

**Estandarización de las condiciones de PCR anidada del gen Receptor de la  
Melanocortina-1 (MC1R) en aves del género *Ramphocelus***

**Camila Marleny Silva Bernal**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar el título de  
Biólogo**

**Tutor**

**Fernando Rondón González**

**Biólogo, Ph.D**

**Co-director**

**Jose Gregorio moreno Patiño**

**Licenciado Biología, Msc**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencia Básicas**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2017**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo y amor que siempre me han brindado.

A esta gran universidad que me permitió nacer y crecer en ella.

Al profesor Fernando por su mentoría y acompañamiento constante.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo constante.

A mis amigos porque cada día y con cada paso construimos momentos y experiencias de vida.

## Tabla de contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Introducción</b> .....	11
<b>1. Objetivos</b> .....	15
<b>2. Competencias del pasante</b> .....	16
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	17
3.1 Fase de campo.....	17
3.1.1 Área de estudio.. .....	17
3.1.2 Toma y Almacenamiento de muestras. ....	18
3.2 Fase de laboratorio.....	18
3.2.1 Extracción de ADN.....	19
3.2.2 Amplificación del gen MC1R.....	19
3.2.3 Visualización de muestras de ADN y producto amplificado.. .....	19
3.3 Secuenciación .....	20
3.3.1 Análisis de las secuencias.. .....	20
<b>4. Resultados</b> .....	21
4.1 Identificación de las especies en campo. ....	21
4.2 Amplificación del gen MC1R.....	22
4.3 Separación y visualización de productos de PCR .....	25
4.4 Análisis de las secuencias .....	26
<b>5. Discusión</b> .....	28
<b>6. Conclusiones</b> .....	31
<b>7. Recomendaciones</b> .....	31
<b>Referencias</b> .....	33
<b>Apéndices</b> .....	36

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Individuos de la especie <i>Ramphocelus icteronotus</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Individuos de la especie <i>Ramphocelus dimidiatus</i> .....	22
<b>Figura 3.</b> Visualización de productos amplificados de la primera reacción de PCR del gen MC1R.....	25
<b>Figura 4.</b> Visualización de productos amplificados de la segunda reacción de PCR del gen MC1R. ....	26

### Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cebadores empleados en la reacción de amplificación del gen MC1R. ....	20
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de reactivos de PCR estandarizados en la amplificación del gen MC1R. ....	24
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de ciclado de la primera reacción de PCR. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de homología (%) entre secuencias del gen MC1R de <i>Ramphocelus dimidatus</i> y <i>R. icteronotus</i> comparadas con secuencias presentes en el Gen Bank. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Sitios polimórficos en 507pb del gen MC1R de <i>R. icteronotus</i> y <i>R. dimidiatus</i> . ....	28

## Apéndice

<b>Apéndice A.</b> Prueba cualitativa de concentración de ADN. ....	36
<b>Apéndice B.</b> Localidades de muestreo de los especímenes secuenciados.....	36

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTANDARIZACION DE LAS CONDICIONES DE PCR ANIDADA DEL GEN RECEPTOR DE LA MELANOCORTINA-1 (MC1R) EN AVES DEL GENERO *Ramphocelus*\*

**AUTOR:** CAMILA MARLENY SILVA BERNAL\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *RAMPHOCELUS*, ESTANDARIZACIÓN, MC1R, PCR ANIDADA, AGAROSA.

## DESCRIPCIÓN

La modificación de los ecosistemas andinos colombianos a causa de actividades antropogénicas, ha conllevado a la fragmentación y ruptura de barreras naturales. Estos fenómenos suelen ser causas directas del contacto secundario, el cual puede redundar en la coexistencia y posible hibridación entre especies filogenéticamente cercanas y geográficamente separadas. Dicho proceso ha sido reportado entre especies del género *Ramphocelus*, dejando individuos con coloraciones intermedias del plumaje entre las especies involucradas. Dado que la coloración del plumaje tiene un fuerte componente genético, y que se ha demostrado que el gen receptor de la melanocortina-1 (MC1R) se asocia con el polimorfismo del color del plumaje en una amplia gama de especies de aves, se podrían utilizar las variantes presentes en la secuencia de dicho gen como marcador molecular que ayude a denotar eventos de hibridación. Con base en lo anterior el objetivo de la presente pasantía de investigación fue estandarizar las condiciones de amplificación del gen MC1R mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada y visualización del producto amplificado, a partir de muestras de individuos de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*, las cuales coexisten en zonas simpátricas del departamento de Santander. Para esto se siguió el protocolo de PCR publicado por MacDougall-Shackleton et.al.,(2003) en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación de la Universidad Industrial de Santander (LGPC-UIS); se encontró que los productos de PCR pueden ser obtenidos a partir de 0,2U/μL de Maxima Hot Star Taq y los ciclos de PCR incluyen el anhelamiento de los cebadores a 53°C. Fueron secuenciadas dos muestras por especie y se obtuvo 507pb después de edición. Con base en las secuencias MC1R de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*, se identificaron dos sitios únicos por especie que posibilitan el uso de este gen como como marcador molecular de hibridación entre estas especies de Aves.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González, Ph.D.

