718R se utilizaron para sexar a los ejemplares del resto de las familias (12 ejemplares restantes).

La visualización de los productos amplificados se realizó en geles de agarosa al 3 % (Figura 19) y en geles de poliacrilamida al 6 % (Figura 20) obteniendo una lectura más clara en estos últimos. Un individuo se consideró HEMBRA cuando se observó un patrón de doble banda, mientras que se consideró un individuo como MACHO cuando se observó una sola banda amplificada. Estas bandas presentaron un tamaño entre 500 y 600 pares de bases.



**Figura 19.** Productos de ADN amplificados. Se observa que los machos presentan una sola banda, mientras que las hembras presentan dos bandas. CN = control negativo.



**Figura 20.** Gel de poliacrilamida que muestra una lectura con mayor claridad. Los individuos machos muestran una sola banda, mientras que las hembras muestran dos bandas amplificadas. PM = Marcador de peso molecular.

### 7.3 Sexado molecular

Se analizaron un total de 48 individuos pertenecientes a 14 especies de aves encontrando un mayor número de individuos machos (nM = 30) que de hembras (nH = 18) (Cuadro 3) (Figura 21).

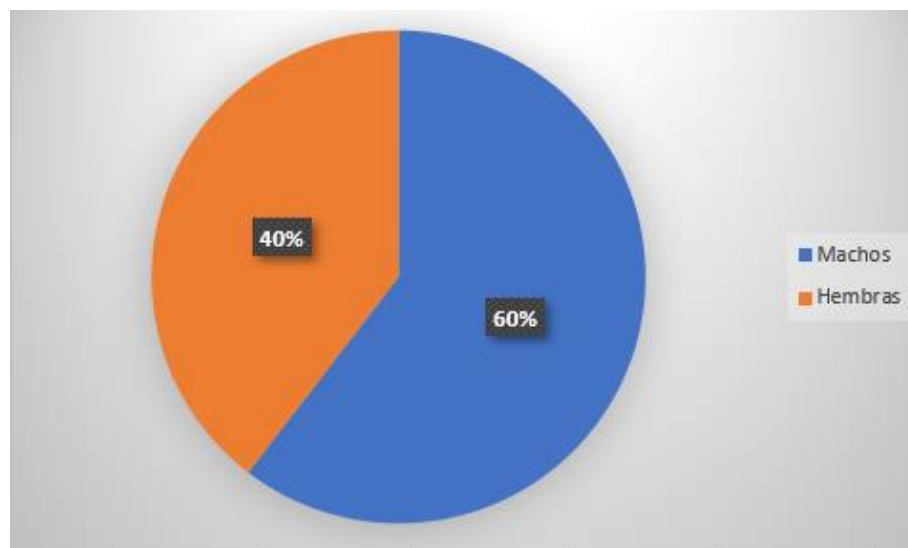
De las 14 especies analizadas, ocho especies mostraron una mayor proporción de individuos machos, de las cuales tres mostraron únicamente individuos machos (Figura 21). Mientras que, para *Buteo nitidus*, *Buteogallus urobigata*, *Amazona farinosa* y *Brotogeris jugularis*, todos los individuos sexados fueron hembras (Figura 22).

