

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“DETERMINACIÓN SEXUAL DE *Aglaeactis castelnaudii* y
Aglaeactis cupripennis (TROCHILIDAE) MEDIANTE LOS GENES
CHD1 EN BOSQUES DE *Polylepis* EN LA CORDILLERA DEL
VILCANOTA, CUSCO”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

Presentado por:

Bach. DAVID GUEVARA APAZA

Asesorado por:

Dra. JULIA GRISELDA MUÑOZ
DURAN

Co-Asesora:

Mgt. MERCEDES MARITZA
QUISPE FLOREZ

FINANCIADA POR EL PROGRAMA “YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ”

CUSCO - PERÚ
2022

Para mi papá Marco.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo durante el desarrollo de mi carrera universitaria.

Al vicerrectorado de investigación de la UNSAAC por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta tesis de pregrado, al Comité de Bioética Institucional y Sub Comité de Bioética Institucional de estudio con animales, vegetales y/o material genético no humano de la UNSAAC, por brindar la autorización pertinente y al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR por el permiso de investigación para la colecta temporal de aves y la toma de muestras de tejido sanguíneo y plumas.

A mis asesoras, Mgt. Blga. Griselda Muñiz Durand y Mgt. Blga. Maritza Quispe Flórez del laboratorio de Biología Molecular por su guía y constante apoyo en el desarrollo de todas las etapas de este proyecto de investigación, así también al MSc. Romulo Segovia por su apoyo en la técnica en la preparación de este trabajo de tesis.

Al Dr. Fabricio Rodrigo dos Santos y al MSc. Jean Carlos Pedroso de Oliveira del laboratorio de Biodiversidade y Biología Molecular de la Universidade Federal de Minas Gerais, por su predisposición y apoyo en la fase de laboratorio de este trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos de la universidad y los asistentes de campo que brindaron su apoyo y compañía en la toma de datos para este proyecto de tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	II
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	III
JUSTIFICACIÓN	IV
OBJETIVOS	V
HIPÓTESIS	VI
CAPÍTULO I: GENERALIDADES	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.2 MARCO TEÓRICO	3
1.2.1 Los picaflores altoandinos en Perú	3
1.2.2 Morfometría en picaflores	7
1.2.3 Estimación de edad en picaflores	10
1.2.4 Monomorfismo y dimorfismo sexual en aves	11
1.2.5 Monocromatismo en aves	12
1.2.6 Sistema cromosómico sexual en aves	12
1.2.7 Identificación sexual de las aves	13
1.2.8 Genes CHD-1	16
1.2.9 Cebadores para la detección del gen CHD-1 en aves	16
1.2.10 Limitantes del uso de cebadores para la detección del gen CHD-1 en aves	19
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 ÁREA DE ESTUDIO	20
2.1.1 Ubicación política y geográfica	20
2.1.2 Accesibilidad	20
2.1.3 Descripción del área	20
2.1.4 Características ecológicas	20
2.2 MATERIALES	26
2.2.1 Material biológico	26
2.2.2 Materiales de campo - monitoreo ecológico	26
2.2.3 Materiales para colecta de muestras genéticas	26

2.2.4	Material de laboratorio	27
2.2.5	Reactivos e insumos	27
2.3	METODOLOGÍA	28
2.3.1	Captura temporal de aves	28
2.3.2	Preparación previa a la extracción de ADN	31
2.3.3	Extracción de ADN	32
2.3.4	Visualización de Amplicones	35
2.3.5	Secuenciamiento de CHD-Z	35
2.3.6	Análisis bioinformático	36
2.3.7	Análisis prueba de hipótesis entre el sexado molecular y datos morfométricos	36
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		37
3.1	Morfometría de picaflores del género <i>Aglaeactis</i>	37
3.2	Extracción de ADN (Calidad / concentración)	45
3.3	Amplificación de fragmentos del gen CHD1	49
3.4	Alineamiento de la secuencia de CHD-1Z	57
3.5	Correlación entre datos morfométricos y sexado molecular . . .	58
3.6	DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES		67
RECOMENDACIONES		69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		70

ÍNDICE DE ANEXOS	75
Anexo A: Aspectos de bioseguridad durante la colecta de muestra .	75
Anexo B: Protocolo de Extracción de ADN	75
Anexo C: Geles de Electroforesis - Amplificación del gen CHD-1 . . .	78
Anexo E: Secuenciamiento de fragmentos del gen CHD-1Z	79
Anexo D: Datos usados para el análisis	79
Anexo E: Imágenes del procedimiento	83
Anexo F: Permisos de Investigación y Comité de Ética	86

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1	Métodos moleculares para identificación sexual en aves. . .	15
Tabla N° 2	Ubicación de redes de neblina en la estación YANA (Y) . . .	23
Tabla N° 3	Ubicación de redes de neblina en la estación POLY (P) . . .	24
Tabla N° 4	Ubicación de redes de neblina en la estación QUELLO (Q)	25
Tabla N° 5	Concentración de stock y final de la PCR con Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)	33
Tabla N° 6	Cebadores usados en PCR	34
Tabla N° 7	Protocolo PCR Touchdown modificado	35
Tabla N° 8	Datos cualitativos de carácter reproductivo	38
Tabla N° 9	Datos cualitativos de muda	39
Tabla N° 10	Datos de porcentaje de estrías	39
Tabla N° 11	Comparación morfométrica por sexo en <i>A. castelnaudii</i> . . .	41
Tabla N° 12	Comparación morfométrica para especies <i>A. castelnaudii</i> con sexo no determinado (ND).	41
Tabla N° 13	Comparación morfométrica en <i>A. cupripennis</i>	43
Tabla N° 14	Comparación morfométrica para especies <i>A. cupripennis</i> con sexo no determinado (ND).	43
Tabla N° 15	Datos por espectrofotometría en tejido sanguíneo	46
Tabla N° 16	Datos por espectrofotometría en tejido de plumas	47
Tabla N° 17	Datos promedio de cantidad y calidad del ADN extraído . . .	48
Tabla N° 18	Ensayos de PCR y variación de temperatura de anillamiento por cada cebador en estudio	49
Tabla N° 19	Ensayos de PCR en el cebador CHD-R/CHD-F	50
Tabla N° 20	Datos de amplificación por PCR del gen CHD-1 en <i>A. castelnaudii</i>	53
Tabla N° 21	Datos de amplificación por PCR del gen CHD-1 en <i>A. cupripennis</i>	54
Tabla N° 22	Cantidad de amplificaciones efectivas en plumas y tejido sanguíneo	56
Tabla N° 23	Resultados de la prueba Mann–Whitney U en <i>A. castelnaudii</i>	60
Tabla N° 24	Resultados de la prueba Mann–Whitney U en <i>A. cupripennis</i>	63
Tabla N° 25	Datos usados en el análisis de datos morfométricos numé- ricos para <i>A. castelnaudii</i>	80
Tabla N° 26	Datos usados en el análisis de datos morfométricos numé- ricos para <i>A. castelnaudii</i> (parte 2)	81

Tabla N° 27	Datos usados en el análisis de datos morfométricos numé- ricos para <i>A. cupripennis</i>	82
-------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1	Individuos de las especies <i>A. castelnaudii</i> y <i>A. cupripennis</i> <i>Aglaectis</i>	4
Figura N° 2	Distribución de linajes de picaflores en América	5
Figura N° 3	Mapa de distribución de las especies <i>A. cupripennis</i> y <i>A.</i> <i>castelnaudii</i>	6
Figura N° 4	Toma de datos de la medida de cordura alar en picaflores	8
Figura N° 5	Toma de datos de la medida de la cola en picaflores	9
Figura N° 6	Toma de datos de la medida de pico - narina en picaflores	9
Figura N° 7	Visualización de estrías del pico de picaflores	10
Figura N° 8	Estrategia de muda simple compleja con muda preforma- tiva parcial en picaflores	11
Figura N° 9	Esquema de amplificación del gen CHD-1 en los cromosomas sexuales W y Z	13
Figura N° 10	Cromo-dominio de CHD	16
Figura N° 11	Diagrama esquemático del cebador P2/P8	17
Figura N° 12	Representación esquemática de regiones del cebador . . .	18
Figura N° 13	Eficiencia de los cebadores P2/P8	18
Figura N° 14	Mapa de ubicación de zona de estudio	22
Figura N° 15	Mapa de ubicación de trampas en la estación YANA	23
Figura N° 16	Mapa de ubicación de trampas en la estación Polylepsis . .	24
Figura N° 17	Mapa de ubicación de trampas en la estación Quellococha	25
Figura N° 18	Morfología de una pluma de vuelo típica	32
Figura N° 19	Diagrama de PCR Touchdown usado	34
Figura N° 20	Resultados del sexado molecular y datos de sexo no de- terminado colectados	37
Figura N° 21	Ciclo de muda y edad estimada para individuos de ACG- CU: <i>A. cupripennis</i> y AGCA: <i>A. castelnaudii</i>	40
Figura N° 22	Fotografías de <i>A. castelnaudii</i>	42
Figura N° 23	Fotografías de <i>A. cupripennis</i>	44
Figura N° 24	Espectrofotometría en tejido de sanguíneo	45
Figura N° 25	Espectrofotometría en tejido de plumas	47
Figura N° 26	Control de macho y hembra para <i>A. castelnaudii</i>	51
Figura N° 27	Productos de TD-PCR de genes CHD-1 amplificado por 3 cebadores en agarosa 2%	52
Figura N° 28	Análisis de productos amplificados con el cebador CHD- F/CHR-r por TD-PCR, en agarosa 2% (1)	54

Figura N° 29	Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-r por TD-PCR, en agarosa 2% (2).	55
Figura N° 30	Diferenciación de hembras usando los genes CHD-1	55
Figura N° 31	Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en <i>A. castelnaudii</i>	59
Figura N° 32	Diagramas de caja de medias numéricas: Pico Narinas y culmen expuesto en <i>A. castelnaudii</i>	59
Figura N° 33	Diagramas de caja de medias numéricas: Tarso y peso en <i>A. castelnaudii</i>	60
Figura N° 34	Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en <i>A. cupripennis</i>	62
Figura N° 35	Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en <i>A. cupripennis</i>	62
Figura N° 36	Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en <i>A. cupripennis</i>	63
Figura N° 37	Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-r por TD-PCR, en agarosa 2% (3)	78
Figura N° 38	Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-r por TD-PCR, en agarosa 2% (4).	78
Figura N° 39	Secuenciamiento del gen CHD-1Z	79
Figura N° 40	Monitoreo en campo y toma de muestras.	83
Figura N° 41	Extracción de ADN	84
Figura N° 42	PCR y visualización de Geles de Agarosa	85
Figura N° 43	Equipo de trabajo de campo en Agosto 2019.	86
Figura N° 44	Equipo de trabajo de laboratorio en Febrero del 2020.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	: Ácido Desoxirribonucleico
ARN	: Ácido Ribonucleico
CHD-1	: Gen Chromodomain Helicase Binding 1
CHD-1W	: Gen Chromodomain Helicase Binding 1 del cromosoma W (solo en hembras)
CHD-1Z	: Gen Chromodomain Helicase Binding 1 del cromosoma Z
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de Polimerasa).
pb	: Pares de bases
RFLP	: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RAPD	: Polimorfismo de DNA amplificado al azar
BP	: Brood Patch (Parche de incubación)
CP	: Cloacal Protuberance (Protuberancia cloacal, generalmente dilatada en machos en época de apareamiento)

RESUMEN

El presente trabajo reporta el uso de herramientas moleculares para la identificación del sexo de dos especies de picaflores altoandinos monocromáticos *Aglaeactis castelnaudii* (Endémica de Perú) y *A. cupripennis* de Bosques de *Polylepis sp.* en la Cordillera del Vilcanota, Cusco durante los meses de agosto a diciembre de los años 2016-2019 mediante el gen de Cromo Helicasa de Unión al ADN (CHD-1). En el caso de especies sin dimorfismo sexual (monomorfismo) la identificación del sexo depende de los cromosomas sexuales. El gen CHD-1, se encuentra en ambos cromosomas sexuales y su tamaño nos permite identificar el sexo en aves, obteniendo 2 bandas en el caso de las hembras y solo 1 banda en los machos observadas por electroforesis. El objetivo del presente trabajo fue identificar el sexo de las especies mencionadas mediante amplificación por PCR del gen CHD-1 a partir de muestras de ADN extraídas de plumas rectrices y 0.2 ml de tejido sanguíneo por individuo. De 81 aves capturadas temporalmente se obtuvieron 20 muestras de tejidos: 15 pares de muestras para *Aglaeactis castelnaudii* y 5 para *Aglaeactis cupripennis*. Se utilizó los cebadores específicos P2 / P8 (Griffiths et al., 1998), 2550F / 2718R (Fridolfsson & Ellegren, 1999) y CHD-F / CHD-R (Lee et al., 2010). Los fragmentos obtenidos del gen CHD-1Z (machos) fueron secuenciados haciendo uso de la técnica de Sanger. Además, se evaluó la influencia de los datos cualitativos (índices de edades y reproducción) sobre el sexado molecular y se realizó un análisis de hipótesis con la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U para analizar los datos morfométricos. La extracción de ADN de muestra de tejido sanguíneo fue mas eficiente tanto en índices de calidad (260/280, entre 1.9 - 2.1) y cantidad de ADN disponible de 141-4070 ng/μl frente a plumas (1.51 - 2.03 y 4-174 ng/μl respectivamente). En PCR, el cebador CHD1F / CHD1R, fue mas productivo respecto a la claridad y la diferencia de tamaño de las bandas generadas por electroforesis (aprox. 300 pb), siendo aproximadamente 650 pb en CHD-1Z (machos) y 350 pb en CHD-1W (hembras) observadas en gel de agarosa al 2%. Se diferenció 12 machos y 3 hembras de la especie *A. castelnaudii* junto a 4 machos y 1 hembra de la especie *A. cupripennis*. El secuenciamiento de los fragmentos del gen CHD-1Z (machos) dieron como resultado secuencias de 695 y 697 pares de bases para *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* respectivamente. En la evaluación morfométrica no se encontró influencia en los datos cualitativos, en las pruebas de hipótesis los valores obtenidos no fueron estadísticamente significativos, por lo que no se encontró diferencia en los valores morfométricos numéricos y el sexo de las aves. El gen CHD-1 permitió la identificación del sexo de los picaflores de ambas especies estudiadas a través de la amplificación por PCR en muestras de tejido sanguíneo.

Palabras clave: Andes, *Aglaeactis*, CHD-1, CHD-F / CHD-R, sexado molecular.

INTRODUCCIÓN

Perú posee 122 especies de las 338 picaflores existentes (Plenge, 2022). Estos tuvieron una diversificación masiva luego de su llegada a Sudamérica hace 22 millones de años gracias a la formación de los Andes que impulsó el proceso de especiación, concluyendo con aproximadamente 140 especies adaptadas exclusivamente a la vida Altoandina (McGuire et al., 2014). Este grupo en particular formó dos clados importantes en la vertiente de los Andes: Coquetas y Brillantes (McGuire, Witt, Remsen, Dudley, & Altshuler, 2009), ambos están presentes en la región de Cusco.

El dimorfismo sexual en animales es definido como la diferencia en formas, coloración (dicromatismo) o tamaño entre machos y hembras de una misma especie, ya que la expresión de estos caracteres son un conjunto de aspectos que juegan un papel fundamental para garantizar el éxito en los procesos de apareamiento (Matta Camacho, Ramírez Martín, Zúñiga Díaz, & Vera, 2009). Varias de estas especies de picaflores presentan un dicromatismo y dimorfismo sexual marcado, con machos llamativos y hembras pálidas, pero aun así, al igual que casi la mitad de especies de aves existentes, son monocromáticas (Fogden, Williamson, & Taylor, 2014). Debido a esta limitante en la diferenciación dificultan el reconocimiento del sexo de algunas especies de aves en monitoreos ecológicos personalizados como el anillamiento (Russell & Russell, 2019).

El sistema cromosómico de las aves es inverso al de los mamíferos, donde las hembras son heterogaméticas (cromosomas sexuales W y Z) y los machos son homogaméticos (2 copias del cromosoma Z). El gen CHD1 ("cromo-helicasa-región de unión al DNA") se encuentra ligado a ambos cromosomas sexuales en las aves y debido a la variación de la longitud del intrón, donde el fragmento del cromosoma Z (CHD1-Z) suele ser de mayor tamaño que el fragmento del cromosoma W (CHD1-W), es posible identificar el sexo de las aves a través del uso de protocolos de biología molecular.

Esta investigación tuvo como objetivo el uso de técnicas de amplificación del gen CHD1 mediante PCR para identificar el sexo de picaflores monocromáticos de las especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* a través de la amplificación del gen CHD1 en muestras de tejido sanguíneo y plumas de individuos colectados temporalmente en el periodo comprendido entre agosto a diciembre de los años 2016-2019.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

El desconocimiento del sexo en algunas especies de aves, puede tener consecuencias importantes para estudios ecológicos o poblacionales como: estudios en comportamiento, genética, evolución (Ellegren, 1996a), nicho ecológico, estructura poblacional como la diferencias en su tasa de desarrollo y susceptibilidad a enfermedades (Ellegren & Sheldon, 1997), así como su tasas de reproducción en hábitat fragmentados afectados por el cambio climático (Montalti, Kopij, & Maragliano, 2004).

Durante las tres ultimas décadas, la técnica de PCR es la más usada para el sexado molecular en aves silvestres, generalmente durante colecta de muestras durante monitoreos ecológicos con marcaje, es decir de cuando se involucra un estudio personalizado del individuo (Harvey, Bonter, Stenzler, & Lovette, 2006). Permitiendo priorizar características únicas de cada especie, estadios de vida (especialmente periodos de reproducción) y detectar las diferencias sexuales (en mucho casos dimorfismo sexual o como en este estudio el monomorfismo de color). La bibliografía en el uso de esta técnica es escasa tanto en el contexto académico nacional, solo un estudio en aves en cautiverio (Liza, Maturrano, & Rosadio, 2008), como en la familia Trochilidae (Hagadorn, Tell, Drazenovich, & Ernest, 2016; Shibuya, 2016; Shibuya, Presti, Lopes, Mota, & Roper, 2018).

La problemática que abordamos en este estudio se centra en aplicar las herramientas de biología molecular para aislar y amplificar el genes CHD-1 complementado con protocolos de monitoreo en campo para que apoyados a la tecnología disponible aportemos al conocimiento científico sobre el sexado de las especies de picaflores monomórficos en estudio que dependen de hábitat en constante degradación como los bosques de *Polylepis sp.*

Por lo expuesto se plantearon las siguientes preguntas:

1. ¿Es posible identificar el sexo de los picaflores altoandinos usando técnicas moleculares que aislen y ampliquen el gen CHD-1?
2. ¿Existirá correlación entre el sexado molecular y las características morfométricas (obtenidas en campo)?

JUSTIFICACIÓN

El Perú es el octavo país mas biodiversidad del mundo, se calcula que posee alrededor de 25,000 especies de animales, de los cuales el 22% son endémicas (CONCYTEC, 2016). En cuanto al grupo de las aves, el país posee 1,884 especies, incluyendo a 122 especies de las 338 especies de picaflores (Trochilidae) existentes en América y en el mundo (Plenge, 2022).

En estudios de ecología no disponer de la información del sexo de los individuos puede conllevar a tener información inexacta de la estructural poblacional de las especies monitoreadas (Matta Camacho et al., 2009), es por eso que el uso de técnicas modernas como la PCR para poder aislar genes específicos como el gen CHD-1 para identificar el sexo de aves monocromáticas es esencial para aportar mayor información de los individuos en estudio. Además que contribuye a la línea de investigación de Prospección de Biodiversidad, aportando al inventario de recursos genéticos para el conocimiento científico en la Región del Cusco y Perú.

Esta contribución puede generar nuevas propuestas de investigación y enriquecer las políticas de conservación en hábitats en los que se encuentren distribuidos algunas de estas especies endémicas y aquellas que se encuentren en peligro de extinción.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar el sexo de picaflores neotropicales altoandinos monocromáticos de las especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* de Bosques de *Polylepis* en la Cordillera del Vilcanota en Cusco, mediante los genes CHD-1.

Objetivos Específicos

1. Extraer y purificar ADN genómico a partir de tejido sanguíneo y plumas.
2. Amplificar los genes CHD-1 en las hembras y machos por PCR.
3. Secuenciar los fragmentos de genes CHD-1Z de machos.
4. Evaluar por medio de una prueba de hipótesis entre los datos obtenidos por el sexado molecular y los datos morfométricos de las especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis*.

HIPÓTESIS

Los genes CHD-1 permiten la identificación sexual en picaflores monocromáticos neotropicales altoandinos de las especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis*.

CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 ANTECEDENTES

Ellegren (1996a) en Suecia, describieron el gen homólogo descrito en gallinas con el gen CHD de ratones, el cual codifica una proteína envuelta en la regulación global de la activación transcripcional en el nivel cromático. Además determinaron la existencia de dos copias genómicas, una de ellas (denominada CHD-W) ubicada en el cromosoma W en todas las especies no-ratites (aves voladoras, excluyendo a avestruces, emúes, casuarios, ñandúes, kiwis y tinamúes). Además se desarrolló un sistema de flanqueo de intrones en el Papamoscas acollarado (*Ficedula albicollis*), pero aún no se disponía de un conjunto de cebadores conservados aplicables a linajes divergentes.

Kahn, St. John, & Quinn (1998) en Estados Unidos, reportaron los posibles intro- nes que intervienen entre CHD Helicasa y las regiones de unión del ADN (ADN-binding). Demostraron la eficacia de la amplificación por PCR en varias taxas de aves, usando electroforesis al 2% para reportar las bandas obtenidas. Además recomienda el uso de estas técnicas por su rapidez y estandarización en laboratorios para identificar el sexo de las aves de interés.

Harvey et al. (2006) en Estados Unidos, realizaron una comparación en la determi- nación del sexo en muestras de plumas y tejido sanguíneo de Carboneros de Capa Negra (*Poecilia atricapilla*), comprobó la eficacia de la amplificación de los fragmen- tos de CHD-1 haciendo uso de los cebadores P2-P8 tanto para tejido sanguíneo como para plumas. Además describe la necesidad de implementar una corrección a los protocolos de laboratorio cuando se usan plumas como fuente de tejido de ADN y discuten los posibles errores que puede generar usar tejido queratinizado, demostrando que puede ser una fuente confiable de ADN para estudios genéticos en la especie estudiada.

Wang et al. (2007) en Taiwán, comprobaron la utilidad del protocolo de sexaje mo- lecular y comparando con practicas de necropsia y endoscopia en 73 especies de aves (abarcando 19 familias) presentes en el Zoológico de Taipei. Reporto una falla en algunas especies haciendo uso del cebador 1237L/1272H debido a la posible existencia de diversidad genética y un éxito del 73% de especies usando el ceba- dor 2550F/2718R. Además discute que la repetida riqueza en secuencias de G/C en el cromosoma W (CHD-1W) en especies como el Kiwi, puede provocar el uso de otros medios como geles de poliacrilamida para poder detectar las bandas y recomienda que debido a la diversidad genética asumida es necesario investigar nuevos marcadores genéticos para otras especies candidatas.