**ABSTRACT**

**TITLE:** STANDARDIZATION OF NESTED PCR CONDITIONS OF THE MELANOCORTIN-1 RECEPTOR GENE (MC1R) IN BIRDS OF THE GENUS *Ramphocelus* \*

**AUTHOR:** CAMILA MARLENY SILVA BERNAL\*\*

**KEYWORDS:** *RAMPHOCELUS*, STANDARDIZATION, MC1R, NESTED PCR, AGAROSE.

**DESCRIPTION:**

The modification of Colombian Andean ecosystems due to anthropogenic activities has led to the fragmentation and rupture of natural barriers. These phenomena are often direct causes of secondary contact, which can lead to coexistence and possible hybridization between phylogenetically close and geographically separate species. This process has been reported among species of the genus *Ramphocelus*, leaving individuals with intermediate plumage colorations among the species involved. Since plumage coloration has a strong genetic component, and the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) has been shown to be associated with plumage color polymorphism in a wide range of bird species, it could be used The variants present in the sequence of said gene as molecular marker that helps to denote hybridization events. Based on the above, the objective of the present research internship was to standardize the amplification conditions of the MC1R gene through the use of Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) and visualization of the amplified product, from samples of individuals from *R. icteronotus* and *R. dimidiatus*, which coexist in sympatric zones of the department of Santander. For this, the PCR protocol published by MacDougall-Shackleton et al., (2003) was followed in the Laboratory of Genetics of Populations and Conservation of the Industrial University of Santander (LGPC-UIS); It was found that PCR products can be obtained from 0.2U/ $\mu$ L of Maxima Hot Star Taq and PCR cycles include primer annealing at 53°C. Two samples per species were sequenced and 507bp after editing. Based on the MC1R sequences of *R. icteronotus* and *R. dimidiatus*, two unique sites were identified per species that make possible the use of this gene as molecular marker of hybridization between these species of Birds.

---

\*Bachelor Thesis

\*\* Facultad de ciencias. Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González, Ph.D.

## Introducción

La ampliación de las diferentes formas de agricultura y ganadería permiten la modificación del hábitat, conllevando a la fragmentación de los ecosistemas naturales y a la ruptura de barreras naturales (Sibley, 1958; Fjeldså et al., 2005), permitiendo así, tanto el aislamiento de las poblaciones, como la expansión del rango de distribución de algunas especies (Balmford et al., 2003). Este detrimento se ve evidenciado en algunos ecosistemas andinos colombianos (Corrales, 2002), los cuales representaban barreras naturales para diferentes poblaciones de organismos, entre estos las aves (Sibley, 1958; Helbig, 2001).

En Aves del género *Ramphocelus*, se ha demostrado que la destrucción de los bosques andinos y el establecimiento de cultivos ilícitos (Bedoya, 2007; Bedolla & Murillo, 2012), han facilitado la creación de un hábitat ideal en el cual, a causa de la extensión del rango de distribución de una especie, posteriormente se ha generado contacto secundario entre especies alopátricas del género (Sibley, 1958; Bedolla & Murillo, 2012; Morales-Rozo et al., 2010). Como consecuencia de estos procesos, *Ramphocelus icteronotus* (Lafresnaye 1846) ha modificado su rango de distribución histórico desde el Chocó biogeográfico (Hilty & Brown, 1986) estableciendo, en los últimos años, poblaciones en zonas montañosas del Departamento de Santander (McMullan et al., 2011; Archila, 2014) y zonas de contacto secundario en el valle geográfico del Río Cauca y algunas áreas de la cordillera Occidental de Colombia (Sibley, 1958; Bedoya & Murillo, 2012; Morales-Rozo et al., 2010).

En estas zonas de contacto secundario se han realizado estudios dirigidos a la descripción de poblaciones aisladas e híbridas de *Ramphocelus flammigerus* y *R. icteronotus* (Sibley, 1958; Ocampo, 2008; González, 2009; Bedoya & Murillo, 2012), en donde se ha encontrado que las dos formas de *Ramphocelus* coexisten e hibridan, esto último se manifiesta en la coloración de las plumas de espalda y rabadilla en especímenes observados y capturados (Bedoya & Murillo, 2012), los cuales presentan tonalidades intermedias (naranja) respecto a las de sus parentales (rojo y amarillo) (Lafresnaye, 1853; Sibley, 1958; Olson & Violani, 1995).

Así mismo, hoy por hoy se avistan poblaciones de *R. icteronotus* coexistiendo simpátricamente con poblaciones de *R. dimidiatus* en algunas zonas del Departamento de Santander (McMullan et al., 2011; Carreño, 2013; obs pers) incrementando la probabilidad que entre estas especies se genere un proceso de hibridación, tal como es el caso de poblaciones presentes en Panamá, en donde se ha comprobado la existencia de dicho proceso (Olson & Violani, 1995).

Sumado a lo anterior, en un proyecto en el que participan miembros del Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación (LGPC-UIS) de la Universidad Industrial de Santander, se realizó un estudio de reflectancia UV en Aves del género *Ramphocelus*, evidenciando diferentes picos de absorbancia cuando se comparan *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*. Adicionalmente, se ha encontrado individuos que presentan ambos picos de absorbancia, lo que permite pensar que estos especímenes son, posiblemente, producto de un proceso de hibridación reciente entre las referidas especies (datos sin publicar).

La variación del color del plumaje en Aves tiene un fuerte componente genético (Mundy, 2005), el cual está relacionado con el gen receptor de Melanocortina-1 (MC1R) y se asocia con el melanismo en aves como ocurre en *Coereba flaveola*, *Anser c. caerulescens* y *Stercorarius parasiticus* (Theron et al., 2001; Mundy, 2005). Estudios en estas tres especies explican la evidencia de una relación entre genotipo-fenotipo específica para el locus MC1R (Theron et al., 2001; Mundy et al., 2004; Mundy, 2005), por lo cual este gen puede ser un buen candidato a ser utilizado en estudios genéticos de hibridación.

Por lo tanto, el uso del gen MC1R, puede ayudar a ampliar, aún más, el conocimiento que se tiene acerca de los individuos híbridos de las poblaciones presentes en la zona de contacto secundario entre *R. icteronotus* x *R. flammigerus*; y también evidenciar la existencia de un proceso de hibridación entre *R. icteronotus* x *R. dimidiatus* en las zonas donde estos coexistan.