**Cuadro 3.** Resultados del sexado de aves muestreadas.

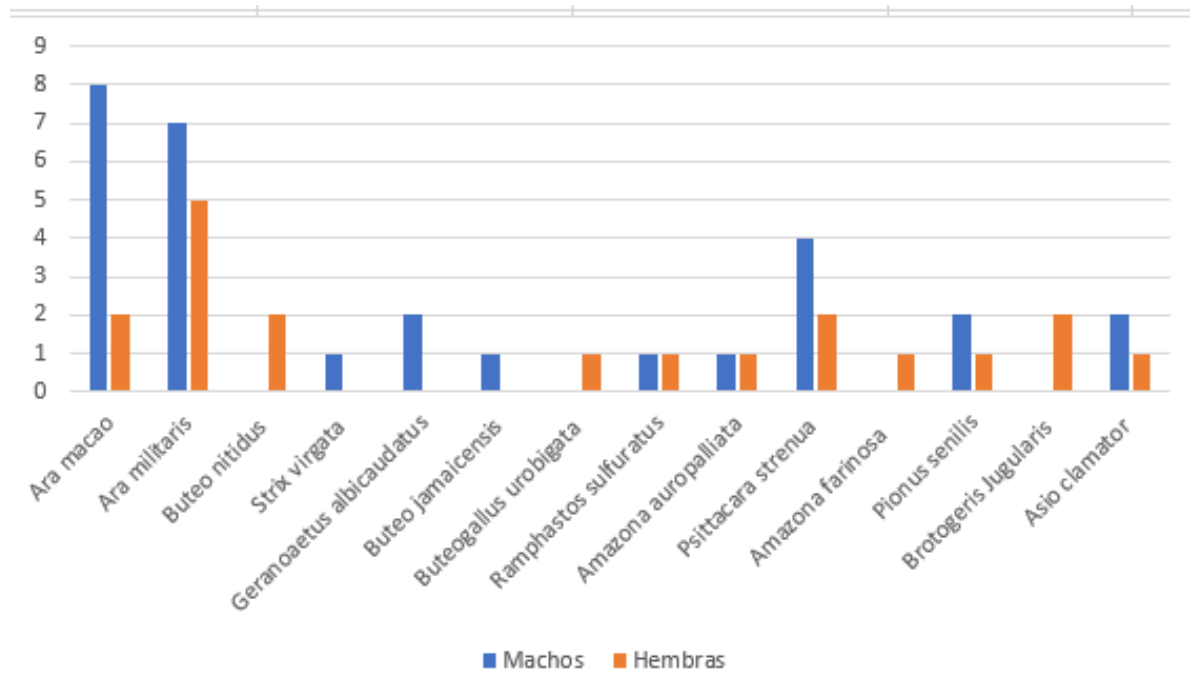
ID	Nombre científico	Anillo de identificación	Sexo
1	<i>Ara macao</i>	S/A	MACHO
2	<i>Ara militaris</i>	S/A	MACHO
3	<i>Buteo nitidus</i>	S/A	HEMBRA
4	<i>Buteo nitidus</i>	S/A	HEMBRA
5	<i>Ara militaris</i>	AVID*843*401*987	MACHO
6	<i>Strix Virgata</i>	ZOOMAT 00459 PD	MACHO
7	<i>Geranoaetus albicaudatus</i>	ZOOMAT 00105 P.D.	MACHO
8	<i>Geranoaetus albicaudatus</i>	ASC.90058 P.I.	MACHO
9	<i>Buteo jamaicensis</i>	ZOOMAT 00261	MACHO
10	<i>Buteogallus urobigata</i>	ZOOMAT 00146	HEMBRA
11	<i>Ramphastos sulfuratus</i>	ASC 833	MACHO
12	<i>Amazona auropalliata</i>	Lore	HEMBRA
13	<i>Ara militaris</i> (Lala)	AVID*843*396*992	HEMBRA
14	<i>Ara militaris</i>	AVID*843*401*987	MACHO
15	<i>Ramphastos sulfuratus</i>	ASC 862	MACHO
16	<i>Ara macao</i>	Anillo S/N PD	MACHO
17	<i>Psittacara strenua</i>	ZOOMAT 01138	MACHO
18	<i>Psittacara strenua</i>	ZOOMAT 00670	MACHO
19	<i>Psittacara strenua</i>	ZOOMAT 00765	MACHO
20	<i>Psittacara strenua</i>	ZOOMAT 00763	HEMBRA
21	<i>Psittacara strenua</i>	S/A	MACHO
22	<i>Psittacara strenua</i>	ZOOMAT 01159	HEMBRA
23	<i>Amazona farinosa</i>	ASC 90054	HEMBRA
24	<i>Pionus senilis</i>	S/A	HEMBRA
25	<i>Amazona auropalliata</i>	ZOOMAT 00627	MACHO
26	<i>Pionus senilis</i>	S/A	MACHO
27	<i>Pionus senilis</i>	S/A	MACHO
28	<i>Ara macao</i>	S/A	MACHO
29	<i>Ara macao</i>	XCARET577WA8561AE	MACHO
30	<i>Ara macao</i>	XCARET574WA8561AE	HEMBRA
31	<i>Ara macao</i>	"Blanco"	HEMBRA
32	<i>Ara macao</i>	XCARET578WA8561AE	MACHO