Lee et al. (2010) en Taiwan, utilizaron la técnica molecular de PCR para amplificar el gen CHD en 144 muestras de 53 especies de varias familias de aves. Además de utilizar el cebador P2/P8, diseñaron los cebadores CHD-1R/CHD-1F. Este nuevo par de cebadores produce una diferencia entre las bandas W y Z de mayor tamaño siendo mas sensible a ser detectados por electroforesis en geles de agarosa. Todas las especies que fueron evaluadas fueron sexadas exitosamente y el protocolo fue recomendado como un método universal para el sexado otras aves.

Liu, Li, Yang, & Cai (2011) en China, utilizaron la técnica molecular de PCR para ampliar fragmentos específicos del gen CHD-1 utilizando varios cebadores diseñados a partir de Ellegren (1991) como el P2/P3 y P4/P5 en varias especies de Grúas hembras (*Balearica pavonina*, *Grus grus*, *Grus japonensis*, *Grus vipio*, *Grus leucogeranus*, *Anthropoides virgo* y *Grus nigricollis*), siendo productiva para la identificación sexual de este grupo de aves. Además reportaron un árbol filogenético de los genes CHD en las Grúas y secuenció los fragmentos de CHD-1W (exclusivamente en hembras).

Vucicevic et al. (2013) en Serbia, amplificaron el gen CHD en 248 muestras de varios grupos de aves, haciendo uso de los cebadores 2550F/2718R y P2/P8. Comprobaron la efectividad de estos cebadores en 50 de las 58 especies estudiadas. Propusieron hasta 5 protocolos de laboratorio para aislar el gen CHD-1 y recomendaron usar el gen CHD, por su alto grado de conservación, como identificador universal del sexo en aves (con excepción de la ratites), contribuyendo al conocimiento científico de muchas especies.

Hagadorn et al. (2016) en Estados Unidos, realizaron técnicas de PCR utilizando 11 cebadores diferentes y además evaluaron el uso de fuentes de ADN invasivas (tejido sanguíneo y tejido) y no invasivas (plumas) para determinar sexo de los picaflores más comunes en Norte América: *Calypte anna*, *Archilochus alexandri*, *Selasphorus sasin*, *Selasphorus rufus* y *Calypte costae*. Comprobaron que el cebador P2/P8 fue el mas exitoso en todas las especies en comparación con otros pares de cebadores evaluados y propone el uso de plumas como fuente de ADN. Este es el primer estudio que se realiza en individuos de la familia Trochilidae.

Çakmak, Akin Pekşen, & Bilgin (2017) en Turquía, experimentaron con tres de cebadores (CHD1F/CHD1R, 2550F/2718R y P2/P8) para identificar el sexo de 230 muestras de tejido de 77 especies (pertenecientes a 14 ordenes) de aves. Demostraron el éxito en todas las muestras haciendo uso de los cebadores CHD1F/CHD1R y propone un protocolo de Touchdown PCR para la amplificación de los fragmentos del gen CHD1. Recomendaron seguir usando los 3 pares de cebadores descritos como método universal para el sexado de aves pero escoger el mas eficiente dependiendo de la especie en la que se vaya a realizar el estudio.

Shibuya et al. (2018) en Piraquara, Brasil utilizaron técnicas moleculares de PCR para el sexado molecular de 110 individuos de 5 especies de picaflores monocromáticos: *Amazilia versicolor*, *Leucochloris albicollis*, *Colibri serrirostris*, *Florisuga fusca* y *Eupetomena macroura*, usando plumas y tejido sanguíneo de individuos vivos como fuente de ADN y amplificándolo con los cebadores P2 y P8 (con fluorescencia) y secuenciando los fragmentos generados. Encontraron fragmentos de genes de 2 tamaños: 374 pb en ambos sexos (cromosoma Z) y ambos de 379 - 383 pb en hembras (cromosoma W). Recomienda el uso de estas técnicas moleculares para monitoreos continuos que involucren el estudio individual en campo.

Liza et al. (2008) en Lima – Perú, utilizaron técnicas moleculares de PCR utilizando los cebadores específicos P2/P8 y tejido sanguíneo como fuente de ADN para el sexado molecular en cinco especies de guacamayos en cautiverio (*Ara ararauna*, *Ara chloroptera*, *Ara macao*, *Ara militaris* y *Propyrrhura couloni*). Reportaron el éxito en todas las muestras utilizadas, detectando dos fragmentos de 300-400 pares de bases en hembras y solo uno en machos en gel de poliacrilamida.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Los picaflores altoandinos en Perú

Los picaflores (familia Trochilidae), son aves pequeñas con un particular mecanismo de vuelo y metabolismo alto, destacados por sus colores llamativos e iridiscuentes (Calder, 2001), debido a la forma en que algunos pigmentos estructurales (capas de queratina) en las plumas reflejan la luz del sol (Scott, 2010).

Perú posee 122 especies de los 338 picaflores existentes (Plenge, 2022), estos tuvieron una diversificación masiva luego de su llegada a Sudamérica hace 22 millones de años, siendo la formación de los Andes lo que impulsó el proceso de especiación, concluyendo con aproximadamente 140 especies adaptadas exclusivamente al hábitat Andino (McGuire et al., 2014). La mayor parte de la diversidad de colibríes andinos (>2000 metros de altitud) se divide en los clados Coquetas y Brillantes (Bleiweiss, 1998; McGuire et al., 2009).

1.2.1.1 Picaflores altoandinos del género *Aglaeactis*

El género *Aglaeactis* pertenece al clado de los Brillantes. Este grupo está conformado por 29 especies por linaje principal representado en la hibridación filogenética del DNA, así como 49 especies taxonómicas.

El género *Aglaeactis* solo posee 4 especies descritas: *Aglaeactis cupripennis*, *A. castelnaudii* (ambas citadas en este estudio), *A. aliciae* y *A. pamela* (figura 1).



Figura N° 1: Individuos de las especies *A. castelnaudii* (izquierda) y *A. cupripennis* (derecha), tomado de Schuchmann (1985).

- **Fenotipo:** como se describe en Schuchmann (1985), poseen un pico recto y relativamente corto (20-24 mm), con un plumaje varía de leonado (oscuro) en *A. cupripennis*, el representante con mayor distribución, a marrón-negro en *A. castelnaudii* y *A. aliciae* en Perú a negro aterciopelado en *A. pamela*, en Bolivia. Sin embargo, los colores de pigmento oscuro son menos típicos de este complejo de especies que el brillo de las plumas de la espalda y la rabadilla, incluidas las cobertoras superiores de la cola en casi todos los colores del arco iris. Además, las alas son relativamente largas (80-90 mm), lo que les permite ahorrar energía en el vuelo hacia adelante a pesar de su alto peso corporal de 7 - 8.5 g, lo que los hace poseedores de la carga alar más baja de todos los troquílidos 0,023 g/cm². La diferencia en estadios de vida pueden verse ligados a la iridiscencia de las plumas, siendo mas opacas cuando son juveniles (hasta 1 año de vida) y mas llamativas y lustrosas en adultos.
- **Filogenia:** los individuos del genero *Aglaeactis*, pertenecen al grupo de los Brillantes. Este grupo evolucionó a partir de los ermitaños basales (subfamilia Phaethornithinae) de tierras bajas a través del proceso de colonización en Sudamérica, como se observa en la figura 2 y como se cita en Bleiweiss (1998).

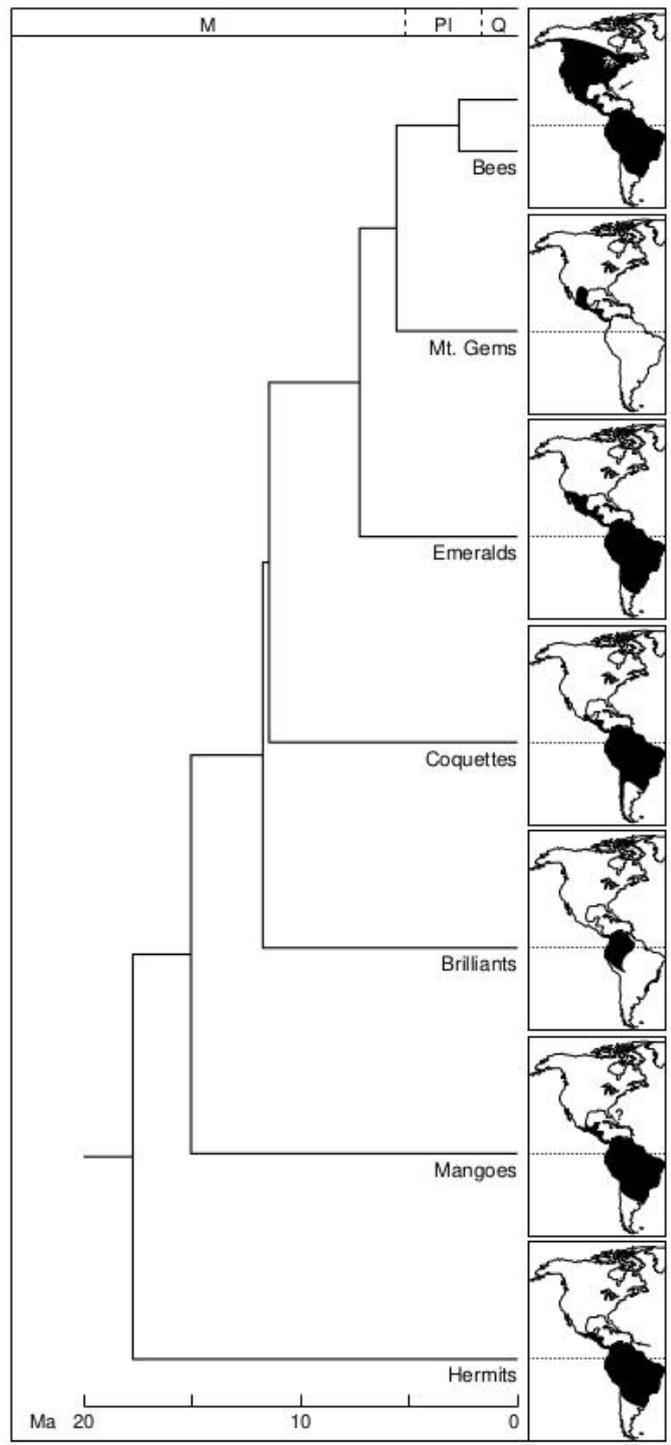


Figura N° 2: Distribución de linajes de picaflores en América, tomado de Bleiweiss (1998).

- **Distribución:** casi todos los individuos del genero *Aglaeactis* poseen un rango restringido debido a barreras geográficas de los lugares que habitan, desde cuerpos de agua hasta montañas (Bleiweiss, 1998), en el caso de las especies del genero *Aglaeactis*, están confinadas en gran medida a las la-

deras orientales de los Andes (Schuchmann, 1985), esta restricción se ve reflejada en el endemismo tanto para Perú por la especie *Aglaeactis castelnaudii* (principal en este estudio) y *Aglaeactis aliciae*, como para Bolivia por la especie *Aglaeactis pamela*. Estas tres especies tienen como predecesor a *Aglaeactis cupripennis* (principal en este estudio) que se encuentra distribuido por un amplio rango, desde Colombia, Ecuador y Perú.



Figura N° 3: Mapa de distribución de las especies *A. cupripennis* y *A. castelnaudii*. En la zona de estudio se puede además se puede apreciar a la subespecie *A. castelnaudii castelnaudii*. Elaborado con datos de Birdlife International, consultado en 2020

-
- **Ubicación taxonómica:**, los picaflores en estudio se encuentra bajo la siguiente clasificación:

Reino : Animalia

Phylum : Chordata

Clase : Aves

Orden : Apodiformes

Familia : Trochilidae

Genero : *Aglaeactis*

Especie : *A. cupripennis* (Bourcier, 1843)

A. castelnaudii (Bourcier & Mulsant, 1848)

1.2.2 Morfometría en picaflores

Acorde al manual de anilladores de picaflores de Norte América (Russell & Russell, 2019), se utilizaron técnicas de medición estandarizadas para poder comparar los datos posteriormente. Estas mediciones se realizan con instrumentos como bolsas de tela. Entre las medidas tomadas, se describen a continuación:

- **Medidas categóricas**, que comprenden medias subjetivas durante la examinación del ave y la experiencia del investigador.
 1. **Grasa:** Es el porcentaje apreciable en las fosas pectorales del ave. Es muy complicado apreciarlo debido al tamaño del ave. Se usa una escala de 0: No presentaba grasa corporal, 1: vestigios en la zona pectoral, 2: grasa en zona pectoral, cuello y partes de la espalda, 3: grasa en todo el cuerpo.
 2. **Protuberancia cloacal (CP):** en muchos picaflores, la región del orificio cloacal se hincha durante la temporada de reproducción en los machos y se extiende hacia afuera de manera notoria. Tanto los colibríes machos como hembras tienen pequeñas protuberancias durante todo el año; dado que normalmente no hay una diferencia notoria entre los sexos, no es necesario anotarlos ni medirlos. En el momento de la puesta de huevos, las hembras a menudo muestran una hinchazón notable en el área desnuda anterior a la cloaca y el huevo en sí puede ser bastante visible inmediatamente antes de la puesta. Para medir el CP, se usa una escala de 0: No presentaba CP, 1: CP aparente (protuberancia hinchada - convexa), 2: CP notorio, 3: CP hinchado - probablemente por deposición de heces o por reproducción.
 3. **Parche de incubación (BP):** es una modificación que sufren las aves durante la época de incubación de huevos desarrollando un área sin

plumas, engrosada y vascularizada en la superficie ventral. En picaflores es aparente por una inflamación sutil o distinta del área abdominal que puede estar asociada con el desarrollo del huevo. Para medir el BP se usa una escala de 0: No presentaba BP, 1: BP aparente (hinchado), 2: BP notorio (hinchado y rojo), 3: BP maduro, de apariencia a una bolsa perdiendo líquido, 4: BP muy arrugado, apariencia de bolsa que perdió todo el líquido.

4. **Muda corporal:** esta medida se colecta dependiendo de la presencia activa de muda corporal en el cuerpo del ave (presencia de nuevas plumas o capullos de nueva plumas). Para medirlo se usa una escala de 0 (sin muda aparente) a 5 (muda en todo el cuerpo).
5. **Desgaste de plumas rémiges:** este patrón sirve mucho para identificar aves inmaduras. En este estudio solo tomamos en cuenta las plumas rémiges de las plumas primaria (P10 a P8) usando una escala de 0 (plumas gastadas, con cortes en forma de «v» en la punta) a 5 (Plumas lustrosas y nuevas).

- **Medidas numéricas:** Comprenden medidas tomadas haciendo uso de instrumentos como reglas, vernier calibrado al 0.1 cm y balanza gramera, se describen a continuación:

1. **Largo del ala:** Esta medida también es conocida como «cordura alar» y se toma desde la curvatura del ala plegada hasta la punta de la primaria más larga (Figura 4). Con esta técnica se permite conocer el tamaño de la pluma de vuelo primaria más larga (P10).

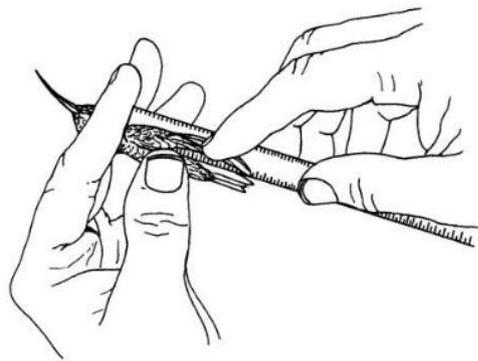


Figura N° 4: Toma de datos de la medida de cordura alar en picaflores.
Manual de anillador de picaflores de Norte América (Russell & Russell, 2019)

2. **Cola:** Se obtiene a través del uso de la regla especial, deslizando entre las dos rectrices centrales cerca de sus bases y lo más paralela posible al plano de la pluma, luego se presiona ligeramente hacia el cuerpo hasta

que se detiene como se observa en la figura 5 (a). No se mide la cola si las rémiges más largas están muy gastadas, rotas, faltan o crecen.

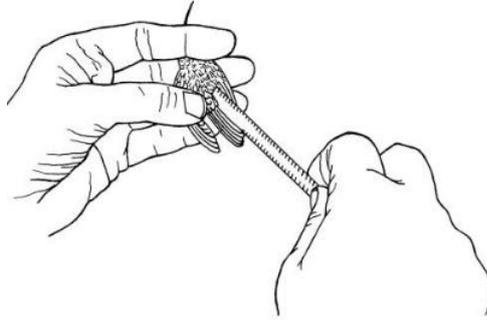


Figura N° 5: Toma de datos de la medida de la cola en picaflores.
Manual de anillador de picaflores de Norte América (Russell & Russell, 2019)

3. **Pico - narinas:** La medida se toma haciendo uso de un vernier calibrado al 0.1 cm. La medida se toma desde el borde frontal de las plumas en el lado superior (dorsal) del pico superior (maxilar) hasta la punta del pico (Figura 6). En el caso de aves con pico curvado, esta medida se realiza tomando en cuenta la curvatura del pico.



Figura N° 6: Toma de datos de la medida de pico - narina en picaflores.
Manual de anillador de picaflores de Norte América (Russell & Russell, 2019)

4. **Ancho del pico:** similar a pico-narina, la medida se toma haciendo uso de un vernier calibrado al 0.1 cm. Se toma como indicativo la parte mas ancha de la base del pico para complementar la información colectada por el largo del pico.
5. **Tarso:** la medida se toma haciendo uso de un vernier calibrado al 0.1 cm. Se toma como indicativo el largo del tarso (medida entre la rotula de la pierna y la base de la pata).

-
6. **Masa corporal (peso):** la medida se toma haciendo uso de una balanza gramera de sensibilidad al 0.01 g y es de gran utilidad como indicador de la condición fisiológica del picaflor cuando se usa en combinación con la cuerda del ala.

1.2.3 Estimación de edad en picaflores

La estimación de la edad de picaflores es un tema que aun se viene estudiando para utilizar un sistema global estandarizado. Se demostró que el uso del sistema anual (Russell & Russell, 2019) en Estados Unidos y Canadá (hemisferio norte) no puede compararse directamente con el Neotrópico (hemisferio sur), por lo que se implemento el sistema WRP (Johnson & Wolfe, 2017; Wolfe, Ryder, & Pyle, 2010). En este estudio usamos el sistema WRP basado en ciclos de muda y la presencia de estrías para determinar la edad de las aves.

- **Estrías:** conocido también como «corrugaciones del pico», característica exclusiva de los picaflores. Basado en la suposición de que los individuos juveniles tienen finas ondulaciones que se extienden en diagonal a lo largo del pico, como se cita en Russell & Russell (2019) y como se aprecia en la figura 7. Para medirlo se usa una escala porcentual, donde el individuo mas adulto presenta un porcentaje cercano a 0 y opuestamente, en individuos juveniles presenta cerca de un 100%

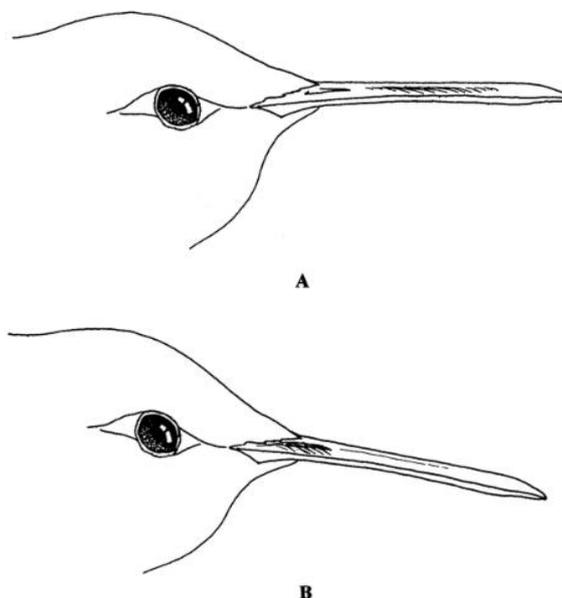


Figura N° 7: Visualización de estrías del pico de picaflores.
(A) Estrías en individuos juveniles, (B) Estrías en individuos adultos.
Manual de anillador de picaflores de Norte América (Russell & Russell, 2019)

- **Sistema WRP**, el ciclo de muda de un ave depende de su estrategia de muda, la extensión de la muda y el plumaje de cada etapa de muda. Según Johnson & Wolfe (2017), los picaflores probablemente pueden desarrollar un sistema de muda con estrategia básica compleja con muda preformativa parcial (figura 8).

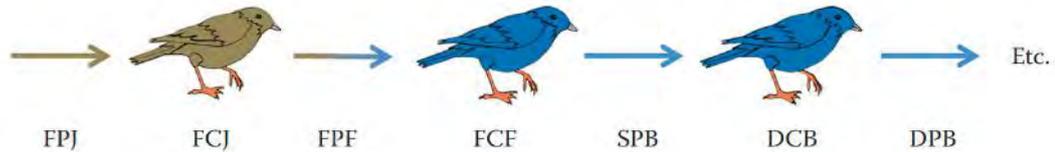


Figura N° 8: Estrategia de muda simple compleja con muda preformativa parcial en picaflores Johnson & Wolfe (2017)

Las códigos de los ciclos de edad que este grupo de aves puede tomar son los siguientes:

- **FPJ** - Polluelo, Muda prejuvenil (del termino en ingles: *Prejuvenile molt*).
- **FCJ** - Juvenil, Primera muda juvenil (*First cycle prejuvenile*).
- **FPF** - Juvenil, Primer ciclo de muda preformativo (*First cycle preformative molt*)
- **FCF** - Juvenil (casi adulto), Primer ciclo formativo (*First cycle formative*)
- **SPB** - Adulto, Segundo ciclo pre - básico (*Second prebasic molt*)
- **DCB** - Adulto, Ciclo básico definitivo (*Definitive cycle basic*)
- **DPB** - Adulto, Ciclo prebásico definitivo (*Definitive prebasic molt*)

La diferencia en años de adultos es complicada, por lo que la diferencia entre SPB y DCB no es apreciable en campo sin métodos de marcaje, por lo que se estandarizó el uso de DCB para individuos adultos en este estudio.

1.2.4 Monomorfismo y dimorfismo sexual en aves

Se define dimorfismo sexual a cualquier diferencia en tamaño, color, presencia y/o ausencia de alguna estructura que provoque una diferencia apreciable entre los sexos en las especies. El dimorfismo y monomorfismo sexual (término antagónico) han evolucionado repetidamente el uno del otro, sugiriendo que las limitaciones genéticas no son fuertes para desencadenar los procesos evolutivos (Price & Birch, 1996). En cuanto a las diferencias por color, la validez de este enfoque evolucionario ha sido cuestionada en las últimas décadas, con la demostración de que muchas especies de aves pueden ver longitudes de onda UV debido a la presencia de un

cuarto tipo de célula cónica en la retina que es receptiva a la luz UV (como se cita en Eaton (2005).