Dado que la hibridación como proceso puede afectar la variabilidad genética de las especies involucradas y el fenómeno a largo plazo puede llevar al incremento de la diversidad genética de la especie “invasora” (*R. icteronotus*) (Carreño, 2013; Archila, 2014), en detrimento de las residentes y/o endémicas, se hace necesario poner en marcha estudios encaminados que ayuden a comprender dicho fenómeno.

Con base en lo expuesto anteriormente, la ejecución de la presente pasantía de investigación tuvo como objetivo, establecer las condiciones de PCR anidada y de visualización

de fragmentos del gen MC1R. Los resultados obtenidos podrán ser utilizados en la detección de mutaciones en dicho gen, en especies que eventualmente se encuentren hibridando, debido a que dichas mutaciones pueden quedar registradas en el genoma de los individuos producto del potencial proceso de hibridación. De suceder esto, se le puede dar también un uso a las secuencias del gen MC1R, como marcador molecular para estudiar la hibridación en Aves.

## 1. Objetivos

### Objetivo General

Establecer las condiciones óptimas de amplificación y visualización del gen MC1R en Aves de especies del género *Ramphocelus*.

- **Objetivos específicos**

Estandarizar el método de amplificación por PCR anidada del gen MC1R en muestras de especímenes de Aves del género *Ramphocelus*.

Estandarizar la técnica de electroforesis en geles de agarosa como método de visualización de los productos de PCR anidada del gen MC1R.

## 2. Competencias del pasante

Para cumplir con los objetivos planteados, la estudiante desarrolló las siguientes competencias:

- Identifica en campo los individuos de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*.
- Extrae ADN a partir de muestras sanguíneas de individuos de las especies consideradas en el estudio.
- Amplifica segmentos del gen MC1R los cuales puedan ser secuenciados.
- Utiliza métodos de separación de ADN dirigidos a identificar fragmentos amplificados por PCR.
- Redacta informes con contenido científico de una manera adecuada aportando al desarrollo del proyecto.

### 3. Materiales y métodos

La presente Pasantía de Investigación se enmarcó dentro del Macroproyecto de Investigación “Diversidad y estructura genética de poblaciones de dos especies de aves del género *Ramphocelus* presentes en el departamento de Santander, Colombia”, identificado con el código VIE-UIS 1351.

#### 3.1 Fase de campo

**3.1.1 Área de estudio.** La fase de campo del presente trabajo de grado se llevó a cabo en cuatro localidades diferentes ubicadas en el costado occidental de la cordillera Oriental de los Andes colombianos, en el Departamento de Santander: 1) Finca El Diviso, ubicada en la vereda La Colorada del municipio de San Vicente de Chucurí; 2) Finca Tierra Buena, ubicada en la vereda San Bernardo de la Cuchilla del municipio de Lebrija; 3) Fincas La Victoria y La Playita, ubicadas en la vereda Los Helechales del municipio de Floridablanca y 4) Finca Casa Blanca, ubicada en la vereda San Benito del municipio de Rionegro. Estas fueron seleccionadas luego de realizar registros previos, por medio de caminatas de observación, de *R. icteronotus* coexistiendo con *R. dimidiatus*.

Las cuatro localidades se encuentran fuera del rango de distribución histórico de *R. icteronotus* (Isler e Isler, 1999), se caracterizan por poseer pequeños remanentes de bosque y se destacan en ellas, principalmente, la presencia de cultivos de: cítricos, *Persea americana*, *Musa paradisiaca*, *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*; hábitat característico donde se han hecho

avistamientos de esta especie coexistiendo con *R. dimidiatus* (Carreño 2013; Archila 2014; obs per).

Finalmente, en cada localidad se colocaron ocho redes de niebla de 12 metros a lo largo del ecotono de los cultivos. La intensidad del muestreo en cada localidad fue el equivalente a 1152 horas red/localidad. Durante el desarrollo de la pasantía en total se capturaron ocho individuos, cinco de *Ramphocelus dimidatus* y tres de *R. icteronotus*.

**3.1.2 Toma y Almacenamiento de muestras.** A cada individuo capturado se le extrajo 50µl de sangre a partir de la vena braquial, utilizando jeringas de 1mm de aguja fina. La sangre fue almacenada en tubos de 1,5mL con etanol absoluto en frío (4°C), hasta su procesamiento en el laboratorio. También se conservó una gota de sangre en una tarjeta estéril. Cada muestra se rotuló con las dos letras iniciales del género y del epíteto específico, además del número de captura. Para evitar replica en el muestreo, cada individuo fue anillado en el tarso izquierdo antes de ser liberado. Adicionalmente, se cuenta en Laboratorio con 56 muestras previamente recolectadas de *R. dimidiatus* y 25 de *R. icteronotus*.

### 3.2 Fase de laboratorio

La extracción de ADN, la amplificación y la visualización de los productos de obtenidos a partir de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo en LGPC-UIS, adscrito a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

**3.2.1 Extracción de ADN.** La extracción de ADN se realizó a partir de muestras de sangre mediante el uso del kit DNeasy Blood & Tissue™ (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el fin de corroborar el éxito de la extracción y realizar la cuantificación con patrones conocidos (Thermo Scientific), el ADN fue visualizado en geles de agarosa al 1% teñidos y las muestras se corrieron con EZ-VISION® (Amresco), siguiendo modificaciones propias del LGPC-UIS.

**3.2.2 Amplificación del gen MC1R.** Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador AB 2720 (Applied Biosystems). Para la amplificación del gen MC1R se realizó una primera reacción de PCR a partir de los iniciadores 1329F y MSHR9 (Drovetski et al., 2009). Con el producto de PCR anterior, se hizo una segunda reacción de PCR a partir de los iniciadores MSH8 y MSHR9 (MacDougall-Shackleton et al., 2003). Dicha reacción de PCR anidada se efectuó, inicialmente, siguiendo las condiciones propuestas por MacDougall-Shackleton et al., (2003), con modificaciones propias del LGPC-UIS.