33	<i>Ara macao</i>	"Nancy"	MACHO
34	<i>Ara macao</i>	XCARET573WA8561AE	MACHO
35	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 403 438	HEMBRA
36	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 404 878	HEMBRA
37	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 401 196	MACHO
38	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 401 893	HEMBRA
39	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 409 074	HEMBRA
40	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 399 930	MACHO
41	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 403 335	MACHO
42	<i>Ara militaris</i>	AVID 843 397 024	MACHO
43	<i>Asio clamator</i>	ZOOMAT 02 531	HEMBRA
44	<i>Brotogeris jugularis</i>	Mostacho	HEMBRA
45	<i>Brotogeris jugularis</i>	Piquito	HEMBRA
46	<i>Ara macao</i>	Maca	MACHO
47	<i>Asio clamator</i>	ZOOMAT 02 562	MACHO
48	<i>Asio clamator</i>	ZOOMAT 02 561	MACHO

- S/A Sin anillo aviario



**Figura 21.** Porcentaje de machos y hembras del total de los individuos muestreados.



**Figura 22.** Proporción de sexos de aves analizadas por especie.

## 7.4 Conocimiento empírico

Se aplicó un total de 13 encuestas de tipo simple, diseñadas con preguntas abiertas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se detectó que todo el Personal de Cuidado Profesional coincide en que no es posible diferenciar los sexos de las especies analizadas considerando únicamente las características morfológicas de los individuos. De estas, únicamente en las familias Psittacidae y *Rhampastos* se pueda considerar el tamaño de las plumas y el pico como indicadores de dimorfismo sexual.

El peso de las aves se identificó como característica importante en la diferenciación de los sexos en individuos de las familias Accipitridae y Strigidae, coincidiendo en que los machos siempre son más pequeños que las hembras; sin embargo, este carácter resulta obsoleto si el peso del individuo está fuera de los rangos óptimos saludables.

Cuando se cuestionó al personal acerca de su opinión en términos de cuidado y métodos no invasivos para el sexado en las aves, consideraron que la toma de muestra sanguínea representa un episodio de estrés para los individuos; sin embargo, no representa peligro de muerte siempre y cuando se realice el manejo adecuado. Se preguntó al personal el grado de confianza que tenían al realizar un sexado basado únicamente en características morfológicas (dimorfismo sexual) de los individuos. A esto, el 75 % del personal mencionó que sí confía en este método, pues es factible realizarlo de manera adecuada con la suficiente experiencia; mientras que el 25 % mencionó no tener confianza en este método de sexado.

De los individuos analizados, el personal de cuidado profesional del área de aves manejaba información empírica sobre el sexo de seis individuos (Cuadro 4). De estos individuos, una vez que se realizaron las pruebas moleculares, se observó que únicamente coincidieron dos, el resto de los individuos estaban erróneamente sexados, incluyendo una pareja de periquitos bronceados (*Brotogeris jugularis*) que intentaban reproducir pero que las pruebas moleculares arrojaron que ambos individuos son hembras.

**Cuadro 4.** Individuos con información empírica de sexado.

<b>Nombre</b>	<b>Especie</b>	<b>Sexado previo</b>	<b>Sexado molecular</b>
Lore	<i>Amazona auropalliata</i>	HEMBRA	HEMBRA
Blanco	<i>Ara macao</i>	MACHO	HEMBRA
Nancy	<i>Ara macao</i>	HEMBRA	MACHO
Mostacho	<i>Brotogeris jugularis</i>	MACHO	HEMBRA
Piquito	<i>Brotogeris jugularis</i>	HEMBRA	HEMBRA
Maca	<i>Ara macao</i>	HEMBRA	MACHO



## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1 Establecimiento del método de extracción óptimo

En la búsqueda del método apropiado para llevar a cabo la extracción de ADN a partir de las muestras de sangre y de plumas, se optó por utilizar un método fiable y económico, el método de lisis celular-fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Sin embargo, debido a la mínima disponibilidad de muestra, se obtuvo una eficiencia baja en la extracción de ADN, dando como resultado muestras con baja calidad. Por tal motivo, se determinó emplear el EZ-10 Spin Column Genomic ADN Minipreps Kit (Blood) Bio Basic, obteniendo mejores resultados, logrando así la determinación del sexo en todas las muestras debido a los valores de pureza elevados y de mejor calidad de acuerdo con la cuantificación del ADN obtenido.