En las aves, el monomorfismo y dimorfismo sexual son también expresado como monocromatismo y dicromatismo sexual correspondientemente, cuando la diferencia se basa en color o patrones de color del plumaje de los individuos, probablemente debido a una consecuencia de la selección sexual. Primeramente, por mutaciones en el cromosoma sexual y que al parecer la compensación de dosis parece no ocurrir en aves. Y en segundo lugar, por que algunos genes autosómicos pueden estar sujetos a una expresión limitada por sexo (la expresión de algunos colores en el macho depende de la presencia de testosterona o de la ausencia de estrógeno). Esta evolución en el dimorfismo sexual requiere no solo las presiones de selección adecuadas sino también de variación genética suficiente, pudiendo concluir en la presencia de rasgos rudimentarios de machos en hembras o viceversa (Price & Birch, 1996).

1.2.5 Monocromatismo en aves

El monocromatismo, es un proceso marcado generalmente cuando el ave se encuentra en los primeros estadios de su vida (recién eclosionado o como polluelo) luego de algunas semanas es posible apreciar algunas características que los diferencian como el tamaño (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). En muchos casos, un eventual dicromatismo es apreciable entre el paso del estadio juvenil – adulto, pero no es un factor determinando por lo que incluso hasta hoy en día un 60% de todos los Passeriformes (el orden más grande y diverso de las aves) son monocromáticas (Price & Birch, 1996). Además que la ausencia de diferencias apreciables entre machos y hembras, provoca que su identificación en campo sea complicada para los investigadores (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

1.2.6 Sistema cromosómico sexual en aves

Es conocido que el sistema cromosómico de diferenciación sexual en aves se basa en cromosomas autosómicos heterogaméticos, donde las hembras poseen un cromosoma sexual Z y un segundo cromosoma sexual W y los machos poseen dos copias del cromosoma sexual Z (figura 9. Gran parte del cromosoma W (al igual que el cromosoma Y en mamíferos) presenta señales típicas de un cromosoma sexual degenerado, debido a su bajo contenido de material genético codificante (menos de veinte genes), rico en secuencias satélites similares a las encontradas en la heterocromatina del centrómero, lo cual lo hace susceptible de cambios y mutaciones pues no está sujeta a una presión selectiva (Fridolfsson & Ellegren, 1999). La presencia de gran cantidad de DNA no codificante es explicada por la acumulación de mutaciones deletéreas o presencia de elementos transponibles. Por su

parte, el cromosoma Z (al igual que el cromosoma X en los mamíferos) es uno de los cromosomas más conservados pues aún mantiene el mismo grupo de genes codificantes, cerca de 350 genes (como se cita en Matta Camacho et al. (2009)).

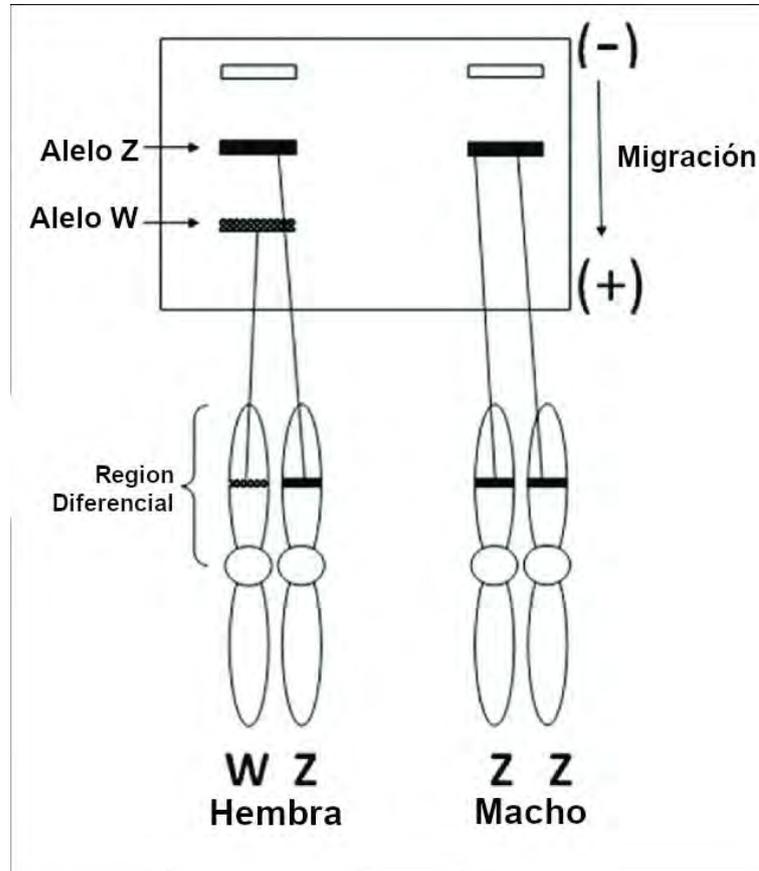


Figura N° 9: Esquema de amplificación del gen CHD-1 en los cromosomas sexuales W y Z de aves macho y hembra Purwaningrum et al. (2019)

1.2.7 Identificación sexual de las aves

La identificación del sexo, tiene una importancia grande en estudios de biología evolutiva, ecología, identificación forense, genética de poblaciones, conservación, así como en la planificación de la reproducción de especies amenazadas o para hacer cumplir la legislación para proteger las especies de aves en peligro de extinción (Lee et al., 2010; Matta Camacho et al., 2009).

Durante las últimas 3 décadas, se vienen implementando proyectos que prioricen la identificación sexual en aves, de modo que se pueda estandarizar protocolos aplicables a muchas especies de aves a nivel global.

1.2.7.1 Identificación sexual por herramientas no moleculares

- a) **Por hormonas y herramientas ecológicas.** La mayoría son usados como indicadores. Estos métodos pueden ser ecológicos como la observación del comportamiento de búsqueda de alimento o la presión de la depredación, la dispersión o patrones de migración, diferencias en morfométrica, la presencia del parche de incubación (en inglés Brood patch, cuando las gónadas retroceden) solo en temporadas de reproducción, o a través de intervenciones quirúrgicas como el examen de las gónadas por laparotomía o laparoscopia, o por exámenes de laboratorio como pruebas para detectar esteroides fecales (proporciones más altas de estrógenos en aquellas muestras provenientes de las hembras) siendo todos los resultados afectados por la edad del animal y la época de captura (Begović et al., 2017; Çakmak et al., 2017; Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006; Khaerunnisa, Sari, Ulfah, Jakaria, & Sumantri, 2013; Matta Camacho et al., 2009)
- a) **Por Citogenética.** Mediante el análisis de los cromosomas provenientes de tejido sanguíneo (cultivo celular, 6-8 gotas de tejido sanguíneo equivalentes a 0,4-0,5 µl). Esta metodología requiere tiempo para su estandarización, es muy susceptible a contaminación y necesitan personal muy capacitado por la complejidad del cariotipo de las aves, que tienen 40-126 cromosomas (Matta Camacho et al., 2009), además por el desconocimiento del tamaño de los cromosomas sexuales en varios tipos de aves (Ellegren & Sheldon, 1997).

1.2.7.2 Identificación sexual por herramientas moleculares

Los protocolos moleculares propuestos fueron evolucionando en función a la disponibilidad de tecnología y costo de insumos permitiendo la detección y el diseño de los cebadores novedosos, muchos de estos aún se siguen usando en la actualidad. Las propuestas usadas se presentan en la tabla 1 de manera cronológica.

Tabla N° 1: Métodos moleculares usados para identificar el sexo de aves.

TÉCNICA	BASE	LIMITACIONES	REF
Haciendo uso de Técnicas Convencionales.			
Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).	Compara los perfiles de bandas, después de la digestión por enzimas de restricción.	Difícil automatización y la manipulación de material radiactivo para su visualización	(1)
Análisis de Minisatélites	Desarrollo de sondas de ADN que son capaces de descubrir números grandes de minisatélites.	Hiper variabilidad de los sitios de hibridación.	(1)
Análisis de Microsatélites.	Muestra a machos como heterocigotos y a las hembras como homocigotas según el número de bandas.	Tiempo y difícil automatización.	(1)
Haciendo uso de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).			
Polimorfismo de DNA amplificado al azar (RAPD).	Emplean cebadores cortos (10 nucleótidos) de secuencia arbitraria para generar huellas genéticas. Solo funciona en la especie de estudio (es una técnica muy específica).	Baja reproducibilidad por las condiciones de reacción y/o competencia entre el ADN de diferentes fragmentos y aparición de bandas inespecíficas (débiles).	(1) (2) (3) (4)
Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).	Combinación de las técnicas RFLP y PCR, siendo mas reproducible, permite la identificación de individuos, estimación de análisis de parentesco y en la determinación del sexo en algunas aves. Esta técnica contribuyó a la detección del Gen CHD-1.	Requiere de personal capacitado y mayor costo.	(1)
Usando los genes CHD-1.	A través de la amplificación de intrones del gen CHD-W en aves no ratites de cualquier sexo y CHD-Z en machos.	Posibles alteraciones o polimorfismos debido al tamaño de CHD-Z en hembras.	(1) (5)

Referencias: (1) *Matta Camacho et al. (2009)*; (2) *Griffiths & Tiwari (1995)*; (3) *Ellegren (1996b)*; (4) *Ellegren & Sheldon (1997)*; (5) *Griffiths et al. (1998)*.

1.2.8 Genes CHD-1

Los genes CHD tienen un papel importante en la codificación de la regulación (control de la elongación) transcripcional a nivel de la cromatina (Ellegren, 1996b; Liu et al., 2011) y en la remodelación de la cromatina (Griffiths & Korn, 1997; Simic et al., 2003). Esta familia de genes se encuentran desde hongos (levaduras) hasta seres humanos (Matta Camacho et al., 2009).

Existen 3 dominios en la proteína CHD1 (Chromo-Helicase/ATPase-DNA binding protein, gráficamente en la figura 10): En primer dominio, Chromo, tiene una secuencia similar que está representado en 2 familias de proteínas HPI y Polycomb (expresión de genes y condensación de la cromatina), variando en cada familia de aves. El segundo dominio, Helicasa/ATPase, es parte de una familia de proteínas de múltiples funciones, siendo similar la SNF2 de los humanos, la cual activa la transcripción por condensación de la cromatina. El último el dominio, DNA binding que provee de una unión (>12pb) selectiva a dinucleótidos AT de doble cadena de ADN vía interacción (como se cita en Griffiths & Korn (1997)).



Figura N° 10: Cromo-dominios presentes en la estructura de la proteína CHD Matta Camacho et al. (2009)

El gen CHD1 contiene al menos dos intrones que difieren en longitud en los cromosomas Z y W. Esto permite la discriminación entre los productos de los genes CHD-Z y CHD-W en un gel, resultando en una detección exitosa cuando se tiene la presencia de ambos genes en hembras (W, Z) y un par de genes Z en machos (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006). La amplificación y electroforesis del gen CHD en ambos cromosomas sexuales es el método más usado para identificar el sexo en casi todos los grupos de aves (Lee et al., 2010).

1.2.9 Cebadores para la detección del gen CHD-1 en aves

El primer gen CHD-W descrito fue encontrado en el cromosoma W y un segundo gen CHD1 (que llamaron CHD-Z) por su posible localización en el cromosoma Z (Ellegren, 1996a). CHD-W estaba representando una secuencia conservada inusualmente y estando presente en todas las aves de linajes mayores, sin incluir las aves ratites.

Los primeros cebadores descritos para este propósito fueron los desarrollados por Ellegren (1996b):

- **P2** (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')
- **P3** (5'-AGATATTCCGGATCTGATAGTGA-3')

Años más tarde usando secuenciación de clones ADNc se estimó el homólogo de CHD de roedores en gallinas, se confirmó la presencia de ambos genes CHD-W y CHD-Z en un solo organismo (hembras). El grado de homología entre el gen CHD-W en gallinas y el ratón CHD (figura 11) fue de 83% a nivel de nucleótidos y 96% a nivel de aminoácidos, este extraordinario nivel de similaridad es debido a que los linajes de aves y mamíferos divergieron hace más de 200 millones de años (Ellegren & Sheldon, 1997), comprobando una vez más la diferenciación evolutiva de los cromosomas sexuales en aves y mamíferos.

Además aportaron con el diseño de los siguientes cebadores:

- **2917F** (5'-GTAGAAGAAGATATTCTTGA-3')
- **3088R** (5'-CCTCAGCACCAAACCTTCAA-3')

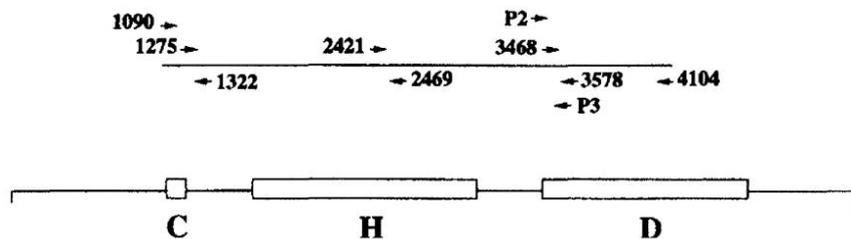


Figura N° 11: Diagrama esquemático de la organización del gen CHD (en roedores) incluyendo la posición de los cebadores usados para amplificar el gen CHD-W en gallinas (Ellegren, 1996b). La línea representaba la parte del CHD-W de gallina secuenciado.

Kahn et al. (1998) usó los cebadores descritos previamente para el sexado de *Ficedula albicollis*, proponiendo de igual manera otro par de cebadores:

- **1237L** (5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3')
- **1272H** (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3')

Para poder detectar la presencia del gen CHD1, necesitando de enzimas de restricción para producir las amplificaciones. En su desarrollo se asumió que no existe ningún producto de cromosoma Z (es decir, no tomaron en cuenta la existencia de CHD-Z). La existencia de 2 genes CHD1 en aves fue problemático y ventajoso

desde el punto de vista de identificación sexual molecular (Fridolfsson & Ellegren, 1999). Por lo que Griffiths et al. (1998), mejoro su técnica garantizando la reproducibilidad a bajo costo bajo la amplificación de PCR sin necesidad de enzimas de restricción para cortar selectivamente algunos fragmentos (figura 12) , probando sus primer previamente descrito (P2-P3) en combinación con una serie de candidatos (P14, P9 y P8) considerando finalmente el par P2-P8 por su éxito en el sexaje de 27 especies de varios ordenes de aves (figura 13), garantizando su uso universal en aves no ratites.

- **P2 (F)** (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')
- **P8 (R)** (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3')

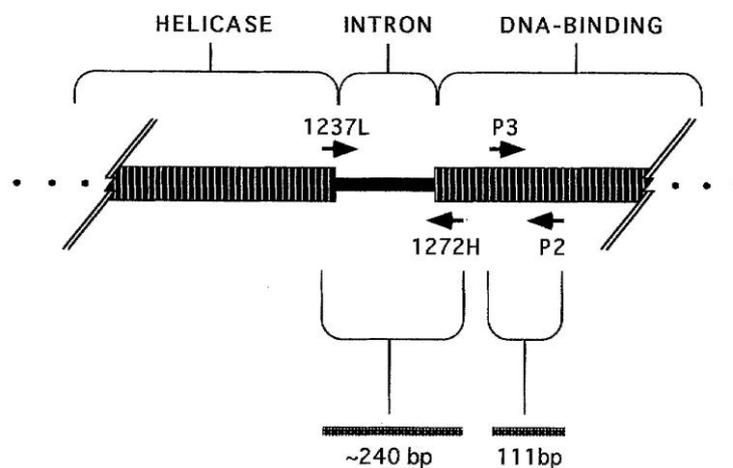


Figura N° 12: Representación esquemática de las regiones del gen CHD usando los cebadores producidos por Kahn et al. (1998) tomando como referencia los cebadores P3-P2 Griffiths et al. (1996).

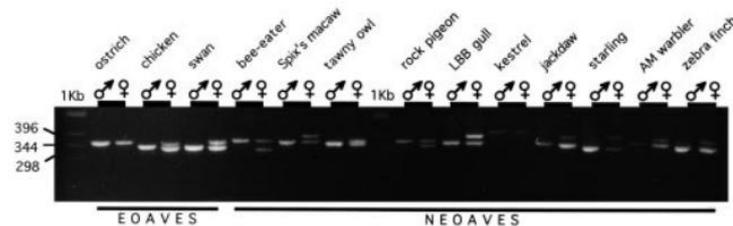


Figura N° 13: Éxito de los cebadores P2-P8 a través de varias clases y especies de ave (Griffiths et al., 1998)

El uso de estos cebadores daba como producto 2 bandas en el caso de los machos con una diferencia muy corta de 10 a 80 pb (Jensen, Pernasetti, & Durrant, 2003), que podían ser observados con dificultad en geles de agarosa, por lo que se recomienda el uso de geles de poliacrilamida para la visualización de los fragmentos.

Un informe anterior indicó que la falta de sexo con precisión de algunas especies utilizando el par de cebadores P2 - P8 se debió probablemente a polimorfismos en el cromosoma Z (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Fridolfsson & Ellegren (1999) también proponen el uso de los cebadores 2550F-2718R para la identificación sexual de aves.

- **2550F** (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3')
- **3718R** (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3')

El uso de estos cebadores daban como producto fragmentos de ADN de 400-450 pb en el en el gen CHD1-W y 600-650 pb en el gen CHD1-Z. La comparación de los individuos generalmente se daba por una diferencia de 150-250 pb (sólo en hembras y cuando las bandas estaban separadas, Fridolfsson & Ellegren (1999). El uso de estos cebadores garantizaban la visualización de las bandas de manera estándar en geles de agarosa, a comparación con los primeros usados por Griffiths et al. (1998), estos podían apreciarse sin necesidad de geles de poliacrilamida.

Por último, Lee et al. (2010) diseñó los cebadores CHD1F-CHD1R a partir de alineamientos de secuencia de productos 2550F-2718R.

- **CHD1F** (5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3')
- **CHD1R** (5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3')

En el mayor de los casos, el tamaño del fragmento Z es mayor que el fragmento W en las amplificaciones usando el conjunto de cebadores CHD1F - CHD1R, pero se observa lo contrario en el caso de la amplificación P2 - P8 (Lee et al., 2010). El uso de estos cebadores también garantizaban el éxito del sexaje, con bandas separadas por cada gen CHD y su visualización en geles de agarosa haciendo uso de métodos convencionales y económicos de laboratorio.

1.2.10 Limitantes del uso de cebadores para la detección del gen CHD-1 en aves

El uso de las técnicas de detección del gen CHD-1 también tiene algunas limitaciones como la existencia de posibles errores en la interpretación de los datos de tipificación sexual, como el polimorfismo en el cromosoma Z y la formación de moléculas de ADN heteroduplex, pudiendo ser necesario realizar análisis de fragmentos adicionales (electroforesis capilar) aumentando así los costos asociados con el procedimiento (Çakmak et al., 2017; Shibuya et al., 2018).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevo a cabo en los Bosques de Yanacocha y Quellococha (figura 14). El monitoreo se llevo a cabo a través de Estaciones de monitoreo: YANA (Mapa en figura 15 y tabla 2) y POLY (Mapa en figura 16 y tabla 3) en el Bosque de *Polylepis* de Yanacocha y QELLO (Mapa en figura 17 y tabla 4) en el Bosques de *Polylepis* de Quellococha de la Localidad de Yanacocha.

2.1.1 Ubicación política y geográfica

Localidad de Yanacocha, Centro Poblado de Huayocari (-13.285592, -72.049514), Distrito de Huayllabamba, Provincia de Urubamba, Región Cusco.

2.1.2 Accesibilidad

El acceso fue por la carretera asfaltada Cusco – Urubamba, con un desvío al pueblo de Huayocari seguido de una caminata de aproximadamente cinco horas (aproximadamente 10 km) hasta llegar a la laguna y bosque de Yanacocha.

2.1.3 Descripción del área

Los Bosques de Yanacocha y Quellococha son parte de los 10 bosques de *Polylepis* sp. de la provincia de Urubamba y de la cordillera del río Vilcanota. Yanacocha sobresale de todos ellos por ser el de mayor punto de biodiversidad (Servat, Mendoza, & Ochoa, 2002), siendo el más rico en variedades de aves frente similares como Pumahuanca, Mantamay y Huilloc (Lloyd & Marsden, 2008).

2.1.4 Características ecológicas

- **Altitud:** Los bosques se encuentran en na gradiente del Valle sagrado o valle del Vilcanota y comprenden entre 3950 a 4100 metros de altitud.
- **Recursos Hidricos:** Posee lagunas (cochas) que tiene origen glacial, estas están rodeadas de los bosques de *Polylepis* (en general *P. subsericans*) de distribución simpátrica a través de a gradiente altitudinal (Galiano, 1990).
- **Exposición Solar:** Posee condiciones naturales de exposición solar alta y ventosidad abundante, debido a las pequeñas quebradas secundaria a lo largo del territorio (Galiano, 1990).

-
- **Ecosistema:** Basado en el Mapa de Ecosistemas (MINAM, 2019), la zona de estudio se encuentra dentro de la categorización de «Bosque relictos altoandinos (Queñoal y otros)». Este ecosistema forestal está constituido por bosque relictos altoandinos dominados por asociaciones de «queñoa» (*Polylepis*), que se extienden por más de 0,5 hectáreas, con árboles de una altura superior a 2 metros y una cubierta del suelo superior al 10%; comúnmente restringidos a laderas rocosas o quebradas; distribución actual en parches o islas de vegetación.