**3.2.3 Visualización de muestras de ADN y producto amplificado.** Para visualizar el ADN extraído y los productos amplificados de cada PCR se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. Los productos amplificados fueron cargados con Ez-Vision® (Amresco) en proporción 1,4:1 vol:vol y la comparación se realizó con marcador de peso molecular de 1Kb (Thermo Scientific).

**Tabla 1**

*Cebadores empleados en la reacción de amplificación del gen MC1R.*

Iniciador	Secuencia
MSHR9 <sup>A</sup>	R: 5'-CTGGCTCCGGAAGGCATAGAT-3'
MC1R 1329F <sup>A</sup>	F: 5'-CGCCATCCTGAAGAACAG-3'
MSHR9 <sup>B</sup>	R: 5'-CTGGCTCCGGAAGGCATAGAT-3'
MSH8 <sup>B</sup>	F: 5'-CCTCAAGAACAGGAATCTGCACTC-3'

En todos los casos F: forward; R: reverse. A. Primera reacción; B. Segunda reacción.

### 3.3 Secuenciación

Con el objetivo de verificar que los productos amplificados correspondan al gen MC1R, se llevó a cabo secuenciación de los mismos. En la secuenciación se seleccionaron aleatoriamente cuatro productos amplificados de PCR, dos por especie de *Ramphocelus*. Estos fueron purificados y secuenciados en SIGMOL (Colombia) a partir de los iniciadores propuestos por MacDougall-Shackleton et al., (2003).

**3.3.1 Análisis de las secuencias.** Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas con el programa Geneious v10.0.9 (Biomatters Ltd), a objeto de obtener secuencias consenso para así; mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), identificar si el segmento amplificado corresponde al gen MC1R de las especies de Aves reportadas en el GenBank.

## 4. Resultados

Los resultados se muestran con base a las competencias desarrolladas por la estudiante durante la pasantía.

### 4.1 Identificación de las especies en campo.

En las cuatro áreas de estudio se realizaron salidas de observación con binoculares con el fin de determinar la presencia de individuos de las especies de *Ramphocelus* en estudio. Durante la ejecución de este proyecto se capturaron un total de siete individuos correspondientes a seis *R. dimidiatus* y un *R. icteronotus*, en la vereda San Benito del municipio de Rionegro. Las demás muestras consideradas fueron tomadas en otras salidas de campo enmarcadas en el Macroproyecto VIE-UIS 1351.

El macho de *R. icteronotus* luce un plumaje de coloración predominantemente negra, rabadilla amarillo limón y pico perlado azul; la hembra luce tonalidades ocres entre amarillo y marrón (Figura 1) (Hilty & Brown, 1986).

Por otra parte, el macho de *R. dimidiatus* presenta coloración rojo escarlata con alas negras y pico plateado, mientras que la hembra posee tonos menos vistosos de rojo y el pico no presenta la misma coloración de los machos (figura 2) (Hilty & Brown, 1986; Olson & Violani, 1995). Además, los individuos juveniles en ambos sexos son similares a las hembras adultas (Moynihan, 1962).



**Figura 1** Individuos de la especie *Ramphocelus icteronotus*. A. Hembra. B. Macho.



**Figura 2** Individuos de la especie *Ramphocelus dimidiatus*. A. Macho. B. Hembra.

#### 4.2 Amplificación del gen MC1R

En el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación (LGPC-UIS), adscrito a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, se llevó a cabo la estandarización de amplificación del gen MC1R por reacción de PCR-anidada.

La estandarización de la reacción de PCR inicial se realizó a partir de los iniciadores 1329F y MSHR9 bajo las condiciones propuestas por MacDougall-Shackleton et al., (2003), luego de ejecutar diferentes experimentos, se determinó que la condición adecuada para un volumen final de 25  $\mu$ L por individuo es 40ng/ $\mu$ L de ADN, 1X de buffer, 2mM de  $MgCl_2$ , 200 $\mu$ M de dNTPs, 0,4 $\mu$ M de cada iniciador y 0,2U de ADN Polimerasa Taq Maxima Hot Start (Thermo Scientific) (Tabla 2). Estas mismas concentraciones de reactivos fueron utilizadas en la segunda reacción usando los iniciadores MSH8 y MSHR9, propuestos por MacDougall-Shackleton et al., (2003).

Todas las reacciones de amplificación de la PCR inicial se desarrollaron con las siguientes condiciones de ciclado: denaturación a 94°C por 2min, seguido por 40 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 53°C y 150s a 72°C y una extensión final a 72°C por 7min (Tabla 3).

Dado que el producto de PCR de la primera reacción no evidencia una única banda amplificada, sino varios productos inespecíficos (Figura 3), es necesario realizar otra reacción teniendo como molde este producto. El protocolo de ciclado de la segunda PCR consistió en: denaturación a 94°C por 3min, seguido por 35 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 55°C y 75s a 72°C y una extensión final a 72°C por 7min. Este permitirá obtener un único producto de PCR, correspondiente a 507pb

**Tabla 2***Concentraciones de reactivos de PCR estandarizados en la amplificación del gen MC1R.*

Reactivos	MacDougall-Shackleton et al. (2003)	Drovetski et al. (2009)	LGPC-UIS
Buffer	1x		1x
MgCl <sub>2</sub>	2mM		2mM
dNTPs	200μM		200μM
1329F	0,4μM	No reporta	0,4μM
MSRH9	0,4μM		0,4μM
Taq Platinum	2,5U/μl		0,2U/μl *
ADN	100ng/μL		40ng/μL