### 8.2 Sistema de sexado mediante PCR y electroforesis

La combinación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de CHD (cromo-helicasa-proteína de unión al ADN) con electroforesis es la técnica de sexado molecular aviar más común. La determinación del género a menudo falla cuando la diferencia de longitud entre los productos de PCR de los genes CHD-Z y CHD-W es demasiado corta para resolverse (Chang et al., 2008). En este contexto, parece ser una mejor opción utilizar un método de determinación del sexo en aves que ofrezca un rango de diferenciación amplio, como el empleo de los primers P2-P8 (Griffiths et al., 1998).

González-Suurbach (2014) logró sexar diferentes especies de los órdenes Passeriformes y Psittaciformes utilizando el set de primers P2-P8, obteniendo una determinación del sexo exitosa. Hasta donde se sabe, fue la primera vez que se realizaba la determinación del sexo en cinco de las especies muestreadas mediante marcadores moleculares: *Carduelis chloris*, *Carduelis cannabina*, *Turdus philomelos*, *Turdus merula* y *Fringilla coelebs*. Caeiro-Aguado (2015), en su trabajo de sexado de aves rapaces, también empleó el set de primers P2-P8 y obtuvo resultados exitosos.

En el caso de las aves analizadas en el ZooMAT, se utilizó el mismo set de primers P2-P8 para sexar las aves rapaces; sin embargo, a diferencia de los trabajos mencionados, no se logró amplificación. Vucicevic et al. (2013) presentaron el mismo problema al utilizar el set P2-P8, que solo fue útil en individuos de la familia Psittacidae.

Por otro lado, el set de primers 2550 F y 2718 R, diseñado para amplificar el gen CHD 1W y 1Z, es altamente conservado. Estos primers flanquean un intrón, amplificando de forma consistente un intrón de diferente tamaño entre CHD 1W y CHD 1Z en aves a lo largo de toda la filogenia aviar (Fridolfsson y Ellegren, 1999). Por esta razón, se decidió utilizar este set con las muestras que no amplificaron con P2-P8, obteniendo un 100 % de individuos sexados. Vucicevic et al. (2013), al emplear el set 2550 F y 2718 R, lograron sexar 50 de las 58 especies analizadas. Fridolfsson y Ellegren (1999) aplicaron este método de sexado molecular, sencillo y universal, también en aves no ratites, logrando sexar exitosamente a 47 de las 50 especies que estudiaron. La naturaleza conservada de los primers 2550 F y 2718 R, así como la consistente diferencia en el tamaño de los intrones de CHD 1W y CHD 1Z, indican que este sistema puede ser aplicado como un protocolo de PCR ampliamente utilizable, siendo un método efectivo, fiable y casi universal (Fridolfsson y Ellegren, 1999). En el caso de las aves rapaces, el uso de este set de primers resultó en una eficiencia del 100 %.

Lo anterior pone en evidencia que existe una variación en su efectividad según la familia a la que se aplican; en este trabajo, el par de primers P2-P8 mostró buenos resultados con la familia Psittacidae, pero no con otras, mientras que utilizando el set 2550 F y 2718 R amplificaron correctamente en Strigidae, Accipitridae y Ramphastidae.

Es importante señalar que los primers 2550 F y 2718 R se han probado en muchas menos especies que P2-P8, y la región amplificada es más extensa, lo que podría hacerlos más propensos a un polimorfismo mayor. Sin embargo, la diferencia en los tamaños de los productos Z y W obtenidos con 2550 F y 2718 R reduce la

probabilidad de que cualquier polimorfismo cause errores en la puntuación (Dawson et al., 2001).

Realizar pruebas de sexado molecular en aves bajo cuidado humano que se encuentran en zoológicos resulta de gran importancia, pues estos espacios representan una gran oportunidad para trabajar en la conservación de las especies, con la posibilidad de llevar a cabo reproducciones exitosas. Sin embargo, como se observó en los resultados aquí presentados, al no tener certeza sobre el sexo de los individuos, se pueden llegar a cometer errores y reproducciones no efectivas al estar emparejando individuos del mismo sexo, como fue el caso de los ejemplares de *Brotogeris jugularis*.