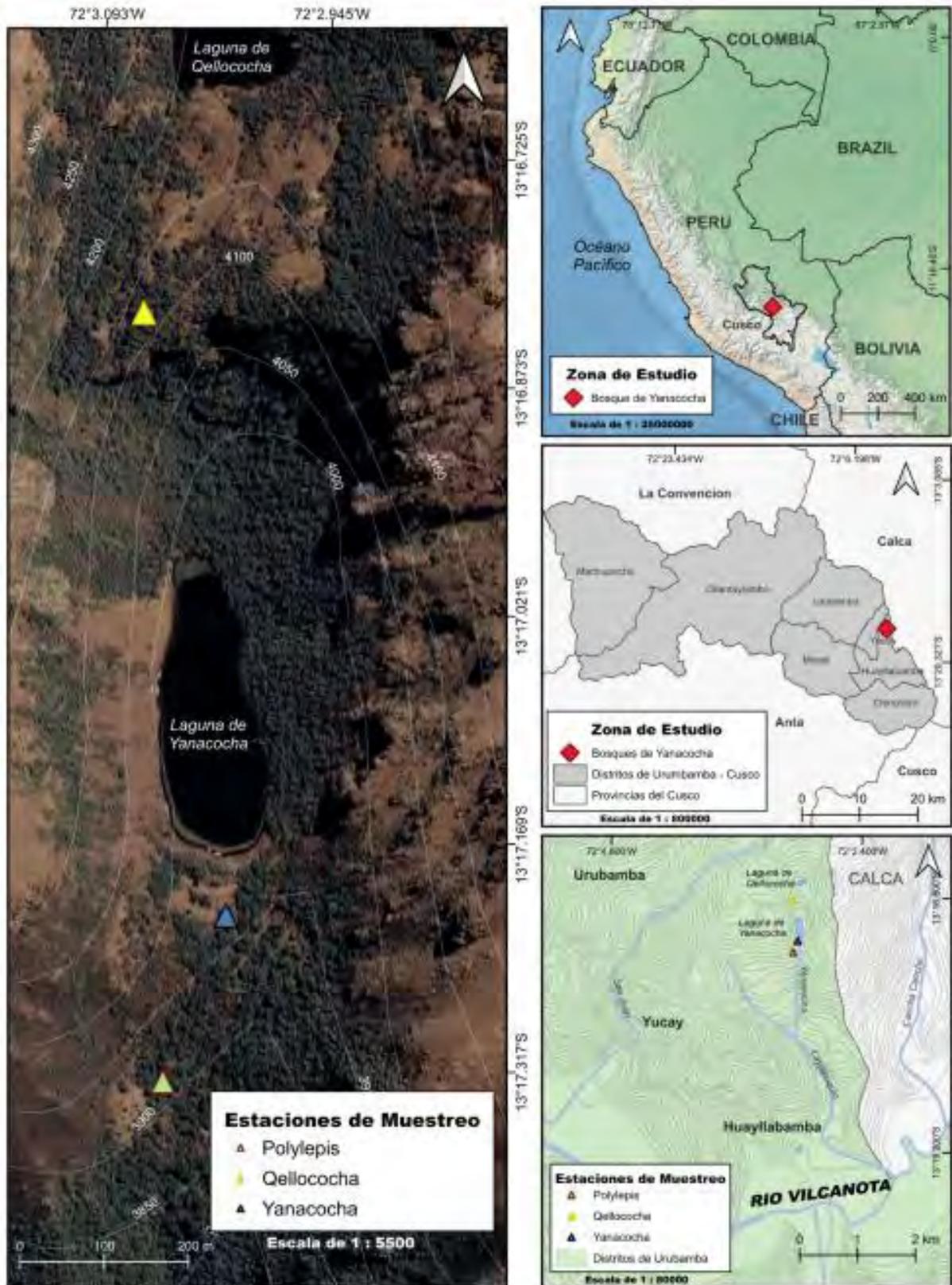


Figura N° 14: Mapa de ubicación de la zona de estudio [Mapa computarizado]. Escala variable. Cartas nacionales SIGMED - MINEDU, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Diseñado en QGIS [Software SIG]. Versión 3.24 - Tisler.

Ubicación de la estación YANA:

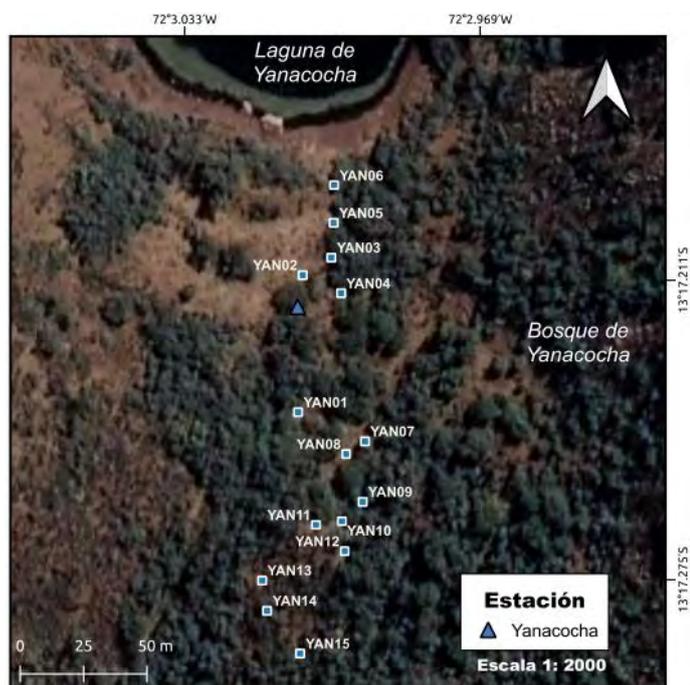


Figura N° 15: Mapa de ubicación de redes de neblina de la estación Yanacochoa [Mapa computarizado]. 1:2000. Cartas nacionales SIGMED - MINEDU, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Diseñado en QGIS [Software SIG]. Versión 3.24 - Tisler

Tabla N° 2: Ubicación de redes de neblina en la estación YANA (Y)

CÓDIGO	LONGITUD	LATITUD	ALTITUD (m)
ST02	-13.286955021	-72.050131978	3937.9
Y01	-13.287333967	-72.050126027	3943
Y02	-13.286841027	-72.050114963	3940.9
Y03	-13.28677699	-72.050012033	3941.8
Y04	-13.286903976	-72.049974985	3940.6
Y05	-13.286652016	-72.050004993	3942.9
Y06	-13.286515977	-72.050004993	3944.8
Y07	-13.287435975	-72.049880018	3939.2
Y08	-13.287481992	-72.049949002	3937.9
Y09	-13.287652982	-72.04988597	3937.7
Y10	-13.287723977	-72.049961993	3937.6
Y11	-13.287737975	-72.050056038	3936.8
Y12	-13.28783202	-72.049950007	3932.9
Y13	-13.287940985	-72.05024899	3922.6
Y14	-13.288049027	-72.050229963	3917.7
Y15	-13.288200991	-72.050108006	3914.2

Ubicación de la estación POLY:

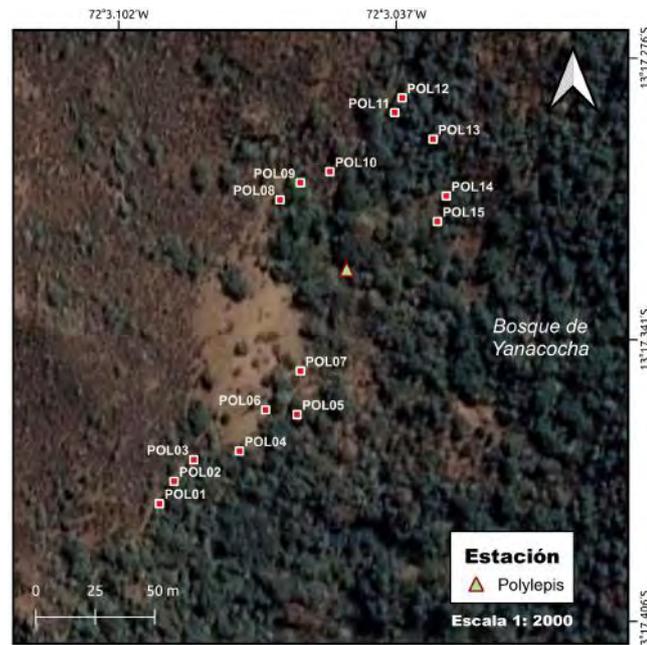


Figura N° 16: Mapa de ubicación de redes de neblina de la estación POLY [Mapa computarizado]. 1:2000. Cartas nacionales SIGMED - MINEDU, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Diseñado en QGIS [Software SIG]. Versión 3.24 - Tisler

Tabla N° 3: Ubicación de redes de neblina en la estación POLY (P)

CÓDIGO	LONGITUD	LATITUD	ALTITUD (m)
ST01	-13.287675203	-72.050518428	3854.5
P01	-13.289664974	-72.051519016	3855.5
P02	-13.289578976	-72.051463025	3856.6
P03	-13.289494989	-72.051388007	3858.2
P04	-13.289460037	-72.051210981	3854.8
P05	-13.289317964	-72.050989028	3858.3
P06	-13.289301032	-72.051110985	3859.2
P07	-13.289150996	-72.050977964	3860.8
P08	-13.28849704	-72.051064968	3880.1
P09	-13.288430991	-72.050987016	3881.6
P10	-13.288386986	-72.050873023	3884.1
P11	-13.288157992	-72.050623996	3889.7
P12	-13.288100995	-72.050596001	3891.5
P13	-13.288257988	-72.05047396	3888.5
P14	-13.288474996	-72.050419981	3881
P15	-13.28857298	-72.050453005	3878.6

Ubicación de la estación QUELLO:

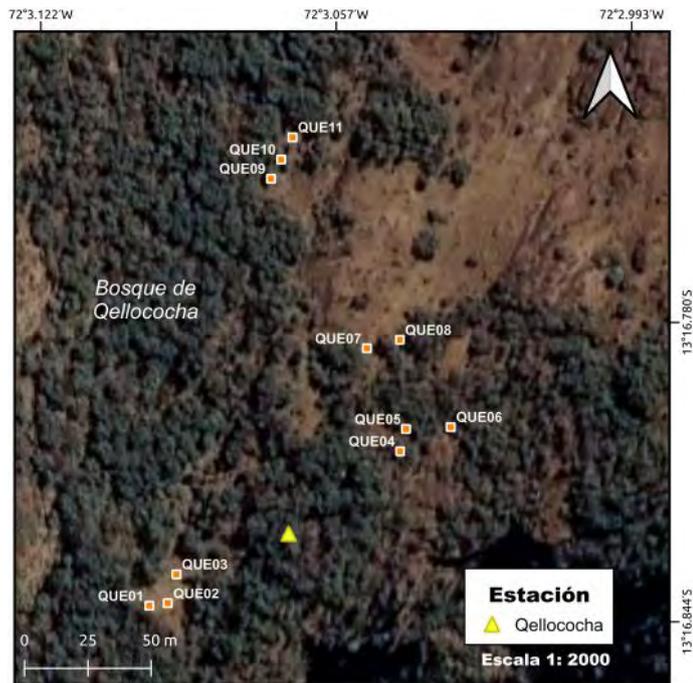


Figura N° 17: Mapa de ubicación de redes de neblina de la estación QUELLO [Mapa computarizado]. 1:2000. Cartas nacionales SIGMED - MINEDU, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Diseñado en QGIS [Software SIG]. Versión 3.24 - Tisler

Tabla N° 4: Ubicación de redes de neblina en la estación QUELLO (Q)

CÓDIGO	LONGITUD	LATITUD	ALTITUD (m)
STA03	-13.280374886	-72.051445956	4085.2
Q01	-13.280704971	-72.051613983	4086.2
Q02	-13.280694997	-72.051547011	4086.7
Q03	-13.280589972	-72.051517004	4089.3
Q04	-13.280138019	-72.050705971	4111.3
Q05	-13.280057972	-72.050685016	4110.6
Q06	-13.280049004	-72.050522994	4112.9
Q07	-13.279768964	-72.050832035	4112.3
Q08	-13.279737029	-72.050712006	4113.6
Q09	-13.279162031	-72.05118902	4122
Q10	-13.279092964	-72.051152978	4124.5
Q11	-13.279013	-72.051112996	4126.5

2.2 MATERIALES

2.2.1 Material biológico

- Picaflores del género *Aglaeactis* (captura temporal, sin sacrificio)
- Tejido sanguíneo (0.2 -0.3 mL, aproximadamente 2 gotas) por individuo.
- 2 Plumas rectrices por individuo.

2.2.2 Materiales de campo - monitoreo ecológico

- 10 Redes de Neblina (12 × 2.5 × 0.038 m).
- 40 Tubos de Aluminio (para la instalación de Redes de Neblina).
- 2 kg de Driza.
- 15 Bolsas de Tela.
- Equipo de Anillamiento (1 Vernier, 1 Balanza de Bolsillo, 1 Regla especial para medir alas, ficha de anillamiento).
- 1 par de binoculares 10x42.
- Guía de identificación "Aves del Perú".
- GPS Garmin 64s.
- Cámara fotográfica.

2.2.3 Materiales para colecta de muestras genéticas

- Algodón estéril
- Etanol 70° (Portugal®)
- Capilares estériles, sin heparina (VITREX®)
- Aguja Hipodérmica número 20 (ALMEDP®)
- 12 Carta de colección de muestras de sangre (Macherey Nagel®)
- 100 unidades de sobres de papel bond (12x19cm)
- Sílica Gel (Genérica)
- Polvo comercial coagulante para gallinas (Quick Stop®)
- Bolsas hermeticas (Ziploc®)

2.2.4 Material de laboratorio

- Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific®)
- Vortex (ThermoScientific®)
- Termociclador - Applied Biosystems Pro-Flex PCR System (Thermo Fisher Scientific®)
- Cubeta de electroforesis 80 V - PowerPac™ 300 (BioRad®)

2.2.5 Reactivos e insumos

- Proteinasa K (ThermoScientific®)
- dNTP (ThermoScientific®)
- Proteinasa K (ThermoScientific®)
- dNTP (ThermoScientific®)
- Kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)
- 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™)
- GelRed™ (Biotium®)
- Gel de Agarosa (Avati®)
- Tris NH₄Cl
- RNAasa 10 mg/ml (ThermoScientific®)
- Solución Salina al 0.85 %
- Solución de Lisis Celular de Madisen
- Fenol : Cloroformo : Alcohol Isoamílico (25:24:1)
- Cloroformo : Alcohol Isoamílico (24:1)
- Acetato de Amonio 7.5 M
- High TE (10 ml Tris HCl pH 8.0 1 M y 8 ml EDTA 0.5 M)
- Low TE (0.5 ml Tris HCl pH 8.0 1 M y 0.4 ml EDTA 0.5 M)

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 Captura temporal de aves

El monitoreo ecológico fue llevado a cabo según el manual de Anillamiento de Picaflores de Norte América (Russell & Russell, 2019). En el periodo de estudio se realizó entre los meses de Agosto a Diciembre de los años 2016 -2019, bajo los permisos de investigación otorgados por SERFOR (adjunto en ANEXOS).

El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. **Definición de estaciones de estudio:** Haciendo uso de trampas de redes de neblina, se ubicaron en 3 estaciones de estudio: POLY, YANA y QUELLO. La ubicación estuvo de acuerdo a la composición floral adyacente, la incidencia solar y por observación previa con una distancia de 100 metros cercanos a los parches de *Polylepis*, dividiendo cada estación en 10 a 15 puntos de monitoreo, con esfuerzo de captura: 10 horas (red/mes) con un total de 50 horas (red/mes) durante todo el proyecto de investigación.
2. **Revisión de trampas y colecta de individuos:** Una vez abiertas las trampas, se revisaron cada 20 – 30 minutos, con mayor esfuerzo durante las 10:00 – 13:00 horas por el aumento de radiación solar. En cada revisión se recogieron las aves que cayeron en las redes usando el método de agarre de cuerpo completo (del termino en ingles: *body grasp technique* como se cita en Russell & Russell (2019) y Johnson & Wolfe (2017), se almacenaron en bolsas de tela oscuras y se trasladaron a la estación para su revisión.
3. **Identificación de aves capturadas:** Las aves capturadas fueron revisadas en orden de llegada, priorizando a picaflores por su alto metabolismo. Las aves fueron identificadas con el libro de Aves del Perú (Schulenberg, Stotz, Lane, O'Neill, & Parker III, 2010) y posteriormente clasificadas de acuerdo con el sistema taxonómico actual (Plenge, 2022).

Según Schulenberg et al. (2010) y Schuchmann (1985) se identificó a la aves haciendo uso de las diferencias taxonómicas fenotípicas relacionadas al color y la distribución de las plumas de los individuos. En el caso de *A. castelnaudii* siempre presenta mechones de plumas blancas en la zona pectoral , con abdomen y cola rojiza oscuro. En cambio, *A. cupripennis* tiene un plumaje mas sencillo con mechones pectorales de un matiz rojizo claro, así como la iridiscencia notable de una gama de colores parecidos a un arco iris en la espalda.

4. **Obtención de datos morfométricos:** Se registraron las siguientes datos, según los protocolos estandarizados de la guía de anillamiento de picaflores

de Norte América (Russell & Russell, 2019):

- a) Fecha y Hora de captura (formato dd/mm/aaaa y 24h)
- b) Nombre de la especie
- c) Grasa corporal
- d) Estrías o corrugaciones del pico (conocidas también como estrías), solo en picaflores
- e) Sexo (en general: macho, hembra. Para picaflores en objetivo: desconocido)
- f) valores categóricos (reproductivos)
 - Parches de cría (ausencia, pérdida de plumas, o si se encuentra vascularizada, arrugada, en muda, no visible o desconocida)
 - Protuberancia cloacal (ninguna, pequeña, mediana, grande, no visible o desconocida)
- g) Valores numéricos
 - Culmen expuesto
 - Longitud del pico
 - Ancho del pico
 - Peso del ave
 - Longitud del ala (también conocida como cordura alar)
 - Longitud de la cola (plumas rectrices)
 - Longitud del tarso

Una vez terminada la revisión, si el ave no presentaba síntomas de estrés o agotamiento se procedía con la toma de muestras para el análisis molecular, caso contrario se liberaba el ave. Algunos de estos datos morfométricos fueron usados como indicadores de dimorfismo sexual en estudios previos, de estos resaltan el peso, la longitud de la cola y el tamaño del pico (como se cita en Jensen et al. (2003)).

5. **Revisión de patrones de muda y estimación de edad en aves:** A la par de la toma de datos morfométricos, se estimó la edad de las aves estudiadas a través del uso del Sistema W-R-P (Wolfe et al., 2010), haciendo uso de las estrías del pico y patrones de coloración o envejecimiento en el plumaje de los picaflores. Fue importante la toma de esos datos para ayudar a comprender algunos factores ecológicos en el grupo de los picaflores (Trochilidae) donde requieren del 40 % de su metabolismo basal para poder concluir un ciclo de muda (Shibuya et al., 2018). Es necesario remarcar algunas características de la familia Trochilidae (picaflores) tal como se indica en Johnson & Wolfe (2017).

-
- La presencia de un patrón de muda con sustitución de las plumas en sentido proximal a distal.
 - La presencia de solo 5 pares de plumas rectrices (cola). Denotadas de adentro hacia afuera y por el lado en el que se encuentra en base a la orientación del cuerpo ave.
6. **Colecta de muestras para estudios genéticos:** Descrito ampliamente en la siguiente sección 2.3.1.1. (Colecta de muestras para extracción de ADN en tejido sanguíneo y plumas).
 7. **Liberación del individuo:** Si el individuo no presento ningún síntoma de estrés, se liberó y se continuo con el siguiente individuo.

2.3.1.1 Colecta de muestras para extracción de ADN en tejido sanguíneo y plumas

La colecta se realizó durante la colecta temporal de aves, siguiendo protocolos de bioseguridad (ANEXO A) para evitar la contaminación cruzada y proteger al investigador.

1. En plumas:

Este tipo de colecta es considerado como no invasivo y no es letal para los individuos (Çakmak et al., 2017; Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006; Harvey et al., 2006) y es usado muchas veces cuando se hacen estudios de especies amenazadas o elusivas, pero teniendo de contra parte que pueden contener muy poca calidad y cantidad de ADN para analizar (Horváth, Martínez-Cruz, Negro, Kalmár, & Godoy, 2005).

Se colectó las plumas rectrices externas (R5R y R5L) por arranque, fueron almacenadas en sobres de papel bond y guardadas en un lugar oscuro y seco hasta su uso. Se utilizó silica en gel para garantizar la humedad nula en el sobre de papel, lo que podría provocar que hongos y bacterias proliferen.

2. En tejido sanguíneo:

Este tipo de colecta puede ser letal o amenazar con la integridad de las aves, por alguna lesión o estrés, siendo uno de los métodos más usado para estudios genéticos en aves según Çakmak et al. (2017), debido a que la tejido sanguíneo de las aves poseen eritrocitos nucleados que es utilizado como principal fuente de ADN (Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

La colecta se realizó por una punción con una aguja hipodérmica número 20 en la vena tarsal (pata), debido al tamaño pequeño de los picafloros (Dubiec &

Zagalska-Neubauer, 2006), considerando las medidas de bioseguridad descritas en el ANEXO A.

Se colectó el tejido sanguíneo haciendo uso de un tubo capilar estéril y sin heparina, colectando menos de la mitad del capilar (aproximadamente 1 gota (menos de 50 µl) y se impregnó en una carta de colecta de muestras sanguíneas Macherey Nagel®, estas son fabricadas con un tratamiento previo con una solución conservadora, tampon de EDTA y que frecuentemente es usado para análisis forenses humanos (Hagadorn et al., 2016; Shibuya et al., 2018).

Después de cada toma de muestra, se alimento al picaflor agua azucarada, como se indica en la Guía de Anillamiento de Picaflores (Russell & Russell, 2019). Luego de este proceso, el individuo quedó en observación hasta que se compruebe que puede reincorporarse a su entorno y posteriormente fue liberado.

A pesar de que la colecta de muestras descritas previamente eran prioridad de este trabajo de investigación, se supervisó constantemente la presencia de signos de estrés, en el caso el animal se vea afectado por el proceso, este fue liberado sin tomar estas muestras. Ningún animal fue sacrificado ni murió durante este proyecto de investigación.

3. Almacenamiento de muestras:

Las muestras fueron almacenadas en el **Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco** durante los meses de trabajo de campo, siendo almacenados a temperatura ambiente, en bolsas herméticas Ziploc® con sobres de silica en gel para garantizar que la humedad sea mínima durante el tiempo.

4. Procesamiento de muestras:

Las muestras fueron procesadas en el **Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular - Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil**, a través de una pasantía de investigación coordinada durante el proceso de este trabajo de investigación.

2.3.2 Preparación previa a la extracción de ADN

Este procedimiento se realiza de manera mecánica, recuperando el ADN dependiendo de su origen, se describe a continuación:

1. Para muestras de plumas:

Se realizaron cortes usando unas tijeras estériles independientes, priorizando el posible coagulo de tejido sanguíneo del ombligo superior del cálamo (3 a

5mm de largo del contorno final de la pluma mudada, como se cita en Horváth et al. (2005), en la figura 18. También se usaron los agregados de la punta basal para poder aprovechar el material genético que podría encontrarse ahí (Begović et al., 2017; Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006).

Finalizado este proceso mecánico, se utilizaron tampones leves para limpiar y posteriormente tratar la muestra para recuperar el ADN disponible y proceder con su extracción.

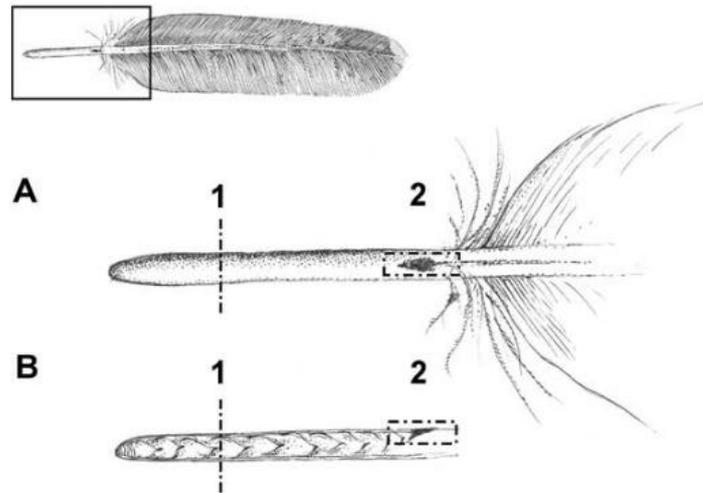


Figura N° 18: (A) Detalles de la vista posterior de la base de la pluma, y (B) Sección longitudinal a través del cálamo de la pluma. Dos áreas de muestreo diferentes son mostradas: (1) Punta basal del cálamo y (2) coágulo del tejido sanguíneo del ombligo superior Horváth et al. (2005)

2. Para muestras de tejido sanguíneo:

Se realizaron cortes pequeños con tijeras estériles independientes al círculo marcado dentro de la carta de colección de muestras de tejido sanguíneo (Macherey Nagel®), donde se colectaron las muestras sanguíneas. Finalizado este proceso se procedió a la extracción del ADN.