\*En el LGPC-UIS se utilizó Máxima Hot Start Taq ADN Polimerasa (Thermo Scientific)

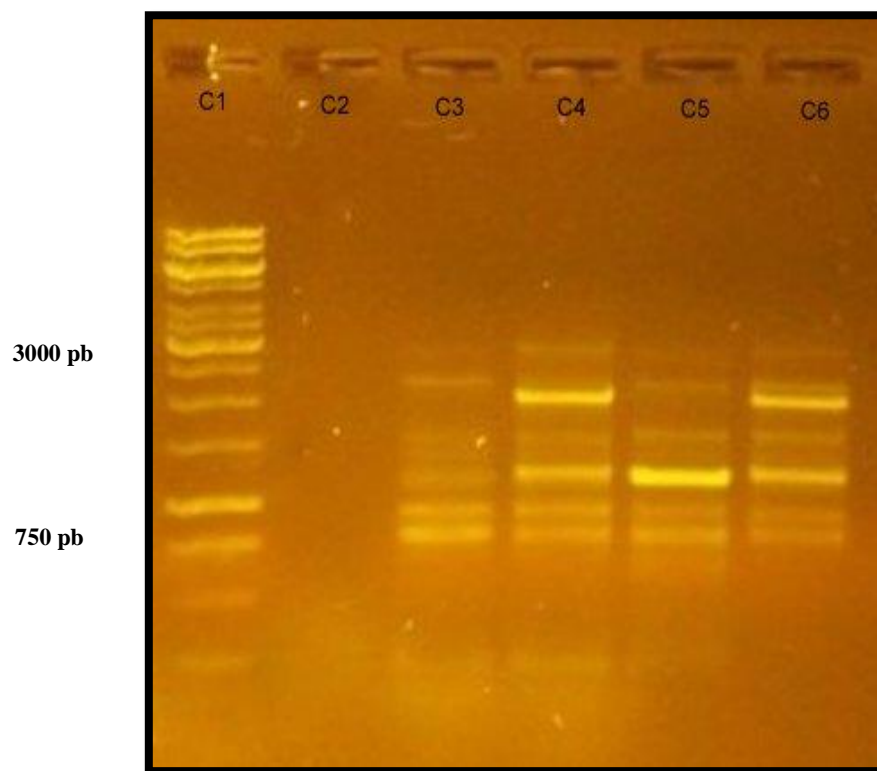
**Tabla 3***Condiciones de ciclado de la primera reacción de PCR.*

Fase	Drovetski et al. (2009)		LGPC-UIS	
Denaturación	94°C 120s		94°C 180s	
	94°C 45s		94°C 45s	
Alineamiento	40 ciclos	50°C 45s	40 ciclos	53°C 45s
		72°C 150s		72°C 150s
Extensión final	72°C 420s		72°C 150s	

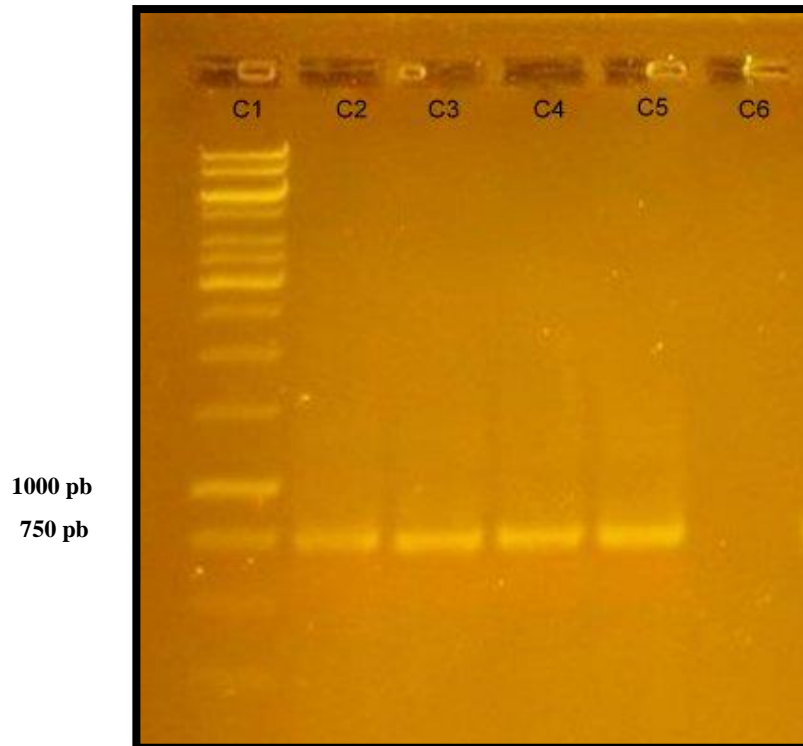
\*En el LGPC-UIS se aumentó la temperatura de anillamiento.

### 4.3 Separación y visualización de productos de PCR

La separación de los productos de PCR obtenidos en las dos reacciones se realizó en geles de agarosa al 1% con las siguientes condiciones: precorrida a 45v por 15min, seguida de la corrida a 90v por 85min. La separación de los fragmentos requirió de 5,0 $\mu$ l del producto amplificado mezclado con 3,5 $\mu$ l de EZ-vision® (Amresco) (Figura 3 y 4)



**Figura 3** Visualización de productos amplificados de la primera reacción de PCR del gen MC1R. C1: Marcador de Peso Molecular 1000pb; C2: Control negativo; C3 y C4: muestras de *R. icteronotus*; C5 y C6: muestras de *R. dimidiatus*.



**Figura 4** Visualización de productos amplificados de la segunda reacción de PCR del gen MC1R. C1: Marcador de Peso Molecular 1000pb; C2 y C3: muestras de *R. icteronotus*; C4 y C5: muestras de *R. dimidiatus*; C6: Control negativo.