Las estrategias moleculares para el sexado aviar han mejorado notablemente en la última década, permitiendo el desarrollo de análisis simples, precisos, rápidos y a gran escala que revolucionan su aplicabilidad en estudios sobre biología de la conservación, reproductividad, ecología y evolución (Caeiro-Aguado, 2015). Algunos de estos novedosos mecanismos incluyen la PCR con análisis de curva de fusión (PCR/MCA), que elimina la necesidad de electroforesis en gel de agarosa, al correlacionar la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del amplicón específico con la detección de una banda electroforética, lo que resulta en un proceso más rápido y económico (Chang et al., 2008). También se ha desarrollado la electroforesis capilar, que es automatizada, de alto rendimiento y resolución, y la técnica de High-Resolution Melting (HRM), que ofrece elevada sensibilidad y rapidez (Caeiro-Aguado, 2015). En conclusión, el uso de técnicas moleculares para el sexado es menos invasivo y estresante para las aves que los métodos tradicionales, como la laparoscopia, y proporciona resultados más rápidos y fiables que el conocimiento empírico

## **IX. CONCLUSIONES**

El uso y empleo de las técnicas moleculares basadas en PCR mediante la amplificación del gen CHD permite llevar a cabo un sexado molecular efectivo, fiable y considerablemente rápido con aquellas especies que no presentan un marcado dimorfismo sexual. De esta manera, los trabajos de investigación molecular han contribuido directamente en la conservación de especies amenazadas, teniendo un impacto en el manejo reproductivo de estas especies, pues con el uso de esta herramienta, es posible tener un adecuado número de parejas reproductivas en las poblaciones y tener una mejor evaluación en cuanto a las proporciones del sexo. Por lo tanto, la capacidad de determinar de forma rápida y fiable el sexo de las aves es muy importante para el éxito de los programas de cría de aves en cautiverio.

## **X. RECOMENDACIONES**

Dado que el manejo de las aves y la toma de muestra sanguínea representa un episodio de estrés para los individuos, es importante que todo el personal encargado de estas tareas se encuentre debidamente capacitado para evitar cualquier daño a los ejemplares y obtener de manera adecuada las muestras necesarias para llevar a cabo los análisis.

Considerando la importancia de realizar pruebas moleculares para determinar de forma certera el sexo de los ejemplares que se encuentran en el ZooMAT, sería importante que dicha institución realice colaboraciones con instituciones académicas, como se realizó en este trabajo, para que ellos puedan contar con la información necesaria para poder realizar reproducciones exitosas y seguir trabajando así en pro de la conservación de las especies de aves del Estado.

## XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

Álvarez Carlos, 2022, *Clamator asio* (Búho rayado), The Cornell Lab of Ornithology, Buenos Aires Argentina, consultada en: <https://macaulaylibrary.org/asset/609892016>

Aceves Herrera Gustavo, 2022, Perico Centroamericano *Psittacara strenuus*, consultado el 13 de junio del 2023 en <https://www.naturalista.mx/observations/109144382>.

Alex Harman, 2015, Tucán Pico Canoa (*Ramphastos sulfuratus*), consultado el 13 de Junio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/107357345>.

Altamirano González Ortega, M.A. and Guzmán Hernández, J. 2009 'La Colección Zoológica Regional (Aves) del Instituto de Historia Natural de Chiapas, México', *Huitzil*, 10(1), pp. 7–14.

Álvarez del Toro Miguel, 1980, LAS AVES DE CHIAPAS, segunda edición, Instituto de Historia Natural del Estado de Chiapas, Departamento de Zoología, Publicación de la Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Artigas Azas Juan Miguel, 2021, Guacamaya Verde (*Ara militaris*), consultado el 12 de junio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/170482241>

Barbeito, C.G. and González, N.V. 2014 *Histología de las aves*. D - Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Available at: <http://elibro.net.cuidvirtual.unicach.mx/es/lc/unicach/titulos/66426> (Accessed: 3 October 2022).

