

DIMORFISMO SEXUAL Y DETERMINACIÓN DEL SEXO CON DNA EN EL PELLAR COMÚN (*VANELLUS CHILENSIS*)

Lorena Cruz-Bernate¹, Yilton Riascos², & Guillermo Barreto¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, A.A. 25360 Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia.
E-mail: lorena.cruz@correounivalle.edu.co

²Departamento de Matemáticas Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Popayán, Cauca, Colombia.

Abstract. – Sexual size dimorphism and DNA sex determination in Southern Lapwing (*Vanellus chilensis*). – Sex morphometric differences were evaluated in *Vanellus chilensis* in Cauca Valley, southwestern Colombia. CDH1 gene intron (chrome and helicase domains) located in the sex chromosomes of the birds (W, Z), was amplified in order to molecular sex determination. A discriminant function analysis was carried out based on 13 body measurements of the adult individuals captured. Males were significantly larger than the females in eight of body measurements (body mass, carpal spur length, carpal spur distal width, tarsus distal width, wing chord, tail length, total length, and wingspan). The discriminant function based on these eight traits enabled reliable sexing of 83.3% of individuals. We propose a morphometric method as a non-invasive and low-cost technique for sex identification of Southern Lapwing individuals.

Resumen. – Se evaluó las diferencias morfométricas entre sexos en individuos de *Vanellus chilensis*, en el Valle del Cauca, suroccidente de Colombia. El sexo se determinó a partir de métodos moleculares con la amplificación de un intrón del gen CHD1 (dominios cromo y helicasa), ubicado en los cromosomas sexuales (W, Z). Después, se realizó un análisis de función discriminante a partir de 13 medidas corporales de los individuos adultos capturados. Los machos fueron significativamente más grandes que las hembras en masa corporal, espuela carpal largo y ancho, tarso-metatarso ancho distal, ala, rectrices, largo total y envergadura. Se encontró una ecuación que permite identificar el sexo con una exactitud del 83,3%. Se propone el método morfométrico como una alternativa no invasiva y de bajo costo para la determinación del sexo de individuos de la especie. *Aceptado el 21 de febrero de 2014.*

Key words: Southern Lapwing, *Vanellus chilensis*, Colombia, discriminant function analysis, DNA-based sexing, morphological sexing, sex determination, sexual dimorphism.

INTRODUCCIÓN

Determinar el sexo de los individuos permite discriminar la participación de cada uno de ellos en actividades como cortejo, selección de sitio de anidamiento, incubación, empujamiento, defensa territorial intra e inter-específica, cuidado y socialización de crías, defensa contra depredadores y cópulas extra-

pareja, entre otros (Hughes 1998, Guinness & Weatherhead 2002, González-Solis *et al.* 2007). Además, permite incursionar en temas relacionados con el cambio en la proporción de sexos a través del tiempo (Yan-ping *et al.* 2006). El conocer esta participación por sexos y la frecuencia de sus conductas a través del tiempo en las poblaciones, da herramientas para dilucidar patrones evolutivos eco-con-

ductuales y poder proponer estrategias puntuales de conservación (Donald 2007).

Han existido a través del tiempo varias alternativas para determinar el sexo en especies monomórficas: cariotipos (Bloom 1969, Hammar 1970, Au *et al.* 1975, de Lucca 1977, Sasaki *et al.* 1984, Herzog 1990, Giannoni *et al.* 1993), laparoscopias (Greenwood 1983, Jones *et al.* 1984, Richner 1989), presencia o ausencia de caracteres reproductivos como tamaño de la cloaca y parche de incubación (Lishman 1985, Suthers 1994, Yamazaki *et al.* 1994, Gray & Hamer 2001), comparación de dimensiones morfométricas (Mawhinney & Diamond 1999, Wilson 1999, Shepard *et al.* 2004) y amplificación de intrones en los cromosomas sexuales (Quinn *et al.* 1990, Griffiths *et al.* 1992, Longmire *et al.* 1993, Ellegren 1996, Griffiths *et al.* 1998, Lessells & Mateman 1998, Ellegren 2000, Gutiérrez-Corcheró *et al.* 2002). Para muchas especies la determinación del sexo con medidas morfométricas por medio de una función discriminante ha proporcionado un método no invasivo, económico y confiable (exactitud del 80 hasta el 100%) (Blanco *et al.* 1996, Bosch 1996, Zavalaga & Paredes 1997, Mawhinney & Diamond 1999, Wilson 1999, Donohue & Dufty 2006, Frey *et al.* 2008).

En la subfamilia Vanellinae, 16 de las 24 especies del género *Vanellus* presentan características morfológicas como crestas, barbas y espuelas carpales más prominentes en los machos que en las hembras, lo que supuestamente se correlaciona con la naturaleza agresiva del macho (del Hoyo *et al.* 1996). El Pellar Común (*Vanellus chilensis*) se distribuye al norte, sur y occidente de Sur América (del Hoyo *et al.* 1996). Prefiere pastizales, potreros de producción ganadera y zonas verdes dentro de perímetro urbano. A pesar de su amplia distribución geográfica y ocurrencia en zonas con relativa alta perturbación humana, se desconocen diversos aspectos básicos de su ecología (e.g., Costa 2002, Saracura *et al.* 2008,

Maruyama *et al.* 2010). Esta especie al igual que muchas otras no presenta un aparente dimorfismo sexual en tamaño corporal (del Hoyo *et al.* 1996), lo que constituye uno de los impedimentos claves para el desarrollo de estudios puntuales en ecología conductual, historia natural, dinámica poblacional y biología de la conservación de la especie.