#### 4.4 Análisis de las secuencias

Un total de cuatro productos de PCR, dos por especie de *Ramphocelus*, fueron secuenciados. Al realizar el correspondiente análisis de BLAST se encontró las secuencias corresponden al gen MC1R en Aves, resultado soportado por el 99,4% de homología con respecto a la secuencia de este gen en *Tangara cucullata* y 99,3% de homología con respecto a la secuencia de este gen presente en el haplotipo Y1 de *Coereba flaveola* (Tabla 4).

**Tabla 4**

Porcentaje de homología (%) entre secuencias del gen MC1R de *Ramphocelus dimidatus* y *R. icteronotus* comparadas con secuencias presentes en el Gen Bank.

Muestras	AF362606 <sup>1</sup>	AF362575 <sup>2</sup>
Ri1	99,4%	99,3%
Ri2	99,2%	99,1%
Rd1	99,4	99,2%
Rd2	99,4%	99,2%

<sup>1</sup> *Tangara cucullata*; <sup>2</sup> *Coereba flaveola* haplotipo Y1; Ri: *Ramphocelus icteronotus*; Rd: *Ramphocelus dimidiatus*.

Las secuencias obtenidas fueron de 507 nucleótidos de extensión, desde la posición 277 hasta los 886 del gen. De los 962pb que contiene el gen MC1R de Aves (Theron et al., 2001), estas secuencias equivalen al 52,7% del mismo. Un análisis comparativo de las 507pb, permitió diferenciar ocho sitios polimórficos en *R. dimidatus* y siete en *R. icteronotus*, cuando las secuencias se alinearon con respecto a la secuencia de referencia AF362606 de *Tangara cucullata* (Theron et al., 2001). De los sitios polimórficos detectados, tres se encuentran exclusivamente en *R. dimidiatus* y dos en *R. icteronotus* (Tabla 5).

Con base en el fragmento secuenciado en cada especie y la comparación de estos respecto a la secuencia AF362606, se logran diferenciar dos haplotipos en cada especie de *Ramphocelus* considerada. En *R. icteronotus*, el haplotipo Ri1 se caracteriza por G379T, C408T, C552T, C690T, C693T y C711G; el haplotipo Ri2 se caracteriza por G379T, C408T, C552T, T639C, C690T y C711G. Asimismo en *R. dimidiatus* el haplotipo Rd1 se caracteriza por G379T, C408T, T495C,

A521G, C552T, C690T y T711G y el haplotipo Rd2 por G379T, C408T, T495C, A521G, C552T, C690T y C711G (Tabla 5)

**Tabla 5**

Sitios polimórficos en 507pb del gen MC1R de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*.

HAPLOTIPO	Posición en el gen MC1R										
	277	379	408	495	521	552	639	690	693	711	886
<b>AF362606<sup>1</sup></b>	A	T	T	C	G	T	C	T	T	G	G
<b>Ri1</b>	.	G	C	.	.	C	.	C	<b>C</b>	<b>C</b>	.
<b>Ri2</b>	.	G	C	.	.	C	<b>T</b>	C	.	C	.
<b>Rd1</b>	.	G	C	<b>T</b>	<b>A</b>	C	.	C	.	<b>T</b>	.
<b>Rd2</b>	.	G	C	<b>T</b>	<b>A</b>	C	.	C	.	C	.

<sup>1</sup> Secuencia de referencia del gen MC1R de *Tangara cucullata* reportada en el GenBank; Ri: *Ramphocelus icteronotus*; Rd: *Ramphocelus dimidiatus*. Se resalta en negrilla los sitios polimórficos detectados de manera exclusiva en las especies de *Ramphocelus* de estudio.

## 5. Discusión

Durante el proceso de estandarización de la PCR anidada, se encontró que la principal diferencia entre las concentraciones de los reactivos con referente a lo reportado por MacDougall-Shackleton et al., (2003), reside en la concentración de la Taq (Tabla 2), esto se puede deber a que en la presente pasantía se utilizó Taq Máxima Hot Start (Thermo Scientific) para realizar la reacción de PCR, la cual presenta características homologas a la Taq platinum reportada por los autores, donde la principal diferencia que presentan las enzimas está en la inactividad a

temperatura ambiente de la Taq Maxima Hot Start evitando la extensión de los cebadores proporcionando una especificidad más alta en la amplificación del ADN (Thermo Scientific).

En la estandarización de los ciclos, en la primera reacción de PCR se incrementó la temperatura de anelamiento ( $T_m$ ) 3°C respecto a lo reportado por Drovetski et al., (2009). Este incremento del  $T_m$  afectó positivamente la calidad de la banda visualizada en la segunda reacción de PCR, lográndose observar de forma definida (Figura 5); según Rychlik et al., (1990) el incremento de  $T_m$  aumenta la especificidad de los iniciadores evitando que sean amplificados productos inespecíficos, como se observó después de la primera reacción de PCR en todas las muestras (Figura 4).

Por otro lado, el porcentaje de productos amplificados en *R. icteronotus* fue del 94% y de *R. dimidiatus* del 100%, esta diferencia se puede deber a la concentración del ADN ya que esta es variable (Anexo 1), y depende del volumen de sangre colectado en campo y, por tanto, del volumen de sangre utilizado al momento de realizar la extracción.

Al comparar las secuencias obtenidas en *R. icteronotus* encontramos la existencia de los haplotipos Ri1 y Ri2 los cuales además de diferenciarse, en los sitios T639C y C693T, se encuentran presentes en Aves muestreadas en diferentes localidades (Anexo 2). Por su parte, los haplotipos Rd1 y Rd2 en *R. dimidiatus* se diferencian por una transición en el nucleótido 711 del gen MC1R (Tabla 5) y también fueron detectados en localidades de muestreo diferentes. Estos resultados permiten pensar la posible existencia de haplotipos únicos por localidad.