2.3.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, con medidas que garantizan la esterilidad de los materiales usados (irradiados permanentemente por luz ultravioleta) así como la seguridad pertinente para realizar experimentos con biología molecular.

Se utilizó el método de Fenol – Cloroformo (Sambrook & Russell, 2001) con modificaciones, generando diluciones finales de 50 µl para la tejido sanguíneo y 20 µl para plumas, a través de las siguientes etapas:

1. **Etapa de Limpieza y desintegración por lisis:** haciendo uso de solución de lisis de Madisen, tampones de soluciones salinas y Proteinasa K.
2. **Etapa de re-suspensión de ADN y precipitación:** haciendo uso de Fenol: Cloroformo:Alcohol isoamil (25:24:1) y Acetato de Amonio 7.5 M.
3. **Etapa de recuperación y dilución del DNA:** haciendo uso de etanol a 4°C y TE.

El protocolo ampliado puede apreciarse en el ANEXO B. La calidad del ADN aislado se midió independientemente por espectrofotometría (NanoDrop™ 2000 spectrophotometers – ThermoScientific).

2.3.3.1 Amplificación por PCR y Electroforésis

La amplificación se realizó en el LBEM - UFMG, Brasil. Este se llevo a cabo utilizando el kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), con las especificaciones descritas en la tabla 5.

Tabla N° 5: Concentración de stock y final de la PCR con Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™)

Reactivo	Concentración Stock	Concentración usada
ddH ₂ O	-	-
Tampón de reacción	10 X	1 X
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
dNTPs	2,5 mM	200 µM
Primer Forward	25 µM	0,5 µM
Primer Reverse	25 µM	0,5 µM
Taq Polimerasa	5 U/µL	0,5 U/microtubo
DNA	40 ng/ µL	-

Para comparar la eficiencia de los cebadores descritos en la bibliografía, se utilizó 3 pares de cebadores específicos, descritos en la tabla 6.

Tabla N° 6: Cebadores usados en PCR

CEBADORES	SECUENCIAS
CHD1F ¹	5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3'
CHD1R ¹	5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3'
2550F ²	5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'
2718R ²	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'
P2 (F) ³	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'
P8 (R) ³	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'

Nota: ¹ (Lee et al., 2010), ² (Fridolfsson & Ellegren, 1999), ³ (Griffiths et al., 1998).

El proceso se llevó a cabo en un termociclador de Applied Biosystems ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific), utilizando un esquema de PCR Touchdown modificado de Hernández-Olicón et al. (2020), como se describe a continuación en la figura 19 y en la tabla 7.

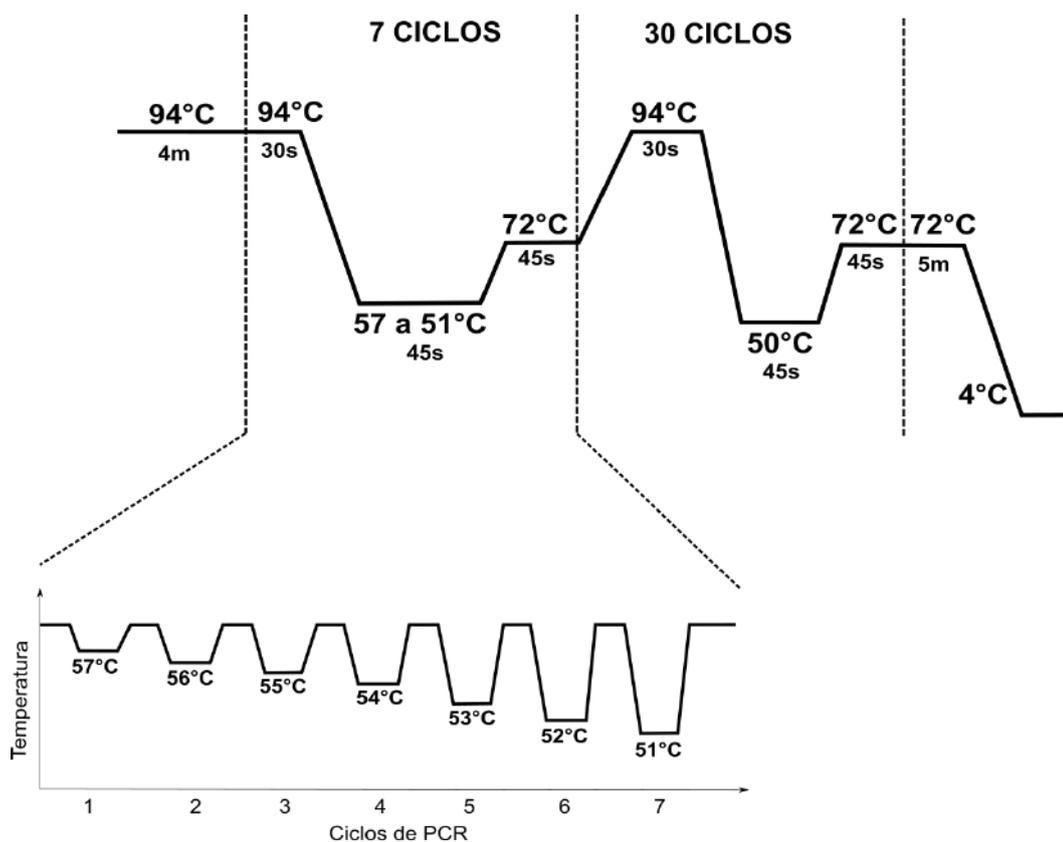


Figura N° 19: PCR Touchdown, gradiente de reducción de 1°C / ciclo

Tabla N° 7: Protocolo PCR Touchdown modificado

Etapas	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94 °C	4 minutos
Denaturación	94 °C	30 segundos
Anillamiento	57-51 °C	45 segundos
Extensión	72 °C	45 segundos
Repetir por 7 ciclos		
Denaturación	94 °C	30 segundos
Anillamiento	50 °C	45 segundos
Extensión	72 °C	45 segundos
Repetir por 30 ciclos		
Extensión final	72 °C	5 minutos

2.3.4 Visualización de Amplicones

La prueba de la calidad del ADN se realizó usando gel de agarosa a 2% (Avanti) a una tensión de 80 Voltios (PowerPac™ 300, Bio-Rad®) con tampón TAE (tris(hidroximetil)aminometano, ácido acético glacial y EDTA) al 0,5 X, durante 70 minutos. Se usó como comparador un marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™), colorados con tampón de muestras 6x (0,25% de Azul de bromofenol, 0,26% de Xilenocianol e glicerol 30%) con GelRed™ (Biotium), diluído 10.000x en agua.

Mediante la intensidad de la luz de las bandas de ADN en el gel observadas en un transiluminador UV se pueden identificar a las hembras cuando se observaban 2 fragmentos y en el caso de los machos se observó solo 1 (Cerit & Avanus, 2007; Dawson et al., 2013; Griffiths et al., 1998; Khaerunnisa et al., 2013).

2.3.5 Secuenciamiento de CHD-Z

Las muestras fueron secuenciadas en el LBEM - UFMG, Brasil. Para lo cual se preparó los amplicones de los individuos machos (CHD-1Z) de ambas especies, a través de las etapas que se describen a continuación:

1. Purificación de amplicones con protocolo de precipitación de PEG (Polietilenglicol) al 20% y etanol congelado, se cargaron los amplicones al cassette de secuenciamiento.
2. Precipitación con Hi-Di Formamida (ThermoScientific) y secuenciamiento en el secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

2.3.6 Análisis bioinformático

Se utilizó el software MEGAX (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) y el paquete de algoritmos de alineamiento genético T-Coffee (Di Tommaso et al., 2011).

2.3.7 Análisis prueba de hipótesis entre el sexado molecular y datos morfo-métricos

En el caso de los 20 individuos se realizó un análisis de prueba de hipótesis haciendo uso de la prueba de Mann–Whitney U.

Esta es una prueba no paramétrica de la hipótesis nula de que es igualmente probable que un valor seleccionado aleatoriamente de una muestra sea menor o mayor que un valor seleccionado aleatoriamente de una segunda muestra. Se asume que las dos muestras son independientes. El tamaño del efecto del lenguaje común es la proporción de pares donde x es mayor que y (como se cita en (Vallat, 2018)).

$$CL = P(XZY) + 5 * P(X = Y)$$

Donde:

- CL es el lenguaje común (CL en ingles).
- X y Y muestras independientes.

Para el análisis estadístico y de organización de utilizó el paquete pinguin - versión 0.5.2 (Vallat, 2018) para organizar la información ecológica colectada y para el análisis de hipótesis con los datos numéricos. Para la visualización obtenida, los paquetes seaborn - versión 0.11.2 (Waskom, 2021) y matplotlib - versión 3.5.1 (Thomas et al., 2021) del lenguaje de programación Python - versión 3.9.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectó datos de 81 individuos: 55 individuos de la especie *A. castelnaudii* y 26 individuos de la especie *A. cupripennis*. El sexo de los individuos de los que no se tomaron muestras de tejido sanguíneo o plumas fueron categorizadas como "No determinado".

En el caso de los 20 individuos de los que se colectaron muestras de tejido sanguíneo y plumas a través de PCR y la amplificación del gen CHD-1 se se identificó el sexo de 15 individuos de la especie *A. castelnaudii* (3 hembras y 12 machos) y 5 individuos de la especie *A. cupripennis* (1 hembra y 4 machos) como se ilustra en la figura 20.

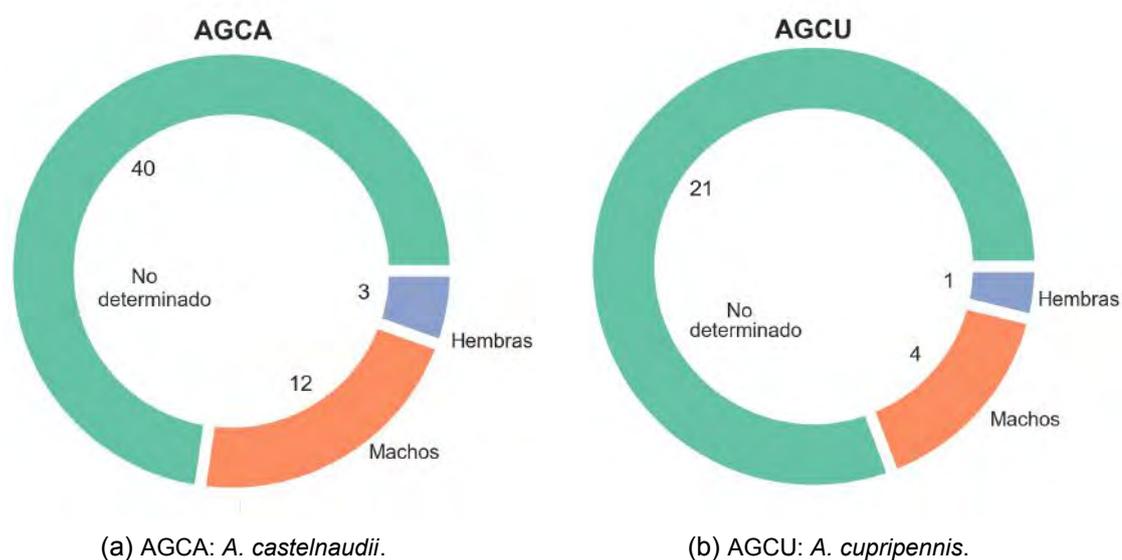


Figura N° 20: Resultados del sexado molecular y datos de sexo no determinado colectados

3.1 Morfometría de picaflores del género *Aglaeactis*

Se presentan los resultados obtenidos por tipo de datos morfométricos, pudiendo ser cualitativos (frecuencia) y numéricos:

3.1. Datos cualitativos:

Fueron enfatizados para evaluar si influían en el sexado molecular obtenido.

3.1.1. Datos reproductivo:

Aquí se listan la grasa, el parche de protuberancia (BP) y el parche de incubación (CP), en la tabla 8 se presenta los resultado de los individuos colectados.

Tabla N° 8: Datos cualitativos de carácter reproductivo

Índice	Especies		
	<i>A. castelnaudii</i>	<i>A. cupripennis</i>	
GRASA	0 - Nulo	33	16
	1 - Bajo	17	10
	2 - Leve	4	0
	3 - Moderado	1	0
	4 - Abundante	0	0
BP	0 - Nulo	31	19
	1 - Leve	11	6
	2 - Hinchado	6	1
	3 - Enervado	5	0
	4 - Arrugado	2	0
CP	0 - Nulo	4	5
	1 - Leve	17	9
	2 - Moderado	23	8
	3 - Notorio	11	4
	4 - Hinchado	0	0

Nota: Para ver mas detalles revisar la sección «Morfometría de picaflor» del Marco Conceptual)

Se observa que la mayoría de individuos en estudio presentaban una baja (valores 0 y 1) cantidad de grasa durante el muestreo. En el caso de el parche de protuberancia (BP) los resultados fueron variados, siendo resaltante que al menos 13 individuos de *A. castelnaudii* se encontraban posiblemente con un proceso reproductivo activo (por ejemplo la incubación de huevos). Finalmente en el caso de la protuberancia cloacal, la mayoría de individuos (44 *A. castelnaudii* y 12 *A. cupripennis*) presentaban esta estructura moderada o notoria.

3.1.2. Datos de muda:

Aquí se listan: la muda corporal, muda de alas de vuelo y el desgaste de las plumas de vuelo; en la tabla 9 se presentan los resultado de los individuos colectados.

Tabla N° 9: Datos cualitativos de muda

	Muda	Especies	
		<i>A. castelnaudii</i>	<i>A. cupripennis</i>
Cuerpo	0 - Nula	28	11
	1 - Leve	11	7
	2 - Leva Moderada	12	1
	3 - Moderada	4	3
	4 - Abundante	0	3
	5- Todo el cuerpo	0	1
Alas de Vuelo	Ninguna	49	22
	Simetrica	5	3
	Asimetrica	1	1
Desgaste	0 - Muy gastadas	2	0
	1 - Moderada	6	0
	2 - Leve Moderada	5	0
	3 - Leve	6	5
	4 - Sin puntas	13	10
	5 - Nuevas	23	8

3.1.3. Datos de estimación de edad:

En el caso de los datos de porcentaje de estrías colectados, los resultados se presentan la tabla 10.

Tabla N° 10: Datos de porcentaje de estrías

Estadio	Adultos			Juveniles
	0-10%	10-25%	25-75%	75-100%
<i>A. castelnaudii</i>	26	14	4	9
<i>A. cupripennis</i>	5	2	9	10

Se uso el porcentaje de estrías para poder definir el estadio del ave basado en estas estructuras observadas. Con esta información se utilizó todos los parámetros cualitativos expuestos para estimar la edad de las aves haciendo uso del sistema de

WRP. Para esto se resaltó el porcentaje de estrías, la muda activa en alas de vuelo y cuerpo, finalmente el desgaste y algún posible patrón reproductivo. Se presenta los datos obtenidos en la figura 21, donde se puede observar que la mayoría de aves se encontraban después del primer ciclo de vida (adultos de aproximadamente un año) seguido de algunos individuos que se encontraban en un estadio juvenil.

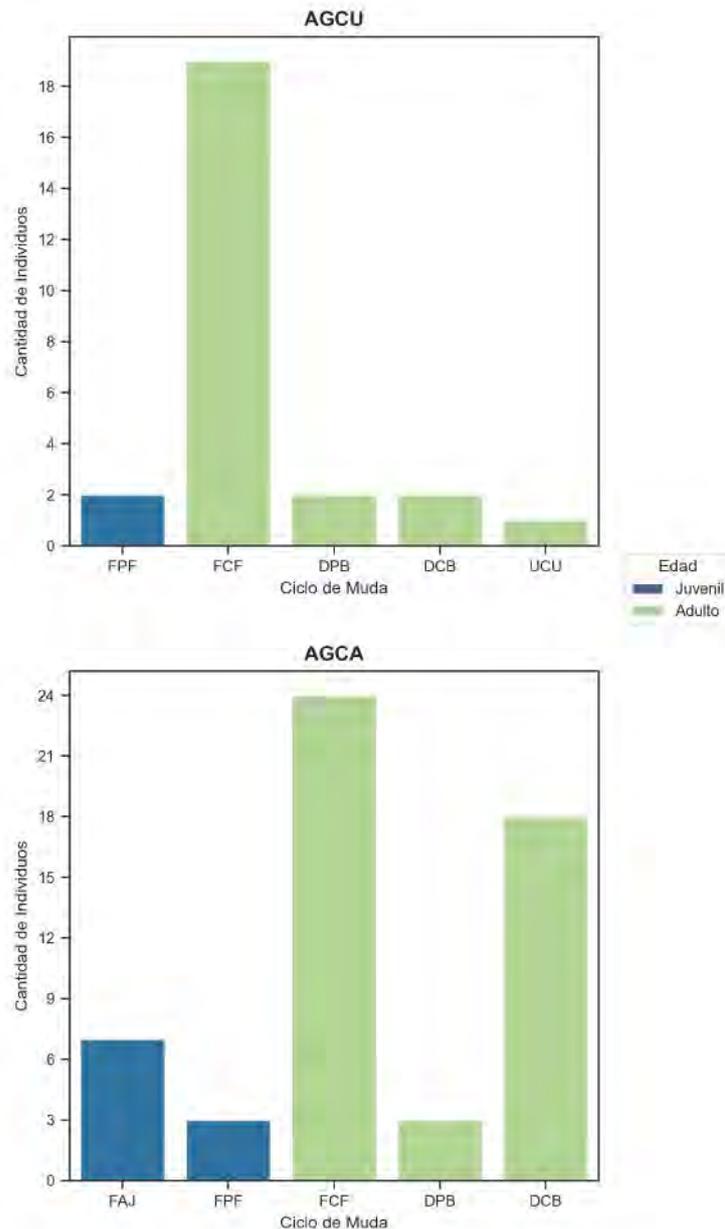


Figura N° 21: Ciclo de muda y edad estimada para individuos de *A. cupripennis* y *A. castelnaudii*, **Nota.** **FAJ:** Polluelo, Primera muda juvenil, **FPF:** Juvenil, Primer ciclo de muda preformativo, **FCF:** Juvenil (casi adulto), Primer ciclo formativo, **DPB:** Adulto, Ciclo prebásico definitivo, **DCB:** Adulto, Ciclo básico definitivo, **UCU:** Adulto, Ciclo prebasico definitivo desconocido acorde al sistema WRP (Wolfe et al., 2010).

3.2. Datos Numéricos:

Los datos numéricos colectados fueron: cordura alar (ala), largo de la cola en la rectriz más larga, medida del pico a la narina, el ancho del culmen al nivel de las narinas y el peso del cuerpo, para evaluar si estas podrían ser replicados en campo para ser usadas en la identificación del sexo de manera mecánica.

3.2.1. Para *Aglaeactis castelnaudii*:

Los datos morfométricos numéricos utilizados fueron segmentados por el sexo del individuo identificado mediante ensayos de PCR y el gen CHD-1. Las medidas morfométricas se presentan los valores promedio y márgenes de variación (desviación estándar) en la tabla 11.

Tabla N° 11: Comparación morfométrica por sexo en *A. castelnaudii*

ESPECIES	MEDIDAS	MACHOS	HEMBRAS
<i>A. castelnaudii</i>	Ala	73.5 ± 4.3 (11)	73 ± 3.5 (3)
	Cola	48.1 ± 1.6 (12)	49 ± 2 (3)
	Narinas	19.1 ± 0.7 (12)	19 ± 0.5 (3)
	Culmen ancho	2.7 ± 0.3 (12)	2.9 ± 0.3 (3)
	Tarso	7.0 ± 0.4 (12)	7.3 ± 0.1 (3)
	Peso	6.8 ± 0.5 (11)	7.1 ± 0.4 (3)

Nota. Promedio en mm ± desviación estándar (cantidad de individuos). En individuos que tenían las ala en muda activa, no se tomó la medida. En el caso del peso, algunos individuos escaparon antes de la toma de datos o se encontraban aparentemente estresados y fueron liberados.

De igual manera en el caso de individuos con sexo desconocido, se obtuvo los siguientes promedios junto a su escala de error presentados en la tabla 12.

Tabla N° 12: Comparación morfométrica para especies *A. castelnaudii* con sexo no determinado (ND).

ESPECIE	Ala	Cola	Narinas	Culmen	Tarso	Peso
<i>A. castelnaudii</i>	72.9 ± 4.3 (40)	48.3 ± 4.6 (39)	18.3 ± 1.7 (40)	3.0 ± 0.4 (40)	5.9 ± 0.7 (40)	6.9 ± 0.3 (38)

Nota. Promedio en mm ± desviación estándar, (N) cantidad de individuos

En la serie de imágenes (figura 22), se observan a vista frontal y posterior, así como un individuo adulto de la especie *A. castelnaudii*.



(a) Vista frontal de *A. castelnaudii*



(b) Coloración en espalda de *A. castelnaudii*



(c) Espalda y Ala de *A. castelnaudii*



(d) Plumas rectrices de *A. castelnaudii*



(e) Vista dorsal de *A. castelnaudii*



(f) Vista de juvenil (inferior-izquierda) y adulto.

Figura N° 22: Fotografías de *A. castelnaudii*

3.2.2. Para *Aglaeactis cupripennis*:

Se realizó el mismo proceso de tratamiento de datos que en la sección anterior, se consideró la segmentación de los datos morfométricos por el sexo del individuo identificado mediante ensayos de PCR y el gen CHD-1. Las medidas morfométricas se presentan en valores promedio y márgenes de variación (desviación estándar) en la tabla 13 y para los individuos de sexo desconocido en la tabla 14.

Tabla N° 13: Comparación morfométrica en *A. cupripennis*

ESPECIES	MEDIDAS	MACHOS	HEMBRAS
<i>A. cupripennis</i>	Ala	82.2 ± 4.3 (4)	76.0 ± 0 (1)
	Cola	50.2 ± 2.4 (4)	47.0 ± 0 (1)
	Narina	17.4 ± 1.5 (4)	16.2 ± 0 (1)
	Culmen ancho	2.8 ± 0.5 (4)	2.4 ± 0 (1)
	Tarso	6.8 ± 0.7 (4)	6.4 ± 0 (1)
	Peso	7.3 ± 0.2 (4)	6.3 ± 0 (1)

Nota: Promedio en mm ± desviación estándar (cantidad de individuos)

Tabla N° 14: Comparación morfométrica para especies *A. cupripennis* con sexo no determinado (ND).