Caeiro Aguado, M. 2015 'Sexado molecular en aves rapaces'. Available at: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/14859> (Accessed: 3 October 2022).

Cantú Guzmán Juan Carlos, Sánchez Saldaña María Elena, 2021 , Guía de Identificación de PSITÁCIDOS de MESOAMÉRICA [de México hasta Costa Rica], Defenders of Wildlife y Teyeliz, A.C.

CCA 2017, Plan de acción de América del Norte para un comercio sustentable de especies de loro, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 50 pp.

CONABIO 2023, Loro corona azul *Amazona farinosa*, Disponible en <https://enciclovida.mx/especies/36544-amazona-farinosa>, consultado el 27 de junio del 2023.

CONABIO 2023, Perico centroamericano *Psittacara strenuus*, disponible en: <https://enciclovida.mx/especies/37300-psittacara-strenuus>., consultado el 04 de Julio del 2023.

CONABIO 2023. Loro nuca amarilla *Amazona auropalliata*, disponible en <https://enciclovida.mx/especies/36542-amazona-auropalliata>, consultado el 04 de Julio del 2023.

CONABIO, 2023, Aguililla cola roja, *Buteo jamaicensis*, disponible en: <https://enciclovida.mx/especies/35561-buteo-jamaicensis>, consultado el 04 de Julio del 2023.

CONABIO, 2023, Loro corona blanca, *Pionus senilis*, disponible en: <https://enciclovida.mx/especies/36558-pionus-senilis>, consultado el 04 de junio del 2023.

CONANP, 2010, Programa de conservación de especies en riesgo: ficha Guacamaya roja, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, <https://simec.conanp.gob.mx/Publicaciones2020/Publicaciones%20CONANP/Parte%202/Monitoreo/2010%20Ficha%20Guacamaya%20Roja.pdf>.

CONANP, 2015, AVES RAPACES DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIERRA LA LAGUNA, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, disponible en <https://simec.conanp.gob.mx/Publicaciones2020/Publicaciones%20CONANP/Parte%202/Guias/2015%20Guia%20Aves%20rapaces%20RB%20La%20Laguna.pdf>, consultado el 04 de Julio del 2023.

Craig K. Hunt, 2020, Aguililla Cola Roja (*Buteo jamaicensis*), consultado el 05 de Julio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/101327658>.

David Beadle 2019, Loro Corona Azul (*Amazona farinosa*), consultado el 13 de Junio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/40998489>.

Dubiec, A. y Zagalska-Neubauer, M. 2006 'Molecular techniques for sex identification in birds', *Biological Letters*, 43, pp. 3–12.

Enciclovida, CONABIO, 2021. Aguililla negra (*Buteogallus urubitinga*). Sitio web consultado el 31 julio del 2023 en: <https://enciclovida.mx/especies/35569-buteogallus-urubitinga>

Francisco Dubón, Guacamaya roja (*Ara macao*) , consultado el 12 de junio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/64735784>.

Fridolfsson, A.-K. y Ellegren, H. 1999 'A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds', *Journal of Avian Biology*, 30(1), pp. 116–121. Available at: <https://doi.org/10.2307/3677252>.

Fridolfsson, A.-K., Cheng H, Copeland N. G, Jenkins N, hsiao-ching I, Raudsepp T, Woodage T, Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H, 1998 'evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14), pp. 8147–8152.

Gill F, D Donsker y P Rasmussen. 2023. Lista Mundial de Aves del COI (v13.1). doi: 10.14344/IOC.ML.13.1.

González Suurbach, S. 2014 'Determinación del sexo en aves'. Available at: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/12402> (Accessed: 3 October 2022).

Griffiths, R. and Tiwari, B. 1993 'The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), pp. 8324–8326. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8324>.

Griffiths, R. Mike C. Double, Kate Orr, Robert J. G. Dawson 1998 'A DNA test to sex most birds', *Molecular Ecology*, 7(8), pp. 1071–1075. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x>.

Griffiths, Richard *et al.* 1998 'A DNA test to sex most birds', *Molecular Ecology*, 7(8), pp. 1071–1075. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x>.

Harman Alex, 2015, Tucán Pico Canoa (*Ramphastos sulfuratus*), consultado



el 12 de junio del 2023 en <https://www.naturalista.mx/photos/107357345>.