En este estudio nuestros objetivos fueron determinar si existen diferencias morfométricas entre los sexos en el Pellar Común y presentar una función discriminante que facilite la determinación sexual.

MÉTODOS

Este estudio se realizó entre marzo de 2001 y diciembre de 2003 en la Reserva Natural El Hatico, Municipio de El Cerrito (03°47'N, 76°16'W) y el campus de la Universidad del Valle (3°22'N, 76°32'W), Municipio de Cali, Departamento Valle del Cauca, Colombia. Ambas áreas de estudio se encuentran a una elevación de 1000 m.s.n.m. y sus precipitaciones presentan una misma distribución bimodal con máximos de lluvia en marzo-abril y octubre-diciembre, separados por dos épocas secas con mínimos de precipitación en agosto y febrero. De acuerdo con sus características climáticas ambas localidades se clasifican como Bosque Seco Tropical (bs-T), según el sistema de Holdridge (Espinal 1967).

La Reserva Natural El Hatico tiene una extensión de 288 ha con una cobertura de bosque natural, potreros de extensión variable dedicados a cultivo de la caña de azúcar orgánica y sistemas silvopastoriles. Los potreros están compuestos por un estrato herbáceo de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), un estrato arbustivo de leucaena (*Leucaena leucocephala*) y un estrato arbóreo de algarrobo (*Prosopis juliflora*), matarratón (*Gliricidia sepium*), chiminango (*Pithecellobium dulce*), guácimo (*Guazuma ulmifolia*), samán (*P. saman*), ceiba (*Ceiba pentandra*), mango (*Mangifera indica*) y

pomarroso (*Eugenia jambos*), entre otros. La precipitación y temperatura promedio anual es de 511 mm y 23,6°C, respectivamente. El campus de la Universidad del Valle posee una extensión de 100 ha ocupadas por construcciones civiles (8,5 ha), dos lagos (1 ha), jardines, prados y pastizales (45,5 ha), y áreas con densa vegetación de regeneración natural (44 ha) donde predominan *Erythrina* sp., *Ceiba pentandra*, *Ochroma lagopus*, *Eugenia jambos*, *Canarium odoratum*, *G. ulmifolia*, *Bauhinia* sp., *Psidium guajaba*, *Inga* sp., *Jacaranda cancana*, *P. dulce*, *Ficus* sp. y *Guadua angustifolia*. La precipitación y temperatura promedio anual es de 1094,5 mm y 24,5°C, respectivamente (Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC).

Para la captura de los individuos se dedicaron 222 horas trampa en los nidos previamente identificados. La trampa se instaló en la vecindad inmediata del nido y se accionó a 50 m de distancia dejando caer la puerta sostenida en la parte superior. Se capturaron y marcaron 45 adultos con anillos de celuloide de colores en combinaciones únicas en la región del tibiotarso para su reconocimiento individual. A cada adulto se le tomaron 13 medidas corporales: masa corporal (g), culmen largo, culmen ancho, ala, espuela carpal largo, espuela carpal ancho, largo total, rectrices centrales largo, frente, tarso-metatarso largo, tarso-metatarso ancho distal, tibio-tarso ancho distal y envergadura. Todas las mediciones fueron tomadas por LCB.

Para la masa corporal se empleó una balanza (Pesola) con $\pm 0,3$ precisión. Con un calibrador digital ($\pm 0,01$ mm) se midió el largo del culmen desde la base del pico hasta su extremo distal, el ancho del culmen se tomó como la distancia horizontal antes las comisuras en la base del pico, la frente se midió desde la base del pico hasta el borde opuesto donde termina el plumaje negro de la frente (cf. Fig. 1). El largo del tarso-metatarso se midió como la distancia entre la articu-

lación intertarsal y la articulación con las falanges. El ancho distal del tarso metatarso se tomó como el grosor del hueso antes de su cóndilo distal. El ancho distal de tibio-tarso se tomó como el diámetro antes del cóndilo que articula con el tarso metatarso. El largo de la espuela se midió desde la base hasta el extremo distal y su ancho como la mayor distancia en la base de la misma (Fig. 1).

Con una regla metálica (± 1 mm) se midió el ala desde la muñeca hasta el extremo de la primaria más larga, sin presionarla contra la regla. Para las rectrices se colocó una regla entre las dos plumas centrales y se midió la distancia desde la base hasta el extremo distal de las plumas más largas. El largo total fue medido con el individuo en reposo en posición ventral desde la cabeza hasta el extremo de sus rectrices. La envergadura fue medida con una cinta métrica metálica (± 1 mm) en la parte dorsal del individuo cuando este estuvo en posición ventral y con sus alas extendidas, se tomó la distancia comprendida entre las primarias más largas de cada una de las alas.

