

## UN MÉTODO MOLECULAR RÁPIDO, NO INVASIVO Y SIMPLE PARA DETERMINAR EL SEXO EN PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS

### A RAPID, NON INVASIVE AND SIMPLE MOLECULAR METHOD FOR SEX DETERMINATION IN PYGOSCELIS PENGUINS

Santos M.R.<sup>1\*</sup>, Santos M.M.<sup>2,3</sup>, Terán E.M.<sup>1</sup>, Bailliet G.<sup>1</sup>, Juárez M.A.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, Calle 526 y Camino General Belgrano, B1900BTE, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Departamento Biología de Predadores Tope, Instituto Antártico Argentino, 25 de Mayo 1143, B1650 CSP, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Laboratorios Anexos, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

\*Autor correspondiente: mritasantos@yahoo.com.ar

---

#### ABSTRACT

In Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*) and gentoo penguins (*Pygoscelis papua*), the conspicuous sexual dimorphism often makes it difficult to determine sex on the basis of external morphology. The information about sex is important in many ecology and conservation studies. In this paper we evaluated the use of an established primer pair (2550F/2718R) to identify sex in sexually monomorphic birds. In both penguin species, it resulted in two distinct *CHD1Z* and *CHD1W* PCR bands, allowing sex identification. This is a simple, rapid and cheap system for molecular sexing of gentoo and Adélie penguins.

**Key words:** *CHD* gene, sex identification, penguins

#### RESUMEN

En los pingüinos Adélie (*Pygoscelis adeliae*) y pingüinos gentoo (*Pygoscelis papua*), no existe un dimorfismo sexual conspicuo y a menudo resulta difícil determinar el sexo en base a la morfología externa. La información sobre el sexo es importante en muchos estudios de ecología y conservación. En este artículo se evaluó el uso de un par de cebadores (2550F/2718R) para identificar el sexo en aves sexualmente monomórficas. Para ambas especies de pingüinos la amplificación produjo dos bandas discretas, *CHD1Z* y *CHD1W*, que permitieron la identificación sexual. Se trata de un sistema sencillo, rápido y económico para el sexaje molecular de los pingüinos gentoo y Adélie.

**Palabras clave:** gen *CHD*, sexado molecular, pingüinos

---

Fecha de recepción: 11/04/2017  
Fecha de aceptación de versión final: 21/07/2017

## INTRODUCCIÓN

Un parámetro biológico central en el estudio de cualquier población animal es la asignación precisa del sexo. En los pingüinos, los machos son ligeramente más grandes que las hembras, pero muy similares, si no idénticos, en la coloración del plumaje (Renner y Davis, 1991). Asimismo, muchas especies de pingüinos muestran una considerable variación geográfica en el tamaño corporal (Williams, 1995). En particular, el género *Pygoscelis* muestra sólo un dimorfismo sexual leve (Agnew y Kerry, 1995). El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la utilidad en la determinación del sexo de un par de cebadores establecidos (2550F/2718R) (Fridolfsson y Ellegren, 1999) en pingüinos gentoo y Adélie. Estos cebadores amplifican la región del gen cromosoma-helicase de unión al ADN (*CHD*), el cual está ligado al cromosoma Z como al W. *CHD* se encuentra muy conservado y estos cebadores reconocen secuencias nucleotídicas exónicas. Esto permite observar diferencias de tamaño en los productos amplificados del gen *CHD* en los cromosomas W y Z, debido a que presentan longitudes diferentes en los intrones.

Para esta especie, el sexado molecular es un método atractivo ya que potencialmente puede proporcionar un medio preciso, no invasivo y rápido para la identificación sexual (Lessells y Mateman, 1996; Fridolfsson y Ellegren, 1999).