Jensen, T., Pernasetti, F.M. and Durrant, B. 2003 'Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers', *Zoo Biology*, 22(6), pp. 561–571. Available at: <https://doi.org/10.1002/zoo.10101>.

Liza R., J., Maturrano H., L. and Rosadio A., R. 2008, 'Determinación del sexo por ADN en cinco especies de guacamayos', *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(1), pp. 31–36.

Matta Camacho, N.E. *et al.* 2009, 'Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares'. Available at: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/24136> (Accessed: 2 March 2023).

Navarro-Sigüenza, A.G. *et al.* 2014, 'Biodiversidad de aves en México', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, pp. 476–495. Available at: <https://doi.org/10.7550/rmb.41882>.

Newton, I., 1998, *Population Limitation in Birds*. Academic Press.

Pérez Oscar, 2021, Loro Corona Blanca (*Pionus senilis*), consultado el 05 de Julio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/116133883>.

Rangel-Salazar, J.L. *et al.* (2013) 'DIVERSIDAD DE AVES: UN ANÁLISIS ESPACIAL', p. 10.

Rengifo, M., Rodríguez, J., Agapito, J., & Espinoza, J., 2016, Estandarización de un protocolo de extracción de ADN en pieles del Pecari de collar silvestre (Pecari tajacu Linnaeus 1758).

Sherony Dominic, s.f, Búho Café (*Strix virgata*), consultado el 05 de Julio del 2023 en: <https://www.naturalista.mx/photos/3024135>.

Smith, C.A. (2010) 'Rowley Review', *Emu - Austral Ornithology*, 110(4), pp. 364–377. Available at: <https://doi.org/10.1071/MU10030>.

van den Berghe Eric, 2013, Loro Nuca Amarilla (*Amazona auropalliata*), consultado el 13 de junio del 2023: <https://www.naturalista.mx/photos/110660889>.

Vucicevic, M. *et al.* 2013, 'Sex Determination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing', *Zoo Biology*, 32(3), pp. 269–276. Available at: <https://doi.org/10.1002/zoo.21010>.

Wang, N., Li, J., Liu, Y., Zhang, Z., 2010, Improvement on molecular sex identification primers for Passeriform bird species. *Chinese Birds*, 1, 65-69.

Weckstein, J.D. 2005, 'Molecular Phylogenetics of the Ramphastos Toucans: Implications for the Evolution of Morphology, Vocalizations, and Coloration', *The Auk*, 122(4), pp. 1191–1209. Available at: <https://doi.org/10.1093/auk/122.4.1191>.

## XII. ANEXOS

### **Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN por el método de lisis celular fenol-cloroformo-álcool isoamílico (proporcionado por la Dra. Gabriela Parra Olea)**

Rotular la serie de microtubos de 1.5 ml.

- ❖ Agregar a cada tubo
  - los fragmentos de tejidos
  - 360  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5 M (pH 8.0)
  - 13  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% por su consistencia jabonosa se debe de cuidar que la punta de la micropipeta no toque los bordes del tubo y forme burbujas; en caso de que ocurra hay que desechar las puntas para evitar contaminación.
  - 25  $\mu\text{L}$  de Tris HCL 0.1 M (pH 8.0)
  - 13  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K 10 mg/ml.
  - Se dejan incubando a 56°C, por un día.
  
- ❖ En los tubos con las muestras, añadir 500  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo-álcool isoamílico. Agitar bien y centrifugar 1 minuto a 13200 rp
- ❖ Trasladar el sobrenadante a la segunda serie de tubos rotulados y añadir 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo, agitar bien y volver a centrifugar a 1 minuto.
- ❖ Trasladar el sobrenadante a la tercera serie de tubos rotulados limpios y añadir 700  $\mu\text{L}$  de alcohol frío (100%). Dejar precipitar durante toda la noche a 4°C.
- ❖ Centrifugar durante 10 minutos a 13200 rpm, de preferencia en una centrífuga refrigerada. Decantar el alcohol o sacarlo utilizando una pipeta de 200  $\mu\text{L}$ , teniendo cuidado de no llevarte el botón de ADN. Añadir a cada tubo 700  $\mu\text{L}$  de etanol 70% frío. Volver a centrifugar durante 10 minutos a la misma velocidad.
- ❖ Decantar de nuevo el alcohol o sacarlo con una pipeta de 200  $\mu\text{L}$ , teniendo cuidado de no llevarse el botón de ADN, secar el precipitado en la centrífuga de vacío o meterlos a un baño seco destapados a 37°C tapados por 30 minutos.