ESPECIE	Ala	Cola	Narinas	Culmen	Tarso	Peso
<i>A. cupripennis</i>	78.7 ± 4.4 (21)	47.9 ± 4.1 (21)	17.0 ± 1 (21)	2.8 ± 0.4 (21)	5.9 ± 0.8 (18)	6.9 ± 0.4 (21)

Nota. Promedio en mm ± desviación estándar, (N) cantidad de individuos

En la serie de imágenes (figura 23), se observan a vista frontal y posterior, así como un individuo adulto de la especie *A. cupripennis*.



(a) Vista frontal de *A. cupripennis*



(b) Coloración en espalda de *A. cupripennis*



(c) Adulto de *A. cupripennis*



(d) Espalda y Ala de *A. cupripennis*



(e) Ala de *A. cupripennis*



(f) Adulto de *A. cupripennis*

Figura N° 23: Fotografías de *A. cupripennis*

3.2 Extracción de ADN (Calidad / concentración)

Dependiendo de la cantidad de muestras disponibles, se realizó la extracción de material genético en las muestras colectadas. En algunos casos, algunas muestras independientes (por individuo) generaron hasta tres unidades para extracción acorde al protocolo de extracción usado. Se utilizaron los datos producidos por el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific®).

- **En muestras de tejido sanguíneo.**

Como se observa en la tabla 15 (siguiente pagina) los datos obtenidos de la extracción de tejido sanguíneo oscilan entre 141.3 ng/μl y 4070.3 ng/μl, gráficamente se puede observar en la figura 24.

Este es un buen indicativo de la calidad obtenida (dentro de los rangos estándares de la medida de calidad 260/280 (entre 1.8 a 2.0)).

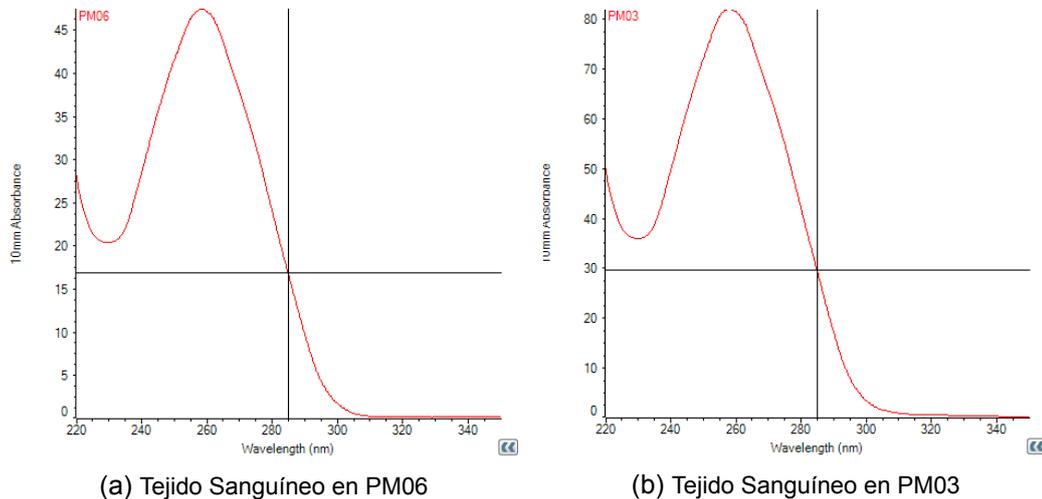


Figura N° 24: Espectrofotometría en tejido de sanguíneo. (a) *A. castelnaudii* (PM06) con concentración de ADN de 2356.7 ng/μl e índice 260/280 de 1.95 y (b) *A. cupripennis* (PM03) con concentración de ADN de 4070.3 ng/μ e índice 260/280 de 1.93.

Tabla N° 15: Datos por espectrofotometría en tejido sanguíneo

Especie	Número	Código Extracción	ADN (ng/μl)	Relación 260/280
<i>A. castelnaudii</i>	1	PM02	141.3	1.93
	2	PM04	725.3	1.93
	3	PM05	1029.8	1.95
	4	PM06	2356.7	1.95
	5	PM11	104.7	2.17
	6	PM12	1324.9	1.94
	7	PM14	1387.1	1.92
	8	PM13	903.8	1.92
	9	PM17	2534.9	1.90
	10	PM18	875.7	1.94
	11	PM21	1391.9	1.94
	12	PM22	1771.3	1.92
	13	PM24	543.8	1.94
	14	OM02	1047.7	1.95
	15	OM01	862.5	1.90
<i>A. cupripennis</i>	1	PM01	448.7	1.93
	2	PM03	4070.3	1.93
	3	PM07	258.6	1.91
	4	PM08	975.8	1.94
	5	PM15	1119.1	1.97

- **En muestras de tejido de plumas.**

Como se observa en la tabla 16 los datos obtenidos de la extracción de tejido de plumas oscilan entre 7.2 ng/μl y 74.8 ng/μl. A pesar de que las cantidades de ADN extraídas son bajas, en cuanto a calidad la mayoría se encuentra dentro del rango de 1.51 - 2.03, por lo que consecuentemente algunos se encuentran dentro de los rangos estándares de la medida 260/280 (entre 1.8 a 2.0).

Tabla N° 16: Datos por espectrofotometría en tejido de plumas

Especie	Número	Código	ADN (ng/μl)	Relación 260/280
<i>A. castelnaudii</i>	1	UM11	8,4	1,51
	2	UM23	33,4	1,51
	3	TM17	7,2	1,96
	4	TM18	33,1	1,84
	5	TM19	42	1,54
	6	RM13	13,9	1,71
	7	RM14	74,8	1,63
	8	RM15	15,9	1,66
<i>A. cupripennis</i>	1	UM12	10,7	1,71
	2	TM20	32,7	1,95
	3	TM21	35,5	1,95
	4	RM16	7,2	2,03
	5	RM17	14,4	1,86

Debido a la baja cantidad de ADN extraído en plumas, luego de varias repeticiones, se decidió recortar la cantidad de muestras de plumas debido a que el resultado no brindaban una mejora en cuanto a la cantidad y calidad del de material genético para ser usado en PCR, los resultados obtenidos por espectrofotometría se pueden observar en la figura 25.

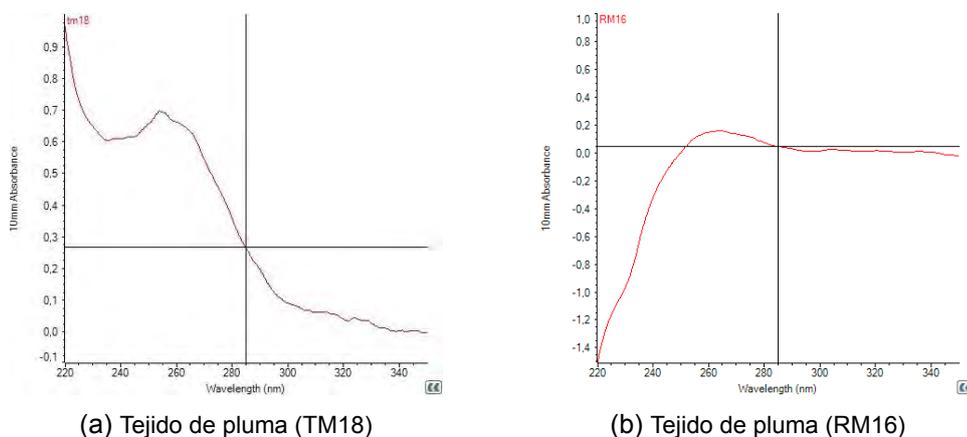


Figura N° 25: Espectrofotometría en tejido de plumas. (a) *A. castelnaudii* (TM18) con concentración de ADN de 33.1 ng/μl e índice 260/280 de 1.84 y (b) *A. cupripennis* (RM16) con concentración de ADN de 7.2 ng/μl e índice 260/280 de 2.03.

Se observó una mayor disponibilidad de material genético en muestras de tejido sanguíneo (impregnado en las cartas de colecta de Macherey Nagel®) que en plumas, consecuentemente se observó el mismo patrón en los indicadores de calidad se presentan en la tabla 17 por cada especie estudiada.

Tabla N° 17: Datos promedio de cantidad y calidad del ADN extraído

Muestra	<i>A. castelnaudii</i>		<i>A. cupripennis</i>	
	ADN (ng/μl)	260/280	ADN (ng/μ)	260/280
Tejido Sanguíneo	1133.4.53.4 (15)	1.95 (15)	1374.5 (5)	1.94 (5)
Plumas	28.6 (8)	1.67 (8)	20.1 (5)	1.9 (5)

Nota: Promedio (cantidad de individuos)

3.3 Amplificación de fragmentos del gen CHD1

En primera instancia, se efectuó ensayos de PCR para evaluar la eficiencia de los cebadores en estudio (CHDF/CHDR, P2/P8 y 2250F/2718R) para diferenciar el sexo a través del tamaño de las bandas amplificadas. En la tabla 18, se presentan los 6 ensayos de PCR realizadas con todos los cebadores en mención, el objetivo de la comparación fue detectar el cebador que permita la visualización de las bandas en agarosa al 2%.

Tabla N° 18: Ensayos de PCR y variación de temperatura de anillamiento por cada cebador en estudio

N°	Tipo de Muestras	Número de Muestras	P2/P8	2250F/2718R	CHDF/CHDR	MgCl ₂
1	Plumas	4	48	48	48	1.5
2	Plumas	5	49	48	48	1.5
3	Tejido Sanguíneo	10	49	48	48	1.5
4	Tejido Sanguíneo	10	50	49	49	3
5	Tejido Sanguíneo y Plumas	5	Touch Down - PCR			1

Proporciones fijas: (1) Tampón = 1, (2) dNTPs = 200, (3) Cebador forward = 0.5, (4) Taq Polimerasa = 0.5, (5) Cebador reverse = 0.5

La eficiencia de los cebadores depende de la taxonomía del ave en estudio, además de que las condiciones de la PCR pueden generar conflictos en cuanto al tamaño de los amplicones generados. En los fragmentos generados por P2/P8 y 2250F/2718R se obtuvo una diferencia poco apreciable debido a que el tamaño de los fragmentos generados eran de similar tamaño.

En el caso del cebador CHD-R/CHD-F los fragmentos eran notorios debido a la diferencia de tamaño de los mismos. Por lo que se utilizó para la mejora del PCR mediante múltiples repeticiones, para el mismo se realizaron pruebas modificando la temperatura de anillamiento y alternando otros reactivos adicionales como BSA y DMSO para confirmar su influencia dentro de la amplificación de los fragmentos, tal como se observa en tabla 19.

Tabla N° 19: Ensayos de PCR en el cebador CHD-R/CHD-F

N°	Tipo de Muestras	Numero de Muestras	Temperatura de Anillamiento (°C)	MgCl ₂	Otros Reactivos
1	Plumas	5	50	1.5	48
2	Tejido Sanguíneo	5	50 - 52 - 54	2	
3	Tejido Sanguíneo	10	50 - 52	2	
4	Tejido Sanguíneo	18	50	2	
5	Tejido Sanguíneo	12	55 - 56 - 57	2	
6	Tejido Sanguíneo	18	54 - 55 - 56	2	
7	Tejido Sanguíneo	323	57 - 59 - 61	2	
8	Plumas	13	57 - 59 - 61	2	
9	Tejido Sanguíneo	8	59	2	0.72 ug BSA
10	Plumas	19	59	2	0.72 ug BSA
11	Tejido Sanguíneo y plumas	27	59	2	0.72 ug BSA
12	Plumas	17	59	2	0.72 ug BSA
13	Tejido Sanguíneo y plumas	24	59	2	0.72 ug BSA
14	Plumas	22	59	2	0.72 ug BSA
15	Tejido Sanguíneo	28	59	2	0.72 ug BSA
16	Plumas	5	59	2	0.72 ug BSA
17	Plumas	5	59	2	0.72 ug BSA
18	Tejido Sanguíneo	18	TD	1	0.72 ug BSA
19	Tejido Sanguíneo	20	TD	1.5	3% DMSO
20	Tejido Sanguíneo	18	TD	1	
21	Tejido Sanguíneo	20	TD	1.5	
22	Tejido Sanguíneo y Plumas	22	TD	2	
23	Plumas	7	TD	1	
24	Plumas	7	TD	1	
25	Plumas	10	TD	1	

Proporciones: (1) Tampon = 1, (2) dNTPs = 200, (3) Cebador forward = 0.5,
(4) Taq Polimerasa = 0.5, (5) Cebador reverse = 0.5

Como se observa en las tablas 18 y 19. El protocolo de PCR Touch Down fue más efectivo para poder obtener los fragmentos del gen CHD-1 en ambos sexos de las especies en estudio.

Se estableció un control, donde se obtuvo un fragmento de aproximadamente 650 pb para machos y 2 fragmentos de aproximadamente 650 pb y 350 pb para las hembras en las especies de *A. castelnaudii* como se observa en la figura 26.

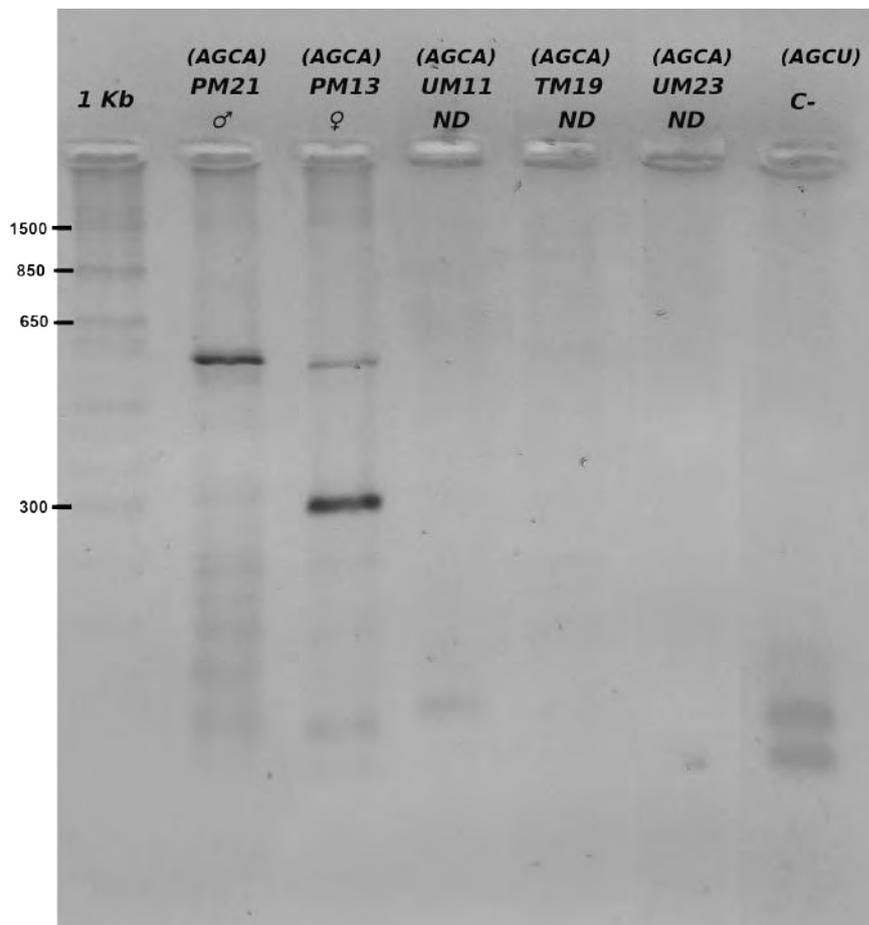


Figura N° 26: Control de macho (PM21) y hembra (PM13) para *A. castelnaudii* obtenidos por el protocolo Touch Down PCR y visualizado en agarosa 2%. PM13 y PM21: Tejido Sanguíneo; UM11, TM19, UM23: Plumas; C-: Control.

Se utilizó estos controles para poder comparar la eficiencia de los genes bajo las mismas condiciones (Touch Down PCR) como se observa en la figura 27.

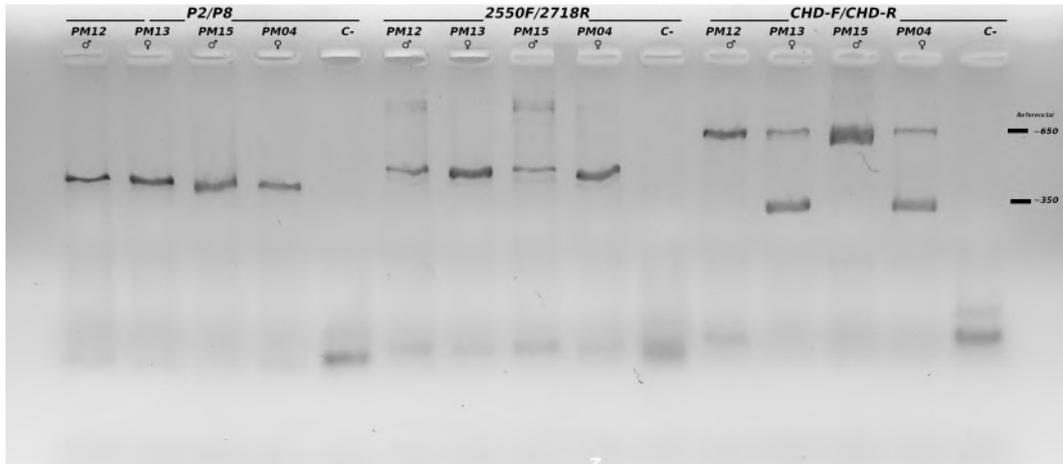


Figura N° 27: Productos de TD-PCR, en agarosa 2% de genes CHD-1 amplificado por 3 cebadores. Nota: De izquierda a derecha: P2/P8, amplificación visible pero no diferenciación de tamaño debido a la pequeña diferencia de las bandas. 2550F/2718R, amplificación eficiente pero poca diferenciación entre bandas. CHD-F/CHD-R, amplificación y diferenciación de bandas eficiente para el sexaje molecular: En los carriles PM13 y PM04: 2 bandas, hembras de la especie *A. castelnaudii*, en el carril PM12 y PM15: 1 banda, machos de las especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* respectivamente. C-: Control.

Utilizando como patrón de las muestras amplificadas en la figura 26, se procedió a hacer repeticiones de las pruebas de PCR tal como se observa en las tablas 20 (para *A. castelnaudii*) y la tabla 21 para *A. cupripennis*.

Es así que se logró diferenciar 12 machos y 3 hembras para *A. castelnaudii* y 4 machos y 1 hembra en *A. cupripennis*, en ambos casos con un fragmento de aproximadamente 650 pb para machos y 2 fragmentos, uno de aproximadamente 650 pb y 350 pb como se aprecia en las figuras 28 y 29.

Tabla N° 20: Datos de amplificación por PCR del gen CHD-1 en *A. castelnaudii*

	Cod Ext	Muestra	N	A	F	M	Sexo Mol
1	PM02	Sangre		3		9	M
2	PM04	Sangre		2	10		F
	OM08	Plumas	3				ND
3	PM05	Sangre		3		7	M
	OM07	Plumas	3				ND
4	PM06	Sangre		3		8	M
	OM08	Plumas	3				ND
5	PM11	Sangre				6	M
	OM10	Plumas	3				ND
6	PM12	Sangre				7	M
	OM13	Plumas	3				ND
7	PM13	Sangre	1			16	F
	OM15	Plumas	1		1		
8	PM14	Sangre				6	M
	OM14	Plumas	3				ND
9	PM17	Sangre	1			5	M
	OM16	Plumas	2				ND
10	PM18	Sangre	1			6	M
	PM19	Sangre	1			2	
	OM18	Plumas	3				ND
11	PM20	Sangre	1				ND
	PM21	Sangre	1			8	M
	OM19	Plumas	3				ND
12	PM22	Sangre				6	M
	PM23	Sangre				3	
	OM20	Plumas	3				ND
13	PM24	Sangre	1			5	M
	OM12	Sangre				1	
	OM21	Plumas	3				ND
14	OM01	Sangre				4	M
	OM22	Plumas	3				ND
15	OM02	Sangre			4	1	
	OM03	Sangre	1		1		F
	OM23	Plumas			2		

Nota: N: No amplificó, A: Amplificó pero las bandas no fueron claras, F: Hembras, M: Machos, ND: No determinado.

Tabla N° 21: Datos de amplificación por PCR del gen CHD-1 en *A. cupripennis*

	Cod Ext	Muestra	N	A	F	M	Sexo Mol
1	PM01	Sangre	1	3	8		M
	OM04	Plumas	3	1			ND
2	PM03	Sangre		2	1	7	M
	OM05	Plumas	3				ND
3	PM07	Sangre	4	3		3	M
	OM09	Plumas	3				ND
4	PM08	Sangre	1	3	8		F
	PM09	Sangre		1	2		F
	OM11	Plumas	1		1		F
	PM15	Sangre				7	M
5	PM16	Sangre				3	M
	OM17	Plumas	4				ND

Nota: N: No amplificó, A: Amplificó pero las bandas no fueron claras, F: Hembras, M: Machos, ND: No determinado.

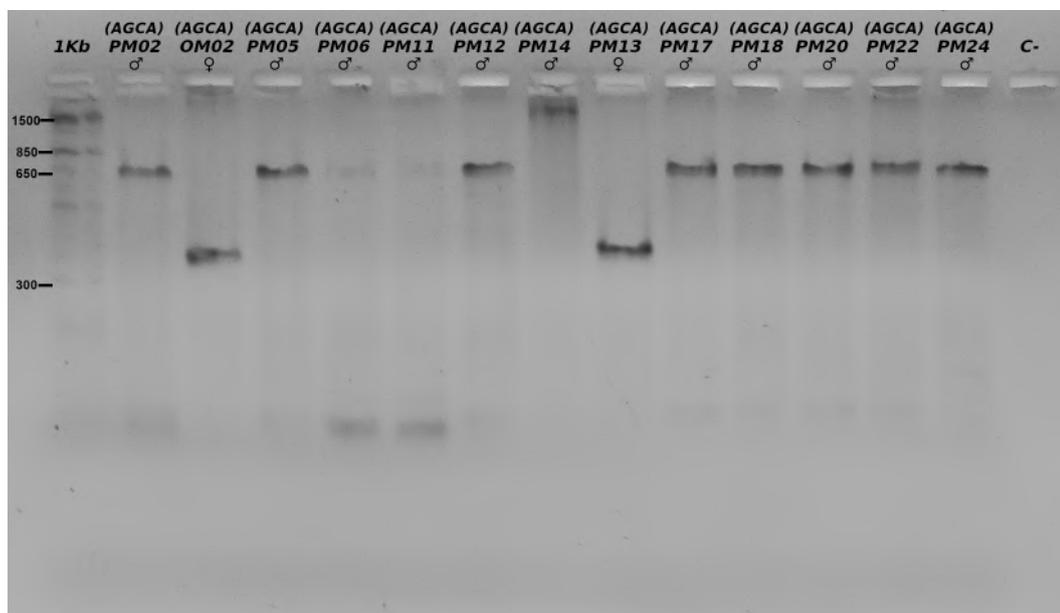


Figura N° 28: Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-R por TD-PCR, en agarosa 2% (1). Nota. AGCA: *A. castelnaudii*, C-: Control.