Asimismo, se evidencia la diferencia de las bases presentes en las posiciones 495 y 521 del gen MC1R; en *R. dimidiatus*, las bases en su orden corresponden a T y A, mientras que en *R. icteronotus* corresponden a C y G. Dado que en los dos haplotipos por especie se encuentra la misma base nitrogenada (Tabla 5), esto permitiría inferir que estos sitios son únicos por especie; de ser así al haber un proceso de hibridación entre estas especies, es posible que en los individuos híbridos se detecten los nucleótidos característicos de las especies parentales.

Diferentes estudios han mostrado que el gen MC1R, está implicado en la variación de la pigmentación intraespecífica en una amplia gama de especies de mamíferos y reptiles (Cheviron et al., 2006); en aves se han encontrado mutaciones específicas dentro de la región codificante de este gen, asociadas con el color del plumaje en *Gallus gallus* (Takeuchi et al., 1996; Davila et al., 2014), *Sula sula* (Baiao et al., 2007), *Anser c. caerulescens* y *Stercorarius parasiticus* (Mundy et al., 2004), *Monarcha castaneiventris megarhynchus* (Uy et al., 2009) y *Coereba flaveola* (Theron et al., 2001). Varios de estos estudios sugieren que la variación del gen MC1R, puede ser la base de polimorfismos en plumaje de muchos taxones de aves. Sin embargo, en todas las aves no se encuentra una relación entre la variación de la secuencia MC1R y la variación del plumaje entre las especies, como es el caso del género *Phylloscopus* (MacDougall-Shackleton et al., 2003).  $\mu\text{L}$

En el caso del género *Ramphocelus* no se han realizado estudios sobre la variación entre el gen MC1R y la coloración del plumaje; es por esto que, según los resultados obtenidos en el presente,

se posibilita el uso de secuencias de este gen como marcador molecular de utilidad en estudios de hibridación de especies de Aves.

## 6. Conclusiones

Se estandarizó las condiciones de reacción de PCR anidada del gen MC1R en muestras de *Ramphocelus icteoronotus* y *R. dimidiatus*. A partir de los productos de PCR obtenidos se secuenció un fragmento del gen MC1R, en el que se identificaron sitios polimórficos que permiten identificar diferentes haplotipos en las especies consideradas.

A partir de las secuencias de *R. icteoronotus* y *R. dimidiatus* obtenidas, se identificaron dos sitios únicos por especie que posibilitan el uso de secuencias del gen MC1R como marcador molecular de hibridación entre estas especies de Aves.

## 7. Recomendaciones

Para la obtención de la secuencia completa del gen MC1R, es importante diseñar iniciadores que se encuentren por fuera del marco de lectura abierto y codón final; de esta manera se puede explorar y realizar análisis más detallados del mismo.

Se recomienda realizar un estudio que involucre tamaños de muestras más grandes e individuos de los que se tenga certeza son híbridos, para determinar que el gen MC1R puede ser usado como marcador molecular de hibridación en especies del género *Ramphocelus*.

## Referencias

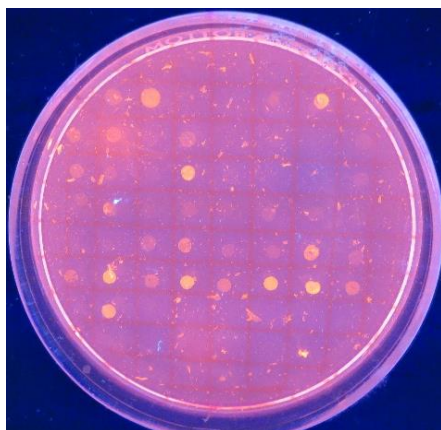
- Archila, J.E. (2014). Estudio de la Diversidad Genética de *Ramphocelus icteronotus* (Aves: Thraupidae) presente en el Departamento de Santander, implementando cebadores diseñados para el análisis de la Región control del ADN Mitocondrial Tesis de pregrado: Universidad Industrial de Santander.
- Baiao, P.C., Schreiber, E., Parker, P.G. (2007). The Genetic Basis of the Plumage Polymorphism in Red-Footed Boobies (*Sula sula*): a Melanocortin-1 Receptor (MC1R) Analysis. *Journal of Heredity*, 98(4), pp.287–292.
- Balmford, A., Green, R.E., Jenkins, M. (2003). Measuring the changing state of nature. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(7), pp.326–330.
- Bedoya, M.J. (2007). Comparación morfológica y ecológica de las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Aves: Emberizidae: Thraupinae) en el Valle del Cauca. Tesis de pregrado: Universidad del Valle.
- Bedoya, M.J., Murillo, O.E., (2012). Evidencia morfológica de hibridación entre las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Passeriformes: Thraupidae) en Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 60 pp.75–85.
- Carreño, M. (2013). Evaluación de la diversidad genética en poblaciones de *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* (Thraupidae) co-existentes en dos localidades del Departamento de Santander empleando secuencias del gen Citocromo b. Tesis de grado: Universidad Industrial de Santander.
- Cheviron, Z., Hackett, S.J., Brumfield, R.T. (2006). Sequence variation in the coding region of the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) is not associated with plumage variation in the blue-crowned manakin (*Lepidothrix coronata*). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273(1594), pp.1613–1618.
- Corrales E. (2002). Transformaciones socioeconómicas y situación de la biodiversidad de los Andes colombianos, desde el periodo prehispánico. *Cuad Desarro Rural*.;49:85-164.
- Dávila, S.G., Gil, M.G., Resino-Talaván, P., Campo, J.L. (2014). Association between polymorphisms in the melanocortin 1 receptor gene and E locus plumage color phenotype. *Poultry Science* 93: 1089-1096.
- Drovetski, S.V., Zink, R.M., Mode, N.A. (2009). Patchy distributions belie morphological and genetic homogeneity in rosy-finches. *Mol. Phyl. Evol.* 50: 437–445.
- Fjeldså, J. et al. (2005). Illicit crops and armed conflict as constraints on biodiversity conservation