- ❖ Resuspender en 200  $\mu$ L de agua bi-destilada esterilizada.
- ❖ Las extracciones del ADN con este método se visualizarán en gel de agarosa al 1% P/V, teñidas con colorante GelRed®&GelGreen®Nucleic Acid Gel Stains para resaltar las moléculas de ADN y visualizarlo en el transiluminador UVP-GelMax®Imager.

## **Anexo 2. Cuestionario conocimientos empíricos sobre el sexo de las aves**

### **1. ¿Qué rasgos considera como un factor para determinar el sexo en aves de la familia *Psittacidae*?**

Dentro de los rasgos que mencionaron están: tamaño del cuerpo, tamaño de la cabeza, tamaño del pico, la coloración del plumaje, aspectos conductuales y anatómicos, la separación de los huesos pélvicos y el tamaño de una estructura del ojo que es más pequeño en hembras. Sin embargo, también mencionaron que es poco confiable basar el sexado únicamente en estas características porque muchas de ellas pueden depender de otros factores como una deficiencia alimentaria o la edad de los individuos. Mencionaron también que la única forma en la que pueden diferenciar es la postura de huevos, indicador de que son hembras.

### **2. ¿Qué rasgos considera como un factor para determinar el sexo en aves del género *Ramphastos*?**

Mencionaron los siguientes rasgos: tamaño del pico (en machos es más largo y robusto mientras que en las hembras es más corto y delgado), tamaño corporal, comportamiento y temperamento. Aunque también comentaron que no existe dimorfismo sexual en estas especies y que únicamente se puede saber cuando hay postura de huevos.

### **3. ¿Qué rasgos considera como un factor para determinar el sexo en aves de la familia *Strigidae*?**

Los rasgos mencionados fueron: tamaño corporal (las hembras son más grandes), el peso (las hembras pesan 30 % más que los machos), el comportamiento (las hembras son más agresivas), y la coloración. Sin embargo, nuevamente hubo un consenso en que son rasgos que pueden depender de la alimentación y la edad y por lo tanto son poco confiables.

**4. ¿Qué rasgos considera como un factor para determinar el sexo en aves de la familia Accipitridae?**

Una respuesta constante a esta pregunta fue que era muy similar a la familia Strigidae, siendo el tamaño corporal, el tamaño de patas y el peso (30 % más peso en hembras) las respuestas más comunes. Se mencionó también que el patrón de coloración es más marcado en macho. Sin embargo, de la misma forma que las familias anteriores, no existe dimorfismo sexual en estas especies y por tanto esos caracteres no son confiables para sexar a los individuos.

**5. ¿Considera que los métodos de sexado son muy invasivos para las aves?  
¿Se ha producido alguna muerte durante el manejo?**

El método por endoscopía sí es muy invasivo y tiene un mayor riesgo para los animales. La toma de muestra de sangre no es tan invasiva, sin embargo, el problema es el manejo que se le tiene que dar al ejemplar, que requiere de mucha experiencia para provocar el menor estrés posible en el individuo. Las muestras de pluma no son invasivas. En el ZooMAT no se ha producido ninguna muerte durante el manejo.

**6. ¿Qué porcentaje (%) de confiabilidad ha detectado en la determinación cualitativa basada en características morfológicas del sexo en aves?**

Se encontraron respuestas variadas, desde un 100 % de confiabilidad hasta muy baja.

**7. ¿Qué opina de la toma de muestra para el sexado genético de las aves?**

Se mencionó que no es tan práctico porque la toma de muestra de sangre provoca mucho estrés en los animales. Se comentó que, para aves pequeñas o muy nerviosas, las muestras de pluma son una mejor opción. Sin embargo, se resaltó la importancia de hacer estos análisis, pero con una buena planeación y cuidado para disminuir lo más posible el estrés en los ejemplares.