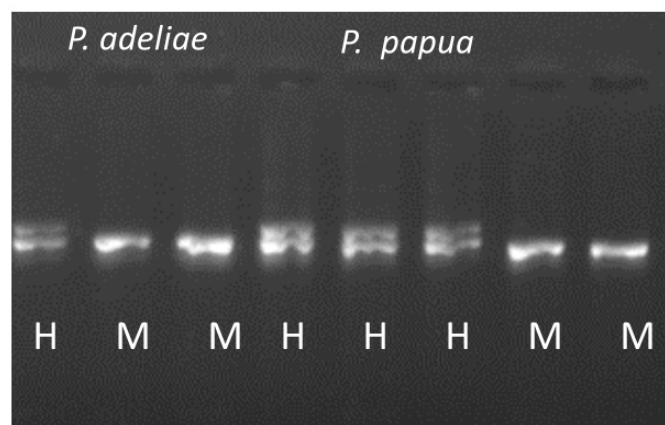
## MATERIALES Y MÉTODOS

Analizamos 46 ejemplares de *Pygoscelis papua* y 141 de *Pygoscelis adeliae* de la colonia Punta Stranger, 25 de Mayo, Isla King George (62° 16' S, 58° 37' W), Islas Shetland del Sur, dentro del Arrecife Antártico Especialmente Protegido N° 132 ("Península de Potter") durante la temporada 2011-2012. En esta colonia, aproximadamente 3.700 pares de Adélie y 4.990 pares de pingüinos gentoo se reproducen simpátricamente (Juárez *et al.*, 2016). Extrajimos una gota de sangre de la membrana interdigital y se almacenó en papel FTA®. Se incubó un disco de papel de 5 mm de diámetro en 100 ml de NaOH 50 mM a 99 ° C y luego se enfrió a 4° C. La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl con 10 x buffer (Invitrogen); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM DNTPS; 2,5 U de polimerasa TaqDna y 0,25 picomoles de cada cebador, 1 µl (20 ng) de ADN molde y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. El perfil térmico comprendió una etapa de desnaturalización inicial de 94°

C durante 2 min, seguida de un ciclo único de 2 min a 94° C, 30 s a 5° C y 1 min a 72° C y 36 ciclos de 30 s a 92° C, 30 s a 50° C, 45 s a 72 ° C. Se añadió una etapa de extensión final de 72° C durante 5 min después del último ciclo. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa al 1% y se detectaron con *GelRed*<sup>TM</sup>.

## RESULTADOS

Los cebadores 2550F/2718R (Fridolfsson y Ellegren, 1999), diseñados para detectar diferencias de intrones en *CHD1W* y *CHD1Z* mostraron diferencias de tamaño, y el sexo pudo determinarse en todos los individuos. Se obtuvo una única banda de machos y dos en hembras en geles de agarosa al 1%. Los tamaños estimados de las bandas fueron 663 y 743 pares de bases para *CHD1Z* y *CHD1W* genes respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. Las tres primeras calles corresponden a *Pygoscelis adeliae* y las subsiguientes a *Pygoscelis papua*. Las hembras (H) son identificadas por la presencia de dos bandas y los machos (M) por sólo una.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con Dubiec y Zagalska-Neubauer (2006), el sexado molecular en estas especies basado en la técnica *CHD* es preciso, fácil, relativamente barato y rápido. El procesamiento de una muestra incluyendo la extracción de ADN, la PCR y la resolución de los productos de PCR en un gel puede tardar menos de 5 h. Los cebadores

2550F/2718R fueron adecuados para ambas especies. El diseño de estos últimos es tal que el fragmento W amplificado es el más pequeño, evitando así que las hembras sean incorrectamente tipificadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agnew D.J., Kerry R. (1995) Sexual dimorphism in penguins. In: Dann P., Norman I., Reilly P. (Eds.): The penguins. Surrey Beatty & Sons, Sydney, pp. 299-318.
- Dubiec A., Zagalska-Neubauer M. (2006) Molecular techniques for sex identification in birds. Biol. Lett. 43: 3-12.
- Fridolfsson A.K., Ellegren H. (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. J. Avian Biol. 30: 116-121.
- Juárez M.A., Santos M., Mennucci J.A., Coria N.R., Mariano-Jelicich R. (2016) Diet composition and foraging habitats of Adélie and gentoo penguins in three different stages of their annual cycle. Mar. Biol. 163:105.
- Lessells K., Mateman C. (1996) Molecular sexing of birds. Nature 383: 761-762.
- Renner M., Davis L. (1999) Sexing little Penguins *Eudyptula minor* from Cook Strait, New Zealand using discriminant function analysis. Emu 99: 74-79.
- Williams T.D. (1995) The penguins. Oxford University Press. New York, EEUU.