Para todas las variables se evaluó la normalidad (Prueba K-S) y homeogeneidad de varianzas (Prueba de Levene), obteniéndose significancias inferiores a valores de $P = 0,05$, asegurando así el cumplimiento de estos supuestos. El análisis de la función discriminante se realizó excluyendo una a una las variables morfométricas para obtener la combinación de variables óptima en la determinación del sexo. Se estimaron subconjuntos múltiples de muestras para validar la función discriminante, específicamente, se utilizó el método U, a través del cual se clasifica cada caso del análisis mediante la función derivada de todos los casos, excepto el propio caso; ajustando la función discriminante con muestras tomadas repetidamente de la muestra original, debido al tamaño de muestra pequeño en esta investigación (Hair *et al.* 1970). Se evaluó el nivel de significancia estadística de la



FIG. 1. Medidas morfométricas en adultos del Pellar Común de la Reserva Natural El Hatico y campus de la Universidad del Valle, Departamento Valle del Cauca, suroccidente de Colombia.

función discriminante, utilizando los criterios estadísticos Lambda de Wilks, un método para la selección de variables por pasos del análisis discriminante, que selecciona las variables para su introducción en la ecuación basándose en cuánto contribuyen a disminuir la Lambda de Wilks (Sokal & Rohlf 1995). Se introdujo en cada paso la variable que minimizaba la Lambda de Wilks global y la traza de Lawley-Hotelling o V de Rao, para determinar la medida de las diferencias entre las medias de los grupos; obteniéndose significancias inferiores a valores de $P = 0,05$; validándose tanto las funciones discriminantes como las pruebas de hipótesis respectivas. Se empleó SPSS Inc., v. 14 para la realización de los cálculos y pruebas estadísticas (Kirkpatrick & Feeny 2007).

La determinación de sexo por métodos moleculares se hizo con una muestra sanguínea de 100 μ l de la vena humeral de todos los adultos capturados. La muestra se mezcló con anticoagulante EDTA (ácido etilendiamín tetra-acético) y se almacenó a -20°C .

Todas las pruebas iniciales, se realizaron con muestras sanguíneas de gallinas (*Gallus gallus*) y los primeros individuos de pellers a los cuales se les determinó el sexo fueron individuos marcados que pudieron ser observados durante la cópula (cuatro hembras y tres machos). Aquel individuo que se ubicó encima de otro, fue clasificado como macho y quien permaneció en la parte inferior se clasificó como hembra. Se registró un total de 28 cópulas pertenecientes a cuatro parejas, una de las cuales tuvo un solo individuo marcado.

Para la extracción de ADN a partir de sangre líquida se evaluaron los métodos “Salting out” (Gustincich *et al.* 1989), “Salting out (Gustincich *et al.* 1989) modificado”, “Madisen (Wiley 2001) modificado”, “DNAzol” (Invitrogen), “Chelex 100” (Willard *et al.* 1998), “Tarjetas FTA” (Invitrogen), con el objetivo de explorar cuál de ellos brindaba la mayor concentración y calidad de ADN a menor costo. El método de extracción “Salting out (Gustincich *et al.* 1989) modificado”, fue seleccionado para procesar la mayoría de las muestras (líquidas), y consiste en una etapa de lisis celular con cloruro de amonio (NH₄Cl 155 Mm; NaHCO₃ 10 Mm; EDTA 0,1Mm, pH 7,4) a 37°C por 5 min, centrifugación a 14,000 rpm por 30 s y eliminación del sobrenadante. Este proceso se repitió en dos ocasiones. Luego, se adicionó una solución salina al 0,85% a 37°C, se centrifugó a 14,000 rpm por 30 s y se descartó el sobrenadante. Este segundo procedimiento se realizó dos veces. Se adicionó High TE (Tris HCl 100Mm, pH 8,0; EDTA 40mM, pH 8,0), Buffer de lisis Madisen (Tris HCl 0,1 M, pH 8,0; EDTA 0,5, pH 8,0; NaCl 1M) a 56°C y proteínaasa K (20mg/ml), y se dejó actuar durante una noche. Para la precipitación de ácidos nucleicos se adicionó NaCl 5M, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 s y al sobrenadante se le agregó isopropanol absoluto a -10°C. El ADN fue separado del sobrenadante y transferido a otro tubo que contenía Low TE (Tris HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1M, pH 8,0) a 37°C durante una noche.

El ADN obtenido con los métodos de extracción para sangre líquida líquida fue cuantificado por comparación directa con ADN de concentración conocida. Se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) a concentraciones de 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 ng/μl; mientras que, el lisado celular obtenido de muestras coaguladas con la resina Chelex (Willard *et al.* 1998) se probó a diferentes diluciones en agua milliQ (sin diluir, diluido 1:50,

1:100, 1:150 y 1:200) y se aplicó a la PCR por cada dilución los siguientes volúmenes: 0,3, 0,5, 1, 2, 5 y 10 μl.

Se adoptaron los iniciadores 2550F–2718R y 1237L–1272H descritos para otras especies de aves (Kahn *et al.* 1998, Fridolfsson & Ellegren 1999) y se escogió la primera pareja de iniciadores que mostraron una mayor diferencia de tamaño entre los fragmentos de ADN obtenidos (600 a 450 pb vs. 210 a 285 pb). El tamaño de los diferentes fragmentos se determinó utilizando un equipo de análisis y documentación de geles UVISave versión 11 (UVITec Limited, BL WA, Inglaterra). Las reacciones de PCR se realizaron con base en lo descrito por Fridolfsson & Ellegren (1999), con un volumen total por individuo de 15 μl y con reactivos de marca Invitrogen. Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida a 8% y coloreados con nitrato de plata (Santos *et al.* 1993). Se prefirió policrilamida en vez de agarosa, debido a que este último utiliza además bromuro de etidio, el cual es altamente mutagénico. Individuos con dos bandas fueron registrados como hembras y con una banda como machos.