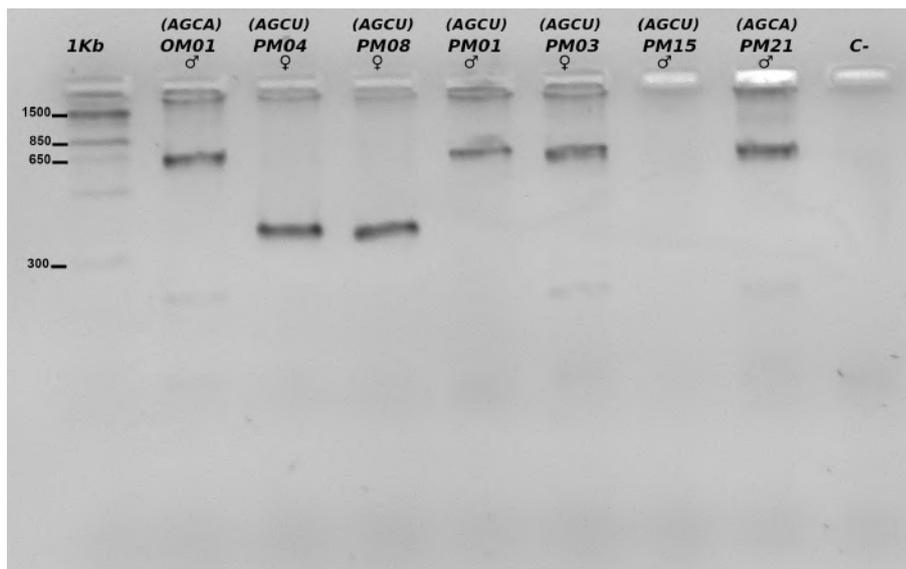


Figura N° 29: Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-r por TD-PCR, en agarosa 2% (2). Nota. AGCA: *A. castelnaudii*, AGCU: *A. cupripennis*, C-: Control.

En el caso de las hembras, en la figura 30, se observa que en su mayoría la presencia de la banda mas grande no es notoria, debido a problemas con la competencia del cebador donde solo nos permite observar las bandas mas pequeñas en hembras (aproximadamente de 350 pb) en comparación con las bandas mas grandes del control (PM21) macho (aproximadamente de 650 pb).



Figura N° 30: Identificación de hembras usando los genes CHD-1 con el cebador CHD-F/CHD-R en tejido sanguíneo. PM21 (control machos) y PM13 (control hembras), OM01 (*A. castelnaudii*), PM08 y PM04 (*A. cupripennis*).

Finalmente, en las muestras estudiadas, la eficiencia de amplificaciones en tejido de plumas fue muchísimo menor a lo obtenido usando tejido sanguíneo como fuente de ADN, como podemos observar tanto para *A. castelnaudii* (tabla 20) como para *A. cupripennis* (tabla 21).

Finalmente, los resultados en cuanto a la eficiencia de amplificación se presentan en la tabla 22.

Tabla N° 22: Cantidad de amplificaciones efectivas en plumas y tejido sanguíneo

Muestra	Especie	
	<i>A. castelnaudii</i>	<i>A. cupripennis</i>
Tejido Sanguíneo	15 (100%)	5 (100%)
Plumas	2 (15%)	2 (40%)

En la tabla 22 se presenta la cantidad de muestras que permitieron el sexado de los picaflores en estudio, resaltando que en muestras de tejido sanguíneo se obtuvo mejores resultados en comparación con las muestras de tejido de plumas.

En varios casos el resultado obtenido en los geles de agarosa al 2% de muestras de plumas producían una o varias bandas confusas (tablas 20 y 21), no permitiendo la detección del sexo de los individuos.

Este fenómeno puede deberse a la poca calidad del ADN colectado en las plumas (tal como se describió en el cálculo de la espectrofotometría) afectando el producto final amplificado por la presencia de otros restos o químicos que puedan interferir en amplificación por TD-PCR.

3.4 Alineamiento de la secuencia de CHD-1Z

Se recuperó el gen CHD-1Z (solo en machos) de los genes de Agarosa al 2%. Obteniéndose por alineamiento de secuencias, 1 fragmento de 695 pb. para *Aglaeactis castelnaudii* a través del ensamblado de 10 amplicones secuenciados y 1 fragmento de 697 pb para *A. cupripennis* a través del ensamblado de 3 amplicones secuenciados.

Comparación de secuencias del Gen CHD-1Z en individuos machos de las especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis*

```

ag-cup-CHD1Z  1  TGGCTGCAGA-TCCACAT-CCTGTCCCA-CCATGGTCCTTACAGGCTGKTGGATCCAAC
ag-cas-CHD1Z  1  .....T.....C.....C.....-.....--

ag-cup-CHD1Z  58  MCACCTG--CCCCACCGTGGTCCTTCAGGGACTCCTCCACCAGTCTTCTCCATGGGTAC
ag-cas-CHD1Z  58  C.....CC.....-.....

ag-cup-CHD1Z  116 AGGGCGGGACATCTTGCTATCTCCACCACCAGGCTGCAGCAAAATC-TCTGCTTGGGT--
ag-cas-CHD1Z  113  ....-.....T...T.....CY

ag-cup-CHD1Z  173  AGAGATCCTCTCCCTTCTTTCTCACCAA-CCTTGCTATCACCTT-CCCCTCTCCTCTGCT
ag-cas-CHD1Z  172  .....C.....C.....

ag-cup-CHD1Z  231  CTCAGGTCTTTTTCAGTTTTWGGTTTTTTTTTTAATTTCTGAATGTGTATTTCACAGA
ag-cas-CHD1Z  232  .....-T.....

ag-cup-CHD1Z  291  GGTGCATCCAGTTCCTAATCTTGGCTTTGGCCAGAATGGAGCTGGGGAGCTTCCAGC
ag-cas-CHD1Z  291  .....

ag-cup-CHD1Z  351  AGCTTCTTACAGGAGCTCCCTCCCTCCCCCGAAAACCCCGCCATCAAAACATCTGC
ag-cas-CHD1Z  351  .....

ag-cup-CHD1Z  411  TTCTGCTGTCTCACCTGAGTAGGAAWGTGAGACAAGATGACCTCCAGAGGTCTCTTCT
ag-cas-CHD1Z  411  .....-...W.....

ag-cup-CHD1Z  471  AACTGTTGCATGAATATATGATCTGTACTACTTTGCTTAAGAAAACATATATGAAAAAT
ag-cas-CHD1Z  470  .....-.....

ag-cup-CHD1Z  531  TGTTCTGTTAAAGACTGACAGTTTGCTYCTATGCTACACCTGTATTTTCGAAA-TTAAACT
ag-cas-CHD1Z  529  .....-.....M..-.....-.....T.....

ag-cup-CHD1Z  590  GAATTGAACTGGAAAATCCGCATTAATTTTTTTTCTTTCATTMAATAACACTTTTGG-
ag-cas-CHD1Z  585  ..--.....A.....C...CTTCMAC.TA.....G

ag-cup-CHD1Z  649  -CAGTTGGAGTATTGCAAGTTGGCTCC--GGATTTAATAT-TKGTACAAGAA
ag-cas-CHD1Z  643  CAG..K....GTA.T.C..G....C..TT...A...T...A.T.....

```

Se observa una similitud de ambas secuencias debido a la ancestralidad filogenética de *A. cupripennis* sobre *A. castelnaudii*, confirmando a través de esta comparación de secuencias que el gen CHD-1Z se encuentra conservada en ambas especies y el uso de esta técnica de PCR con el par cebadores CHDF/CHDR es útil en este grupo de aves (picaflores) y en especial en el género *Aglaeactis*.

3.5 Correlación entre datos morfométricos y sexado molecular

Se evaluó los datos obtenidos por el sexado molecular sobre 15 individuos de la especie *A. castelnaudii* y 5 individuos de la especie *A. cupripennis*.

3.5.1. Para *A. castelnaudii*- 15 individuos:

Consideraciones de datos cualitativos:

- **Índices reproductivos:** Tanto para Grasa, Parche de Incubación (BP) y Protuberancia cloacal (CP), los resultados se establecieron en rangos muy bajos. Esto se puede deber también a la temporada de muestreo (Agosto a Diciembre, en este último da el inicio a la temporada de reproducción). No representaron ser significativos para el sexado molecular así como para el sexado en campo.
- **Índices de muda y desgaste de plumas:** Se observó que 3 individuos estaban en una muda activa (al menos la mitad de su cuerpo), y que la mayoría de los individuos presentaron plumas nuevas y lustrosas, estos datos nos permitieron estimar la edad de las aves, mas no representaron una relación con el sexado molecular o en campo ya que fue común en ambos sexos.
- **Ciclo de muda (edad):** Debido a la presencia o ausencia de estrías pudimos medir a través de porcentajes obteniendo que al menos 10 individuos de las que se colectaron muestras de tejido estaba en etapa adulta, esto se complementó con el sistema WRP (DCB y 2 DPB) se encontraban en estadio adulto (o casi adulto) y solo 5 individuos se encontraban en etapa juvenil (4 FCF y 1 FPF). En este trabajo de investigación, la edad de ave no tuvo significancia en el sexado molecular.

Consideraciones de datos numéricos:

Visualmente, se aprecia a través de diagramas de cajas la estructura de la distribución de los datos. Teóricamente cuando mas aisladas estén las cajas es probable que pertenezcan a distribuciones diferentes. Se graficó los datos obtenidos en la figura 31 para las medidas de ala y cola.

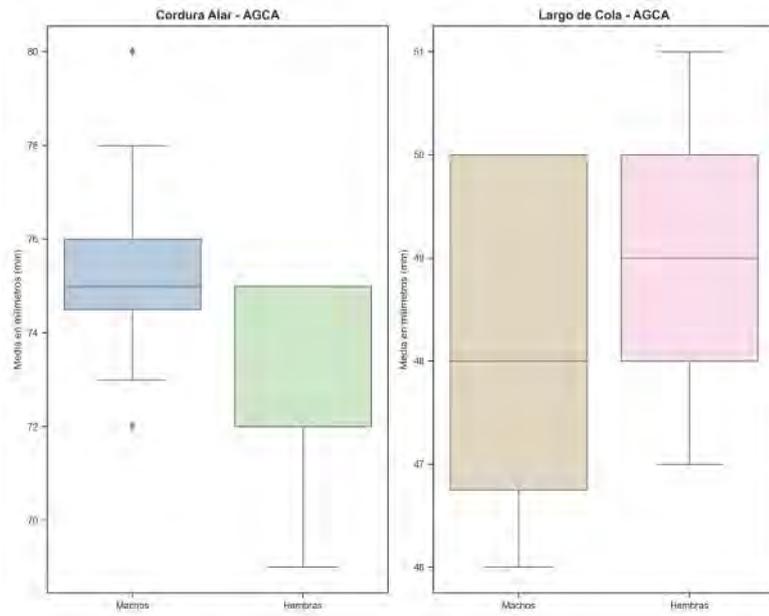


Figura N° 31: Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en *A. castelnaudii*

En la figura 33 se observa los diagramas de cajas para las medidas de pico narinas y culmen expuesto.

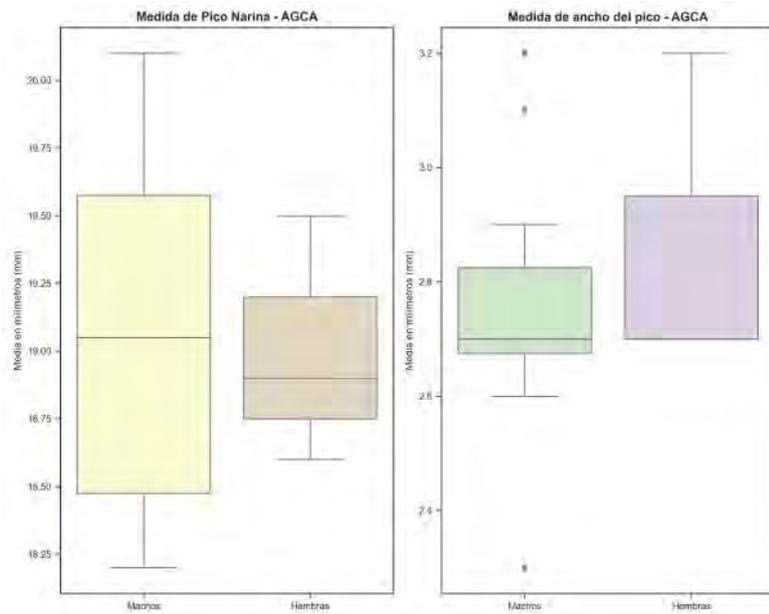


Figura N° 32: Diagramas de caja de medias numéricas: Pico Narinas y culmen expuesto en *A. castelnaudii*

Las medidas de tarso y el peso colectado de los individuos se graficó en la tabla 33.

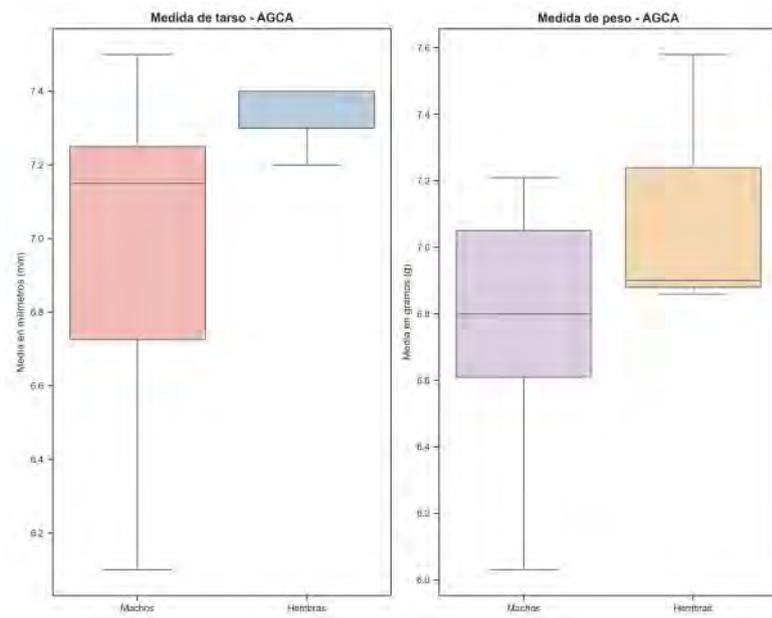


Figura N° 33: Diagramas de caja de medias numéricas: Tarso y peso en *A. castelnaudii*

Prueba de hipótesis: *A. castelnaudii*

Tabla N° 23: Resultados de la prueba Mann–Whitney U en *A. castelnaudii*

Métrica	U-val	p-val	RBC	CLES
ala	11.0	0.405783	0.333333	0.333333
cola	23.5	0.460297	-0.305556	0.652778
tarso	27.5	0.185469	-0.527778	0.763889
pico_narinas	19.0	0.942157	-0.055556	0.527778
culmen_ancho	21.5	0.653795	-0.194444	0.597222
peso	24.0	0.275230	-0.454545	0.727273

Nota: Umbral de confianza del 95%. **U-val:** valor U, **p-val:** valor p, **RBC:** correlación biserial de rango, **CLES:** tamaño del efecto de lenguaje común

Los resultados nos muestran que el valor p de significancia con un intervalo del 95% de confianza muestran que ningún valor descarta la hipótesis nula (valor p < 0.05), es decir que ningún valor de las métricas numéricas es diferente en machos y hembras en esta especie.

Para *A. cupripennis*:

Consideraciones de datos cualitativos:

- **Índices reproductivos:** Similar a *A. castelnaudii*, los valores de Grasa, Parche de Incubación (BP) y Protuberancia cloacal (CP), fueron mínimos y no nos permiten discriminar el sexo en las aves por el sexado molecular ni en campo.
- **Índices de muda y desgaste de plumas:** Se observó que solo 1 individuo estaba en una muda activa, y mientras que el desgaste de todos los individuos fue leve, permitiéndonos estimar la edad de las aves, pero no fueron significativos en el sexado molecular o en campo.
- **Ciclo de muda (edad):** Con la información obtenida por la presencia de estrías, pudimos detectar casi todos los individuos estaban atravesando por un estadio adulto (o casi adulto). Esto fue luego confirmado con el sistema WRP, se identificó que 1 individuo (DCB - adulto) y 4 individuos que se encontraban en etapa casi adulto - juvenil (FCF). En este caso también, la edad de ave no tuvo significancia en el sexado molecular.

Consideraciones de datos numéricos:

Debido al momento de captura, solo se dispuso de una muestra de tejido sanguíneo y pluma lo que considera el único dato para la hembra de *A. cupripennis* dentro del estudio. Esto es importante ya que el diagrama de la misma siempre mostrará una sola línea (no caja) dentro de los siguientes gráficos.

En caso de *A. cupripennis* se enfatizó la comparación entre machos e individuos de sexo no determinado.

Se graficó los datos obtenidos en la figura 34 para las medidas de ala y cola.

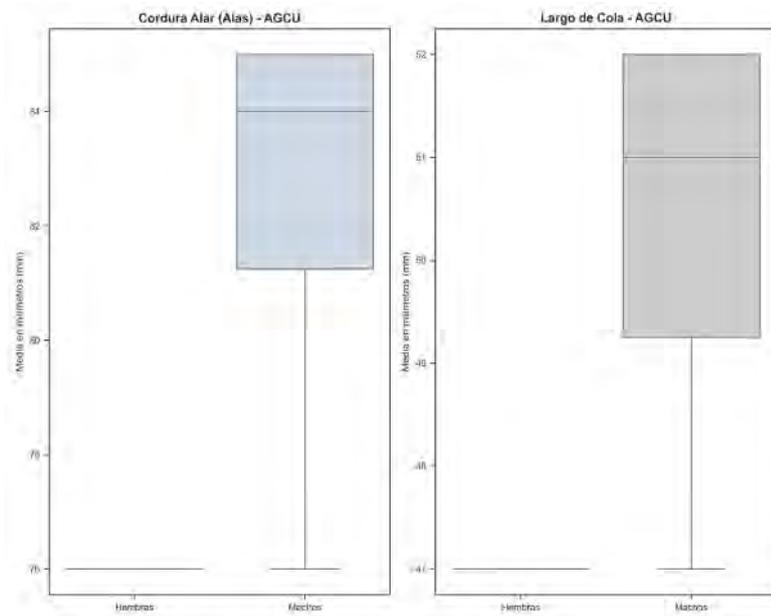


Figura N° 34: Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en *A. cupripennis*

Se muestran también los diagramas referentes a las medidas de pico narinas y culmen expuesto en la figura 35

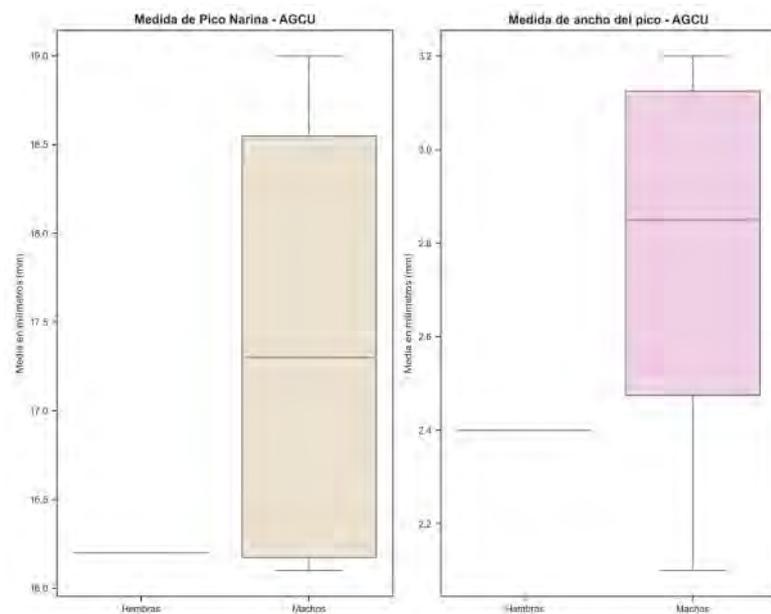


Figura N° 35: Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en *A. cupripennis*

En la figura 36, se observan las medias de tarso y peso de las especies de *A. cupripennis*.

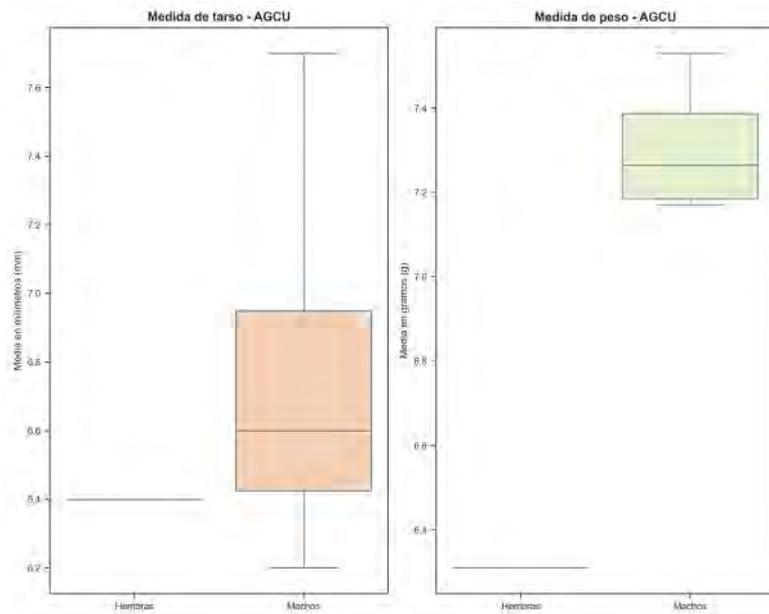


Figura N° 36: Diagramas de caja de medias numéricas: Ala y cola en *A. cupripennis*

Prueba de hipótesis: *A. cupripennis*

Tabla N° 24: Resultados de la prueba Mann–Whitney U en *A. cupripennis*

Métrica	U-val	p-val	RBC	CLES
ala	0.5	0.456057	0.75	0.125
cola	0.5	0.456057	0.75	0.125
tarso	1.0	0.800000	0.50	0.250
pico_narinas	1.5	1.000000	0.25	0.375
culmen_ancho	1.0	0.800000	0.50	0.250
peso	0.0	0.400000	1.00	0.000

Nota: Umbral de confianza del 95%. **U-val:** valor U, **p-val:** valor p, **RBC:** correlación biserial de rango, **CLES:** tamaño del efecto de lenguaje común

Los resultados nos muestran que el valor p de significancia con un intervalo del 95 % de confianza, al igual que en *A. castelnaudii* en esta especie se muestran que ningún valor descarta la hipótesis nula (valor p <0.05), es decir que ningún valor de las métricas numéricas es diferente en machos y hembras en esta especie.