- in the Andes region. *Ambio*, 34(3), pp.205–11.
- González, F. (2009). Caracterización genética de las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Aves: Thraupidae) del Valle del Cauca y Cauca, mediante secuencias de ADN mitocondrial y microsátélites. Tesis de pregrado: Universidad del Valle.
- Helbig, A.J., Salomon, M., Bensch, S., Seibold, I. (2001). Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. *J. Evol. Biol.* 14: 277-287.
- Hilty, S.L., Brown, W.L. (1986). A guide to the birds of Colombia. Princeton University Press. Princeton; New Jersey.
- Isler, M.L., Isler, P.R. (1999). The Tanagers: Natural history, Distribution, and Identification. Smithsonian Institution Press. Pp. 406.
- Lafresnaye, D.E. (1846). Sur le *Ramphocelus icteronotus* du prince Bonaparte. *Rev. Soc. Cuv.* 365-368.
- MacDougall-Shackleton E.A., Blanchard L., Igdoura S.A., Gibbs H.L. (2003). Unmelanized plumage patterns in Old World leaf warblers do not correspond to sequence variation at the melanocortin-1 receptor locus (MC1R). *Molecular Biology and Evolution* 20: 1675–1681.
- McMullan, M., Donegan, T.M., Quevedo, A. (2011). Field guide to the Birds of Colombia. Fundación ProAves. Bogotá, Colombia.
- Morales-Rozo, A., Carlling, M.D., Cadena, C.D. (2010). Origin and Dynamics of a Hybrid Zone between *Ramphocelus* Tanager (Thraupidae) in Colombia. Tesis Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Moynihan, M. (1962). Display patterns of tropical American "nine-primaried" songbirds. II. Some species of *Ramphocelus*. *The Auk*. 79: 655-686.
- Mundy N.I., Badcock N.S., Hart T., Scribner K., Janssen K., Nadeau, N.J. (2004) Conserved genetic basis of a quantitative plumage trait involved in mate choice. *Science* 303: 1870–1873.
- Mundy, N.I. (2005). A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 272(1573), pp.1633–1640.
- Ocampo, I.C. (2008). Caracterización de dos subespecies de *Ramphocelus flammigerus* a partir de marcadores moleculares microsátélites. Tesis de pregrado. Universidad del Valle.
- Olson S.L., Violani C. (1995). Some unusual hybrids of *Ramphocelus* with remarks on Evolution in the Genus (Aves : Thraupinae). *Boll. Mus. Reg. Sci. Nat. Torino*. 13: 297-312.

- Rychlik, W., Spence, W.J., Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic. Acids. Rese.* 18: 6409-6412
- Sibley, C.G. (1958). Hybridization in Some Colombian Tanagers , Avian Genus “ Ramphocelus ”. 102(5), pp.448–453.
- Takeuchi, S., Suzuki, H., Hirose, S., Yabuuchi, M., Sato, C., Yamamoto, H., Takahashi, S. (1996) Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1306, 122–126.
- Theron, E., Hawkins, K., Bermingham, E., Richlefs, R.E., Mundy N.I. (2001). The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: A melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Current Biology*, 11(8), pp.550–557.
- Uy, J.A.C., Moyle, R.G., Filardi, C.E., Cheviron Z.A. (2009). Difference in Plumage Color Used in Species Recognition between Incipient Species Is Linked to a Single Amino Acid Substitution in the Melanocortin-1 Receptor. *The American Naturalist*, 174(2), pp.244–254.

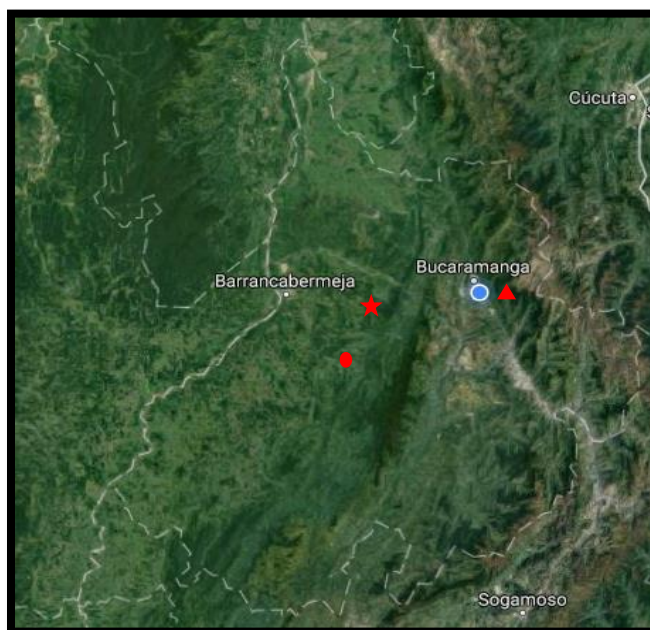
## Apéndices

### Apéndice A Prueba cualitativa de concentración de ADN.



Gel de Agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etideo contenido en una caja de Petri que presenta celdas donde se alojó 1 $\mu$ L del ADN de interés. La comparación se realizó con un patrón definido a 40ng/ $\mu$ L.

### Apéndice B Localidades de muestreo de los especímenes secuenciados.



Localidad	Muestra
● San Vicente de Chucurí (El Diviso)	Ri1
★ Lebrija (La Tagua)	Rd1
▲ Floridablanca (La Judía)	Ri2 Rd2