RESULTADOS

En la Reserva Natural El Hatico y el campus de la Universidad del Valle se capturaron 45 adultos reproductivamente activos, 21 machos y 24 hembras. Los machos fueron más grandes que las hembras en la mayoría de sus medidas corporales con una confiabilidad entre el 93,8% y el 99,9% (Tabla 1). El análisis de la función discriminante permitió seleccionar ocho de las 13 variables morfométricas como el conjunto que mejor determinó el sexo en los pellers. Las variables masa corporal y envergadura representaron 72,1% del modelo propuesto. Se obtuvo la siguiente ecuación $Y = 0,2 \text{ masa corporal} + 0,56 \text{ espuela carpal largo} + 0,604 \text{ espuela carpal}$

TABLA 1. Masa corporal (g) y medidas morfométricas (mm) (media \pm DE) tomadas en pellers adultos y seleccionadas por el análisis discriminante en la Reserva Natural El Hatico y campus de la Universidad del Valle, Departamento Valle del Cauca, suroccidente de Colombia.

Medidas	Sexo		F	P
	Machos (n = 21)	Hembras (n = 21)		
Masas corporal	276,9 \pm 15,2	262,2 \pm 23,1	5,955	0,019
Espuela carpal largo	11,84 \pm 2,36	9,79 \pm 1,54	11,034	0,002
Espuela carpal ancho	5,36 \pm 0,63	4,66 \pm 0,64	12,562	0,001
Tarso-metatarso ancho distal	6,19 \pm 0,34	5,89 \pm 0,53	4,725	0,036
Ala	242 \pm 7	239 \pm 5	2,679	0,110
Rectrices	101,88 \pm 4,34	100,43 \pm 4,45	1,133	0,294
Largo total	320 \pm 11	316 \pm 12	1,432	0,239
Envergadura	798 \pm 14	787 \pm 18	3,687	0,062

ancho + 0,403 tarso-metatarso ancho distal + 0,4 ala - 0,162 rectrices - 0,401 largo total - 0,211 envergadura. Si $Y < 0$ el ave se clasifica como hembra; si $Y > 0$ el ave es considerada como macho (Fig. 2).

La ecuación obtenida con la función discriminante permitió clasificar por sexo los individuos adultos del Pellar Común con una exactitud del 83,3% (81,0% para machos y 85,7% para hembras). Para el análisis discriminante se eliminaron tres individuos que presentaron medidas incompletas en alguno de los caracteres morfométricos. Con este método siete (cinco machos, dos hembras) individuos fueron clasificados erróneamente. Los machos tenían una espuela carpal más corta que el promedio de las hembras. Algunos de ellos también reportaron mediciones cortas del ancho de la espuela, tarso-metatarso y rectrices. Las dos hembras tenían el largo y ancho de la espuela carpal y el ancho distal del tarso-metatarso mayores a al promedio.

Se determinó el sexo con métodos moleculares en la totalidad de los adultos capturados. Los fragmentos amplificados del intrón del gen CHD1 estaban dentro del rango de valores reportados en la literatura (CHD1Z = 600–650 pb y CHD1W = 400–450 pb;

Ellegren 1996, Fridolfsson y Ellegren 1999) (Fig. 3), y concordaban con la determinación del sexo por observación de la cópula y por análisis molecular del ADN.

La obtención de ADN, en muestras sanguíneas coaguladas, fue mejor con la resina “Chelex 100” (Willard *et al.* 1998), ésta permite obtener amplificaciones de buena calidad en todas las muestras, el método “DNAzol” (Invitrogen) permitió obtener ADN en 21% de las muestras estudiadas pero en bajas concentraciones y el método “Salting out (Gustincich *et al.* 1989) modificado” fue el menos efectivo para obtener ADN (Tabla 2). Las diluciones para la reacción de amplificación que mostraron bandas mejor definidas fueron: 1:100 y 1:150.

DISCUSIÓN

El método morfométrico aquí propuesto por primera vez para la determinación del sexo en esta especie, es importante pues es un método inocuo, rápido, económico y aplicable en campo. El método molecular de determinación del sexo es altamente sensible, pues requiere de pequeños volúmenes de muestra sanguínea para obtener el ADN necesario. Al igual que lo descrito para otras especies de

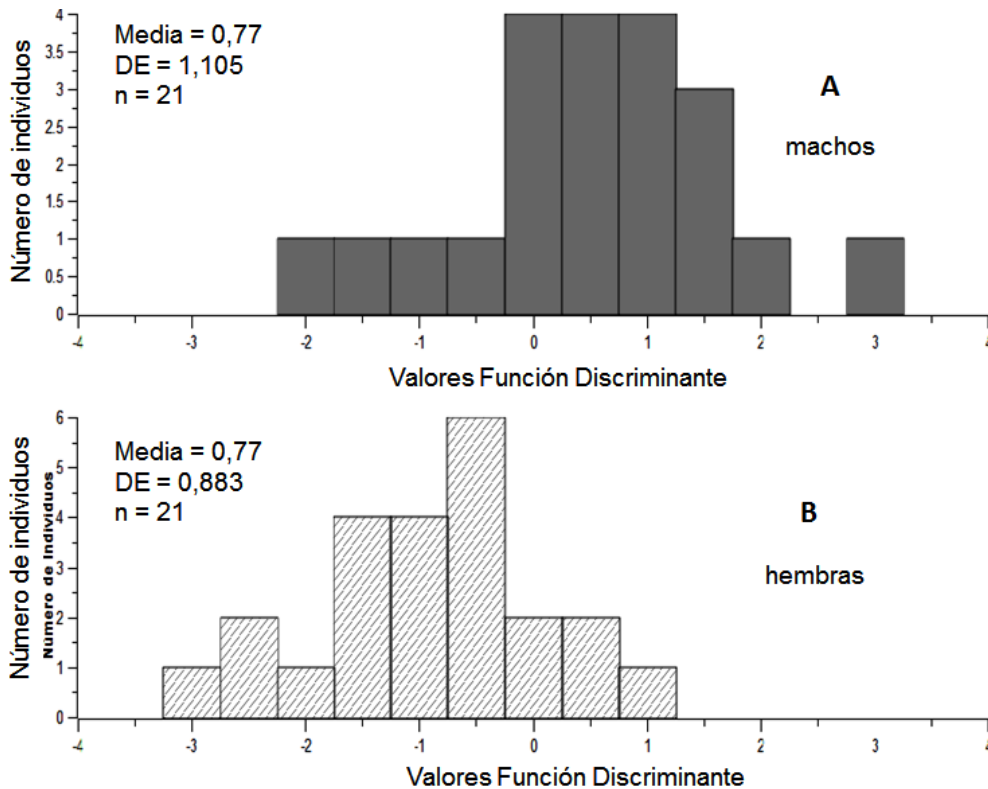


FIG. 2. A) Distribución de individuos machos (arriba) y B) hembras (abajo) del Pellar Común según el valor de la función discriminante para la determinación del sexo de la Reserva Natural El Hatico y campus de la Universidad del Valle, Departamento Valle del Cauca, suroccidente de Colombia.

aves (Stangel 1986, Colwell *et al.* 1988), en el Pellar Común este método no puso en riesgo la supervivencia de los individuos dado el escaso volumen de sangre extraída para tal fin. Otra ventaja de este método es la de ser viable con muestras de sangre coaguladas ya que durante el trabajo de campo con frecuencia no se tienen las condiciones óptimas de almacenamiento de reactivos, con la consecuente pérdida de actividad de algunos de ellos como enzimas y anticoagulantes (Sambrook *et al.* 1989). El conjunto de variables utilizadas para generar la función discriminante, afirma la importancia de tomar medidas corporales no convencionales según la especie de interés. Cuando se utilizó el con-

junto de medidas tradicionales: masa corporal, culmen largo, tarso-metatarso, ala y rectrices para el análisis, la determinación del sexo de los individuos se efectuó con una exactitud del 63,3%; mientras que cuando se incluyeron las otras variables, como espuela carpal largo y ancho, tarso-metatarso ancho distal, largo total y envergadura, para encontrar la mejor combinación, la exactitud incrementó un 83,3%. Esto nos lleva a sugerir la posibilidad de incluir un mayor número de mediciones corporales en estudios morfométricos, dependiendo de las características propias de la especie, ya que la precisión de la función discriminante puede aumentar notablemente, como en este caso en un 20%. Esos caracteres

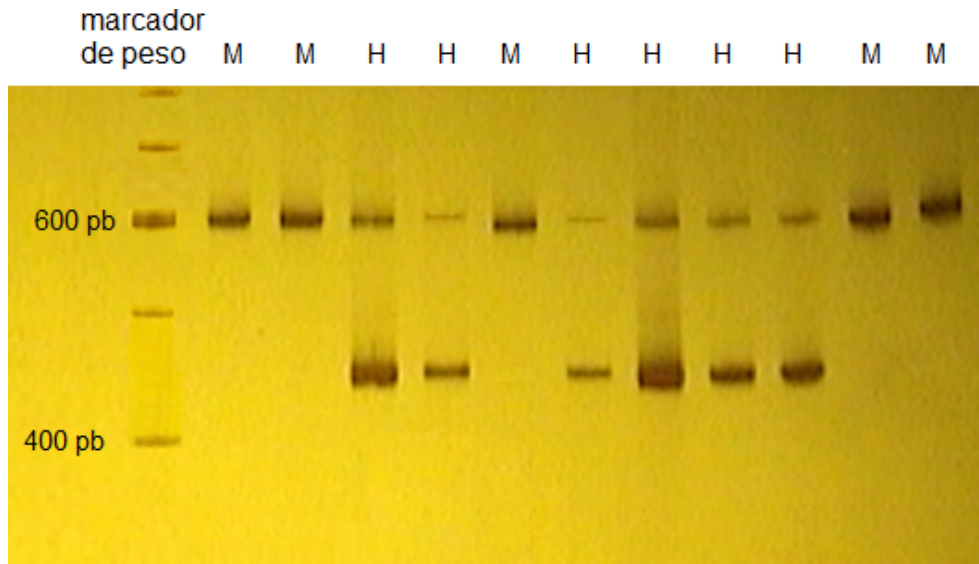


FIG. 3. Gel de poliacrilamida a 8% coloreado con nitrato de plata que muestra productos de la amplificación del intrón comprendido entre el nucleótido 2550 y 2718 del gen CHD1 del Pellar Común de la Reserva Natural El Hatco y campus de la Universidad del Valle, Departamento Valle del Cauca, suroccidente de Colombia. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular de 100 pb; H = hembras con dos bandas CHD1Z y CHD1W (600 y 450 pb respectivamente) y M = machos con una banda CHD1Z (600 pb).

incluidos en la medición podrían estar involucrados en la transmisión de información entre individuos y contener parte importante de la variación para explicar el fenómeno. Diferentes autores, han utilizado el ancho y largo de la cabeza y pico (Mawhinney & Diamond 1999), distancia desde el extremo distal del pico hasta el orificio nasal, largo del pie: distancia desde el extremo distal del tarso-metatarso hasta la base de la uña de la falange central, largo de la falange central, (Bosch 1996), antebrazo (Ferrer & De Le Court 1992), ancho del tarso (Shepard *et al.* 2004) y grosor de pico (Zavalaga & Paredes 1997) en la determinación sexual de diferentes especies utilizando análisis de función discriminante. El tamaño de la muestra es otro aspecto a considerar en estudios de análisis de función discriminante ya que usualmente se requiere un moderado o alto tamaño para permitir una

confiable determinación del sexo de la mayoría de individuos en una población. Este aspecto puede ser superado empleando técnicas como la determinación sexual genética que permite la correcta identificación de más del 99.9% de los individuos (Griffiths *et al.* 1998).

El Pellar Común presenta un moderado dimorfismo sexual por tamaño entre los individuos, donde los machos tienen un mayor tamaño corporal que las hembras. Las características morfológicas de mayor diferencia entre sexos son el largo y ancho de la espuela carpal, seguida de masa corporal, ancho del tarso-metatarso y envergadura. Las espuelas carpales que presentan los pellares son de color fucsia y siempre son expuestas durante los enfrentamientos ante otras parejas cuando defienden el territorio (del Hoyo *et al.* 1996). Igualmente la especie manifiesta vuelos de ataque directo a predadores potenciales que

TABLA 2. Protocolos evaluados para la extracción de ADN en individuos capturados del Pellar Común de la Reserva Natural El Hatico y campus de la Universidad del Valle, Departamento Valle del Cauca, suroccidente de Colombia. * Cuantificación por electroforesis en gel de agarosa a 1%, comparación entre ADN obtenidos y patrones de ADN de concentración conocida. NA= No aplica.

Protocolo	Volumen sangre utilizado (μ l)	Estado (líquida/coagulada)	[ADN] extraído *(ng/ μ l)	Tiempo (horas)	Costos	Amplificado	Referencia
DNAzol	100 y 5	líquida	2000–2500	0,5	alto	+	INVITROGEN, Cat No. 10503
Salting out	5	coagulada	10	0,5	alto	-	Gustincich <i>et al.</i> 1989
	50, 25, 5	líquida	2000–2500	24	bajo	-	Gustincich <i>et al.</i> 1990
Salting out modificado	50, 25, 5	líquida	2000–2500	24	bajo	+	Gustincich <i>et al.</i> 1991 modificado
Madisen	5	coagulada	0	24	medio	-	Wiley 2001
modificado	50, 25, 5	líquida	15	1	alto	+	Wiley 2001
Tarjeta FTA	3	líquida	NA	1	alto	+	INVITROGEN, Cat No. 10786-010
Chelx 100	3	coagulada	NA	1	bajo	+	Willard <i>et al.</i> 1998

ejecuta con las alas extendidas y sus espuelas completamente visibles (LCB observ. pers.). La presencia de características morfológicas como barbas y espuelas en varias especies de la subfamilia Vanellinae, son de mayor tamaño en los machos que en las hembras (del Hoyo *et al.* 1996), igualmente reportado en este estudio. Tener una mayor masa corporal, tamaño de su estructura ósea (tarso-metatarso) y envergadura, podría conferir mayor estabilidad a los machos en el caso que tuvieran contacto físico en interacciones agresivas intra e interespecíficas. Aunque ambos sexos participan en la defensa territorial, defensa del nido y polluelos, son los machos quienes efectúan con mayor frecuencia los despliegues defensivos (Cruz-Bernate en prep.). Lo anterior podría apoyar la propuesta de presiones selectivas que hayan favorecido individuos de mayor tamaño y con mayor participación en las conductas defensivas del territorio y de sus polluelos (Gill 2006).

Se propone que esta diferencia morfológica entre sexos sea el reflejo del mayor

desempeño en la tarea de defensa del territorio de anidamiento por parte del macho. Sería interesante evaluar a futuro si esa diferencia morfométrica sexual encontrada en *V. c. cayenensis* se mantiene en las subespecies *V. c. chilensis* (Molina, 1782), *V. chilensis lampronotus* (Wagler, 1827) y *V. chilensis fretensis* (Brodkorb, 1934) y evaluar el rango geográfico de aplicabilidad de la función discriminante reportada en este estudio al involucrar estas subespecies en la determinación del sexo. La ecuación de función discriminante encontrada en el suroccidente de Colombia para separar sexos en *V. c. cayenensis* debe ser examinada con precaución en otras poblaciones geográficas diferentes, debido a que la variación geográfica en tamaño corporal es común en poblaciones de muchas especies de aves (Symonds & Tattersall 2010, Conklin *et al.* 2011).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Humberto Álvarez López y Paola Olaya por su ayuda a mejorar una ver-

sión preliminar de este manuscrito. A Anna-Karin Fridolfsson y Hans Ellegren de la Universidad de Uppsala, Suecia, y a Thomas Quinn de la Universidad de Chicago, EEUU, por el envío de literatura y los iniciadores para la PCR. A la Universidad del Valle por su apoyo económico y logístico al proyecto de tesis de maestría de LCB. A la Universidad del Cauca por su apoyo al docente YR. A la familia Molina Durán, propietarios de la Reserva Natural El Hatico, donde se llevó a cabo el trabajo de campo. A los revisores por sus valiosas correcciones que ayudaron a mejorar el manuscrito.

REFERENCIAS

- Au, W., N. S. Fechner, & S. Soukup. 1975. Identification of the sex chromosomes in the Bald Eagle. *Can. J. Genet. Cyt.* 17: 187–191.
- Blanco, G., J. L. Tella, & I. Torre. 1996. Age and sex determination of monomorphic non-breeding choughs: a long term study. *J. Field Ornithol.* 67: 428–433.
- Bloom, S. E. 1969. A current list of chromosome numbers and variations for species of the avian subclass Carinatae. *J. Hered.* 60: 217–220.
- Bosch, M. 1996. Sexual size dimorphism and determination of sex in Yellow-legged Gulls. *J. Field Ornithol.* 67: 534–541.
- Colwell, M. A., C. L. Gratto, L. W. Oring, & A. J. Fivizzani. 1988. Effects of blood sampling on shorebirds: injuries, return rates, and clutch desertions. *Condor* 90: 942–945.
- Conklin, J. R., P. F. Battley, M. A. Potter, & D. R. Rothera. 2011. Geographic variation in morphology of Alaska-breeding Bar-tailed Godwits (*Limosa lapponica*) is not maintained on their nonbreeding grounds in New Zealand. *Auk* 128: 363–373.
- Costa, L. C. M., 2002. O comportamento interestespecífico de defesa de quero-quero, *Vanellus chilensis* (Molina, 1782) (Charadriiformes, Charadriidae). *Rev. Etol.* 4: 95–108.
- del Hoyo, J., A. Elliott, & J. Sargatal. 1996. Handbook of the birds of the world. Volume 3: Hoatzins to auks. Lynx Edicions, Barcelona, España.
- de Lucca, E. J. 1977. Determinação cromossômica do sexo nas aves. *Cienc. Cultura* 30: 791–798.
- Donald, P. F. 2007. Adult sex ratios in wild bird populations. *Ibis* 149: 671–692.
- Donohue, K. C., & A. M. Dufty, Jr. 2006. Sex determination of Red-tailed Hawks (*Buteo jamaicensis calurus*) using DNA analysis and morphometrics. *J. Field Ornithol.* 77: 74–79.
- Ellegren, H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 263: 1635–1641.
- Ellegren, H. 2000. Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Ecol. Evol.* 15: 188–192.
- Espinal, L. S. 1967. Apuntes sobre ecología Colombiana. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Ferrer, M., & C. De Le Court. 1992. Sex identification in the Spanish Imperial Eagle. *J. Field Ornithol.* 63: 359–364.
- Fridolfsson, A., & H. Ellegren. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.* 30: 116–121.
- Frey, S. J. K., C. C. Rimmer, K. P. McFarland, & S. Menu. 2008. Identification and sex determination of Bicknell's Thrushes using morphometric data. *J. Field Ornithol.* 79: 408–420.
- Giannoni, M. L., F. Foresti, C. Falcone, & P. A. Tosta. 1993. An inexpensive method for chromosome preparations from feather pulp in birds, using short term treatment with colchicine in vitro, demonstrated on *Amazona amazonica* (Psittacidae). *Rev. Bras. Genet.* 16: 477–483.
- Gill, F. B. 2006. Ornithology. 3th ed. W. F. Freeman and Co., New York, New York, USA.
- González-Solis, J., J. P. Croxall, & V. Afanasyev. 2007. Offshore spatial segregation in giant petrels *Macronectes* spp.: differences between species, sexes and seasons. *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 17: S22–S36.
- Gray, C. M., & K. C. Hamer. 2001. Food provisioning behaviour of male and female Manx Shearwaters *Puffinus puffinus*. *Anim. Behav.* 62: 117–121.
- Greenwood, A. G. 1983. Avian sex determination by laparoscopy. *Vet. Rec.* 112: 105.
- Griffiths, R., B. Tiwari, & S. A. Becher. 1992. The

- identification of sex in the starling *Sturnus vulgaris* using a molecular DNA technique. *Mol. Ecol.* 1: 191–194.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, & R. J. G. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7: 1071–1075.
- Gunniss, M. A., & P. J. Weatherhead. 2002. Variation in nest defense in ducks: methodological and biological insights. *J. Avian Biol.* 33:191–198.
- Gustincich, S., P. Carminci, G. Del Sal, G. Mamfi-ollet, & C. Schneider. 1989. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotech.* 11: 25.
- Gutiérrez-Corcheró, F., M. V. Arruga, L. Sanz, C. García, M. A. Hernández, & F. Campos. 2002. Using FTA® cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. *Mol. Ecol.* 2: 75–77.
- Hammar, B. 1970. The karyotypes of thirty-one birds. *Hereditas* 65: 29–58.
- Hair, J., R. Anderson, R. Tatham, & W. Black. 1970. *Análisis multivariante*. 5th ed. Prentice Hall, Madrid, España.
- Herzog, A. 1990. Zytogenetische und andere Möglichkeiten der Geschlechtsbestimmung bei Vögeln. *Prakt. Tierarzt* 10: 39–41.
- Hughes, C. 1998. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. *Ecology* 79: 383–399.
- Jones, D. M., J. H. Samour, J. A. Knight, & J. M. Finch. 1984. Sex determination of monomorphic birds by fibre-optic endoscopy. *Vet. Rec.* 115: 596–598.
- Kahn, N. W., J. St. John, & T. W. Quinn. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method of sex identification in birds. *Auk* 115: 1074–1078.
- Kirkpatrick, L. A., & B. C. Feeney. 2007. *A simple guide to SPSS for windows for version 14.0*. 8th ed. Wadsworth Publ., Belmont, California, USA.
- Lessells, C. M., & A. C. Mateman. 1998. Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.* 7: 187–195.
- Lishman, G. S. 1985. The comparative breeding biology of Adelie and Chinstrap Penguins, *Pygoscelis adeliae* and *P. antarctica* at Signy Island, South Orkney Island. *Ibis* 127: 84–99.
- Longmire, J. L., M. Maltbie, R. W. Pavelka, L. M. Smith, S. M. Witte, O. A. Ryder, D. L. Ellsworth, & R. J. Baker. 1993. Gender identification in birds using microsatellite DNA fingerprint analysis. *Auk* 110: 378–381.
- Mawhinney, K., & T. Diamond. 1999. Sex determination of Great Black-backed Gulls using morphometric characters. *J. Field Ornithol.* 70: 206–210.
- Maruyama, P. K., A. F. Cunha, E. Tizo-Pedroso, & K. Del-Claro. 2010. Relation of group size and daily activity patterns to Southern Lapwing (*Vanellus chilensis*) behaviour. *J. Ethol.* 28: 339–344.
- Quinn, T. W., F. Cooke, & B. N. White. 1990. Molecular sexing of geese using a cloned Z chromosome. *Auk* 107: 199–202.
- Richner, H. 1989. Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and assessment of its effects on wild birds. *J. Field Ornithol.* 60: 137–142.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, New York, USA.
- Santos, F. R., J. T. Epplen, & S. D. J. Pena. 1993. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism. *Hum. Genet.* 90: 655–656.
- Sasaki, M., N. Takagi, & C. Nishida. 1984. Current profiles of avian cytogenetics, with notes on chromosomal diagnosis of sex in birds. *Nucleus* 27: 63–73.
- Saracura, V., R. H. Macedo, & D. Blomquist. 2008. Genetic parentage and variable social structure in breeding lapwings. *Condor* 110: 554–558.
- Shepard, J. M., C. P. Cattersall, & J. M. Hughes. 2004. Discrimination of sex in the White-bellied Sea-Eagle, *Haliaeetus leucogaster*, using genetic and morphometric techniques. *Emu* 104: 83–87.
- Symonds, M. R. E. & G. J. Tattersall. 2010. Geographical variation in bill size across bird species provides evidence for Allen's rule. *Am. Natur.* 176: 188–197.
- Sokal, R. R., & E. J. Rohlf. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and Co., New York, New York, USA.
- Stangel, P. W. 1986. Lack of effects from sampling

- blood from small birds. *Condor* 88: 244–245.
- Suthers, H. B. 1994. Sex determination by wing and tail measurements in the Song Sparrow and Field Sparrow. *N. Am. Bird-Bander* 19: 77–83.
- Wiley, J. 2001. *Current protocols in human genetics*. J. Wiley & Sons, Inc., New York, New York, USA.
- Willard, J. M., D. A. Lee, & M. M. Holland. 1998. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic sample using a chelating resin. Pp. 9–18 *in* Lincoln, P. J., & J. Thomson (eds). *Forensic DNA profiling protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.
- Wilson, R. R. 1999. Sex determination of the Acadian Flycatcher using discriminant analysis. *J. Field Ornithol.* 70: 514–519.
- Yamazaki, Y., A. Yamato, A. Yamada, & K. Nishiwaki. 1994. Sex determination of Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) using an original designed restraint. *Penguin Conserv.* 7: 7–11.
- Yan-ping, F., G. Yan-zhang, N. A. Affara, P. Xiu-li, Y. Jin-feng, Z. Rui-xia, M. Yusuf, O. Jeffer, & Z. Shu-jun. 2006. Analysis of the offspring sex ratio of chicken by using molecular sexing. *Agric. Sci. China* 5: 545–549.
- Zavalaga, C. B., & R. Paredes. 1997. Sex determination of adult Humboldt Penguins using morphometric characters. *J. Field Ornithol.* 68: 102–112.