3.6 DISCUSIÓN

Se identificó el sexo de 20 individuos del género *Aglaeactis* haciendo uso de las técnicas de PCR y la amplificación del gen CHD-1. De los cuales, en la especie *A. castelnaudii* se obtuvo 12 machos y 3 hembras y en *A. cupripennis*, 4 machos y 1 hembra.

La identificación en campo fue satisfactoria haciendo uso de guías y claves taxonómicas (Schuchmann, 1985; Schulenberg et al., 2010), los individuos presentaban rasgos fenotípicos únicos de su especie. En este estudio reportamos que la mayoría de los datos categóricos colectados en los datos de 55 individuos de la especie *A. castelnaudii* y 26 individuos de la especie *A. cupripennis* (grasa, parche de incubación - BP, protuberancia cloacal - CP) para ambas especies en la especie no influyeron en la identificación del sexo de los individuos. Con respecto a edad estimada del ave a través de sus ciclos de muda y al porcentaje de estrías, nos permitió confirmar que la mayoría de individuos de *A. castelnaudii* eran adultos (44 adultos y 9 juveniles), mientras que los individuos de *A. cupripennis* fueron 10 juveniles y 16 adultos, este factor al ser de importancia fenotípica y de madurez del ave, no influyó directamente en la identificación del sexo de los individuos.

Con respecto a los datos morfométricos numéricos, se evaluó la estructura de la distribución de los datos a través de diagramas de cajas para obtener una referencia exploratoria de los datos numéricos morfométricos. Se pudo observar que tanto para *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* las medidas morfométricas y el peso aparentemente se encuentran distribuidos dentro de un intervalo, siendo complicado discernir y utilizar alguna de estas medidas para diferenciar machos de hembras en estudios ecológicos en campo. En el caso de *A. cupripennis* los resultados fueron comparados solo a 1 hembra, ya que no se dispuso de mas ejemplares del mismo sexo.

La disponibilidad de ADN genómico en la tejido sanguíneo y plumas, se obtuvo una calidad/cantidad de ADN mucho mayor en tejido sanguíneo (entre 141.3 ng/μl y 4070.3 ng/μl y 1.8 a 2.0 en la escala de 260/280) que en plumas (4.1 ng/μl y 74.8 ng/μl y 1.51 a 2.03 en la escala de 260/280). Este fenómeno se debe a diversos factores, como ya fueron descritos en Horváth et al. (2005) y Harvey et al. (2006), la dificultad de obtener muestras de ADN en plumas se debe a la degradación de células originarias (en mucho caso debido al previo proceso de muda o maduración del individuo), principalmente la causa es la zona de colecta de las plumas, en este estudio solo fueron usadas las plumas rectrices timoneras de la cola. Esta ubicación anatómica puede disponer de muy poca cantidad de tejido sanguíneo coagulado antes de ser desprendida y por procesos naturales de esclerotización de la misma, esto reduce la probabilidad de encontrar material genético disponible

para la extracción de ADN.

En la amplificación de ADN, se realizaron diferentes pruebas dependiendo de las necesidades específicas de cada cebador: P2 / P8 (Çakmak et al., 2017; Griffiths et al., 1998; Harvey et al., 2006; Lee et al., 2010; Shibuya, 2016; Vucicevic et al., 2013), el cebador 2550F / 2718R (Çakmak et al., 2017; Fridolfsson & Ellegren, 1999; Vucicevic et al., 2013) y CHD1R / CHD1F (Çakmak et al., 2017; Lee et al., 2010), se realizaron diferentes experimentos modificando las concentraciones del (PCR) Master Mix así como la configuración del Termociclador. Trabajos previos reportaron la baja efectividad de P2/P8 (Fridolfsson & Ellegren, 1999) en geles de agarosa debido al tamaño diferencial de los fragmentos en ambos sexo que amplifica (20 pb), los mismos autores proponen un par de cebadores (2550F/218R) que genere fragmentos diferenciales más grandes. Durante las pruebas se pudo observar que las bandas en algunos caso eran más difusas, debido a competencia de las bandas por el cebador (Matta Camacho et al., 2009), esto se pudo mejorar a través de la implementación del protocolo de Touchdown PCR (Çakmak et al., 2017), garantizando que el procedimiento sea replicable para futuros ensayos.

Hagadorn et al. (2016) y Shibuya et al. (2018) fueron los únicos equipos que trabajaron en especies de la familia Trochilidae, a diferencia de los individuos de este estudio, ellos usaron individuos de «tierras bajas» en la selva de Brasil y otras regiones de Estados Unidos. Debido a que la mayoría de estudios se realizaron en otras aves de importancia industrial (Ellegren, 1996a), en cautiverio (Wang et al., 2007) o en peligro de extinción (Liza et al., 2008), no permiten tener una comparación apreciable como histórico para aves del mismo hábitat que las que usamos en este estudio. En ausencia de datos similares en picafloros altoandinos nos permite confirmar que el uso del tercer par de cebadores CHD1F/CHD1R fue mas productivo (funcionando en todas las muestras de sangre amplificadas), demostrando que los protocolos establecidos funcionan correctamente para los picafloros del género *Aglaeactis*, ya que los fragmentos generados para cada sexo daban bandas de diferencia significativa, mas pequeñas en las hembras (el cromosoma W) y mas grandes en los machos (en el cromosoma Z) visualizados en el geles de agarosa al 2%.

Según McGuire et al. (2014), *A. cupripennis* sería el ancestro de las otras 3 especies existentes del género *Aglaeactis*, ya que se encuentra en un rango de distribución mucho mas amplio (Ecuador, Perú y Bolivia), esto mismo pudo ser confirmado por el secuenciamiento de las muestras en machos (CHD-1Z), obteniendo los fragmentos secuenciados de longitud similar en *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* con 695 pb y 697 pb respectivamente. Esto comprueba la conservación de este gen CHD-1Z en ambas especies.

Finalmente los resultados obtenidos por análisis de prueba de hipótesis, con la información obtenida por el sexado molecular y la medidas numéricas colectadas fueron evaluadas por la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U para descartar la hipótesis nula (no hay diferencia en variables numéricas en cuanto al sexo de las especies). Los resultados obtenidos para ambas especies nos muestran que el valor p (significancia) a un nivel de confianza del 95%, en las métricas evaluadas no fueron significativas (valor-p >0.05). Con estos enunciados no se descartó la hipótesis nula, por lo que no podemos afirmar que haya diferencias en las medidas morfométricas colectadas. Este análisis refleja el estado y momento del muestreo de los individuos, por lo que un mayor número de muestras reforzarán los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

1. Se muestrearon 81 individuos: 55 individuos de la especie *Aglaeactis castelnaudii* y 26 individuos de la especie *Aglaeactis cupripennis*. A través de la técnica de PCR, se identificó el sexo por la amplificación del gen CHD-1 en 15 individuos de *A. castelnaudii* (12 machos y 3 hembras) y 5 individuos de *A. cupripennis* (4 machos y 1 hembra).
2. Los datos morfométricos categoricos colectados (grasa, protuberancia cloacal - CP, parche de reproducción - BP) no representaron indicativos para poder ser usados como indicadores del sexo de los individuos en campo. Con respecto a la estimación de la edad por ciclos de muda y porcentaje de estrías confirmo que los individuos de este estudio fueron en su mayoría adultos para *A. castelnaudii* (44) y *A. cupripennis* (16), la edad estimada de los individuos no influyó en la identificación sexual por PCR de las especies muestreadas. Los datos morfométricos numéricos fueron visualizados de manera exploratoria a través de diagramas de cajas, no se observo una diferencia aparente entre las distribuciones por sexo (incluyendo a especies de sexo no identificado) por lo que no fue posible proponer alguna de estas variables como un diferenciador para ser usado en proyectos ecológicos de campo.
3. Se extrajo el material genético de 2 fuentes: plumas y tejido sanguíneo. Se obtuvo una diferencia significativa cuanto a la cantidad y a los índices calidad de ADN extraído, siendo mas altas en muestras de tejido sanguíneo impregnada en carta de sangre de Macherey Nagel (entre 141.3 - 4070.3 ng/μl y 1.9 - 2.1 respectivamente) que en plumas y mas bajas en plumas rectrices colectadas por arranque (entre 4.1 - 74.8 ng/μl y 1.51 - 2.03 respectivamente).
4. Para estandarizar la técnica de PCR, se realizaron 6 ensayos obteniendo mejores resultados haciendo uso de un protocolo Touchdown PCR y el cebador específico CHD1F/CHD1R. Se detectó un patrón tanto para machos y hembras, en el proceso se mejoró la técnica y se realizaron 25 repeticiones para pruebas de PCR. Se logró amplificar los genes CHD1-W y CHD1-Z en muestras de tejido sanguíneo de 20 individuos.
5. El secuenciamiento del fragmento del gen CHD1-1Z (machos) de las dos especies *A. castelnaudii* y *A. cupripennis* dio como resultado 2 bandas de 695 pb y 697 pb respectivamente, demostrando la conservación del gen en estas especies.

-
6. Se analizó la influencia de los datos morfométricos categóricos por cada individuo sexado exitosamente para ambas especies. Estos valores representaron una importancia para conocer el estado reproductivo y edad del ave pero no influyeron en el sexado molecular o la diferenciación de los individuos. En el caso de las medidas morfométricas y el peso, se evaluó a través de una prueba de hipótesis no paramétrica de Mann–Whitney en un intervalo de confianza al 95 %. Los resultados obtenidos no demostraron una significancia estadística (valor - $p > 0.05$), rechazando la hipótesis nula. Con estos resultados, no se puede afirmar que hayan diferencias en los datos morfométricos numéricos acorde el sexo de los individuos de las especies estudiadas.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la colecta de plumas por arranque en otra región anatómica del ave, para mejorar la cantidad y calidad de ADN genómico que se pueda obtener sin necesidad de la colecta invasiva de tejido sanguíneo.
2. Se sugiere incrementar el número de muestras, para que los datos en comparación sean más diversos, esto puede mejorar con la técnica de colecta usada y usar un método paramétrico para su evaluación.
3. Promover el uso de nuevos instrumentos así como técnicas y equipos en los laboratorios locales para poder replicar este tipo de estudios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Begović, L., Mihić, I., Pospihalj, T., Mikuška, T., Mlinarić, S., & Mikuška, A. (2017). Evaluation of methods for molecular sex-typing of three heron species from different DNA sources. *Turkish Journal of Zoology*, 41(4), 593–598. doi: 10.3906/zoo-1602-47
- Bleiweiss, R. (1998). Origin of hummingbird faunas. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65(1), 77–97. doi: 10.1006/BIJL.1998.0242
- Çakmak, E., Akın Pekşen, Ç., & Bilgin, C. C. (2017). Comparison of three different primer sets for sexing birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(1), 59–63.
- Calder, W. A. (2001). Hummingbirds (Trochilidae). En *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1038/npg.els.0003432
- Cerit, H., & Avanus, K. (2007). Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(6), 371–374.
- CONCYTEC. (2016). *Programa Nacional Transversal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Valorización de la Biodiversidad 2015 - 2021* (Inf. Téc.). Lima, Perú: CONCYTEC.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., ... Burke, T. (2013). High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14(1), 176. (Publisher: BioMed Central) doi: 10.1186/1471-2164-14-176
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobítg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., ... Notredame, C. (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res*, 39(Web Server issue), W13–17. doi: 10.1093/nar/gkr245
- Dubiec, A., & Zagalska-Neubauer, M. (2006). Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological Letters*, 43(1), 3–12.
- Eaton, M. D. (2005). Human vision fails to distinguish widespread sexual dichromatism among sexually "monochromatic" birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10942–10946. doi: 10.1073/pnas.0501891102
- Ellegren, H. (1991). DNA typing of museum birds. *Nature*, 354(6349), 113–113. (Publisher: Nature Publishing Group) doi: 10.1038/354113a0

-
- Ellegren, H. (1996a). *First Gene on the Avian W Chromosome (CHD) Provides a Tag for Universal Sexing of Non-Ratite Birds*. Royal Society. doi: 10.2307/50650
- Ellegren, H. (1996b). *First Gene on the Avian W Chromosome (CHD) Provides a Tag for Universal Sexing of Non-Ratite Birds* (Vol. 263). Royal Society. doi: 10.2307/50650
- Ellegren, H., & Sheldon, B. C. (1997). New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(7), 255–259. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01061-6
- Fogden, M., Williamson, S., & Taylor, M. (2014). *Hummingbirds : a guide to every species*.
- Fridolfsson, A.-K., & Ellegren, H. (1999). A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Journal of Avian Biology*, 30(1), 116. (Publisher: WileyNordic Society Oikos) doi: 10.2307/3677252
- Galiano, W. H. (1990). *The flora of yanacocha, a tropical high andean forest in southern peru* (Tesis Doctoral no publicada). University of Missouri–St. Louis.
- Griffiths, R., Daan, S., & Dijkstra, C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263(1374), 1251–1256. doi: 10.1098/rspb.1996.0184
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., & Dawson, R. J. G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7(8), 1071–1075. (Publisher: John Wiley & Sons, Ltd (10.1111)) doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x
- Griffiths, R., & Korn, R. M. (1997). A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*, 197(1-2), 225–229. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00266-7
- Griffiths, R., & Tiwari, B. (1995). *Sex of the last wild Spix's macaw* (Vol. 375) (n.º 6531). Nature Publishing Group. doi: 10.1038/375454a0
- Hagadorn, K. A., Tell, L. A., Drazenovich, T. L., & Ernest, H. B. (2016). Molecular sex identification markers for five North American hummingbird species. *Conservation Genetics Resources*, 8(4), 427–430. doi: 10.1007/s12686-016-0587-y
- Harvey, M. G., Bonter, D. N., Stenzler, L. M., & Lovette, I. J. (2006). A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology*, 77(2), 136–140. doi: 10.1111/j.1557-9263.2006.00033.x
- Hernández-Olicón, A. P., Palma-Irizarry, M., Santiago-Hernández, J. C., Lozano-García, C., & Carreño-Durán, L. R. (2020). Amplification of the CHD1 Gene for

-
- Molecular Sexing of Birds using Touchdown-PCR. *Archives of Biochemistry and Molecular Biology*, 11(1), 17–26.
- Horváth, M. B., Martínez-Cruz, B., Negro, J. J., Kalmár, L., & Godoy, J. A. (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36(1), 84–88. doi: 10.1111/j.0908-8857.2005.03370.x
- Jensen, T., Pernasetti, F. M., & 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), 561–571. doi: 10.1002/zoo.10101
- Johnson, E. I., & Wolfe, J. D. (2017). *Molt in Neotropical birds : life history and aging criteria*.
- Kahn, N. W., St. John, J., & Quinn, T. W. (1998). Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *Auk*, 115(4), 1074–1078. doi: 10.2307/4089527
- Khaerunnisa, I., Sari, E., Ulfah, M., Jakaria, & Sumantri, C. (2013). Avian sex determination based on chromo helicase DNA-binding (CHD) genes using polymerase chain reaction (PCR). *Media Peternakan*, 36(2), 85–90. doi: 10.5398/medpet.2013.36.2.85
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). Mega x: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., ... Hsieh, H. M. (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*, 24(1), 27–31. doi: 10.1016/j.mcp.2009.08.003
- Liu, H., Li, J., Yang, F., & Cai, Y. (2011). Molecular sexing of endangered cranes based on chd-w gene. *Journal of Applied Animal Research*, 39(3), 212–217. doi: 10.1080/09712119.2011.565225
- Liza, J. R., Maturrano, L. H., & Rosadio, R. A. (2008). Determinación del sexo por ADN en cinco especies de Guacamayos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19, 31–36. doi: 10.15381/rivep.v19i1.1183
- Lloyd, H., & Marsden, S. J. (2008). Bird community variation across Polylepis woodland fragments and matrix habitats: implications for biodiversity conservation within a high Andean landscape. *Biodiversity and Conservation*, 17(11), 2645–2660. (Publisher: Springer Netherlands) doi: 10.1007/s10531-008-9343-2
-

-
- Matta Camacho, N. E., Ramírez Martín, N., Zúñiga Díaz, B. C., & Vera, V. (2009). Sex determination in birds by molecular tools. *Acta Biologica Colombiana*, 14(1), 27–40.
- McGuire, J. A., Witt, C. C., Remsen, J., Corl, A., Rabosky, D. L., Altshuler, D. L., & Dudley, R. (2014). Molecular Phylogenetics and the Diversification of Hummingbirds. *Current Biology*, 24(8), 910–916. doi: 10.1016/J.CUB.2014.03.016
- McGuire, J. A., Witt, C. C., Remsen, J. V., Dudley, R., & Altshuler, D. L. (2009). A higher-level taxonomy for hummingbirds. *Journal of Ornithology*, 150(1), 155–165. (Publisher: Springer-Verlag) doi: 10.1007/s10336-008-0330-x
- Montalti, D., Kopij, G., & Maragliano, R. (2004). Morphometrics and Sexual Dimorphism of some Neotropical Passerines. *Condor, The*, 271–278.
- Plenge, M. A. (2022). Lista de las aves del Perú. *Lima, Perú. Resolución Ministerial*.
- Price, T., & Birch, G. L. (1996). Repeated evolution of sexual color dimorphism in passerine birds. *Auk*, 113(4), 842–848. doi: 10.2307/4088862
- Purwaningrum, M., Nugroho, H. A., Asvan, M., Karyanti, K., Alviyanto, B., Kusuma, R., & Haryanto, A. (2019). Molecular techniques for sex identification of captive birds. *Veterinary world*, 12(9), 1506.
- Russell, S. M., & Russell, R. O. (2019). *The North American banders' manual for banding hummingbirds*. North American Banding Council.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. *Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor*, 1.
- Schuchmann, K. L. (1985). Schillerkolibris (*Aglaeactis* sp.). *Trochilus*, 6, 2–8.
- Schulenberg, T. S., Stotz, D. F., Lane, D. F., O'Neill, J. P., & Parker III, T. A. (2010). Aves de Perú. *Serie Biodiversidad Corbidi*, 1, 1–660.
- Scott, G. (2010). *Essential ornithology*. Oxford University Press.
- Servat, G. P., Mendoza, W., & Ochoa, J. A. (2002). Flora y fauna de cuatro bosques de polylepis (rosaceae) en la cordillera del vilcanota (cusco, Perú). *Ecología Aplicada*, 1(1-2), ág–25.
- Shibuya, F. L. S. (2016). Características das espécies que podem influenciar as dinâmicas populacionais de beija-flores na Floresta Atlântica no Sul do Brasil. *Universidad Federal de Paraná*.
- Shibuya, F. L. S., Presti, F. T., Lopes, S. A. C., Mota, P. G., & Roper, J. J. (2018). Molecular sex determination in neotropical monochromatic hummingbirds. *Ornitología Neotropical*, 29(1), 225–228.

-
- Simic, R., Lindstrom, D. L., Tran, H. G., Roinick, K. L., Costa, P. J., Johnson, A. D., ... Arndt, K. M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *The EMBO Journal*, 22(8), 1846–1856. doi: 10.1093/emboj/cdg179
- Thomas, A. C., Michael, D., Antony, L., Elliott, S. d. A., Tim, H., John, H., ... Paul, I. (2021). matplotlib/matplotlib: Rel: v3.5.1. *Zenodo*. doi: 10.5281/zenodo.5773480
- Vallat, R. (2018). Pingouin: statistics in python. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1026.
- Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N., & Stanimirovic, Z. (2013). Sex Determination in 58 Bird Species and Evaluation of CHD Gene as a Universal Molecular Marker in Bird Sexing. *Zoo Biology*, 32(3), 269–276. doi: 10.1002/zoo.21010
- Wang, L. C., Chen, C. T., Lee, H. Y., Li, S. H., Lir, J. T., Chin, S. C., ... Wang, C. H. (2007). Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with a unified reaction condition. *Zoo Biology*, 26(5), 425–431. (Publisher: John Wiley & Sons, Ltd) doi: 10.1002/zoo.20149
- Waskom, M. L. (2021). seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021. doi: 10.21105/joss.03021
- Wolfe, J. D., Ryder, T. B., & Pyle, P. (2010). Using molt cycles to categorize the age of tropical birds: an integrative new system. *Journal of Field Ornithology*, 81(2), 186–194. doi: 10.1111/j.1557-9263.2010.00276.x

ANEXOS

Anexo A: Aspectos de bioseguridad durante la colecta de muestras

Toda colecta de muestras que incluya el contacto con de algún fluido y/o tejido del animal se realizará haciendo uso de equipos de protección personal: guantes de nitrilo (evitamos el uso de guantes de látex debido al polvo antiadherente que posee) y barbijo para evitar el contacto por accidente de algún fluido animal con mucosas bucales del investigador y/o asistente.

Al ser este un estudio que pretende amplificar genes altamente específicos, se evitará la contaminación de la muestra de cualquier tipo.

En el caso de las muestras de plumas, el tejido se encuentra queratinizado en las base del tallo de las mismas, en muchos casos el desprendimiento de la pluma puede provocar un sangrado en el cálamo por lo que es importante la protección continua del investigador y el ave.

Anexo B: Protocolo de extracción de ADN

Protocolo de Extracción de ADN en tejido sanguíneo y plumas de Fenol Cloroformo Isoamyl (Sambrook & Russell (2001), modificado por Anderson V. Chaves)

Etapas de Limpieza y desintegración por lisis (Día 1)

1. Separar las muestras y anotar en el cuaderno de extracción de ADN
2. Colocar Tris NH₄Cl en baño 37°C y el Solución de Lisis de Madisen en baño a 55°C
3. Trasferir un pequeño pedazo de tejido (o sangre) a tubos de 1,5 ml
4. Triturar el tejido o sangre coagulada con tijeras.
5. Adicionar 1 ml de Tris NH₄Cl previamente calentado a 37°C
6. Vortexar e incubar en baño a 37°C por 5 min
7. Centrifugar 6.000 rpm 5 min
8. Descartar el sobrenadante
9. Repetir los pasos 5 a 8
10. Adicionar 1 ml de Solución Salina 0.85%

-
11. Vortexar
 12. Centrifugar 6.000 rpm 5 min
 13. Descartar el sobrenadante
 14. Resuspender el pellet en 300 µl de High TE
 15. Adicionar 400 µl de solución de Solución de Lisis de Madisen previamente calentada a 50°C
 16. Adicionar 8 µl de Proteinasa K 20 mg/ml (en freezer a -20°C) – la cantidad puede variar
 17. Vortexar
 18. Incubar en Termomixer a 55°C o baño a 55°C total la noche – overnight

Etapas de resuspensión de ADN y precipitación (Día 2)

1. Vortexar el tejido lisado
2. Adicionar 10 µl de RNase 10 mg/ml (en freezer a -20°C) al material lisado
3. Dejar 3-5 min a temperatura ambiente
4. Adicionar 1 volumen de Fenol: Cloroformo:Alcohol isoamil (25:24:1) (refrigeradora 2-4°C)
5. Agitar por 10 min
6. Centrifugar 14.000 rpm por 15 min
7. Transferir el sobrenadante para un tubo nuevo
8. Repetir los pasos 21 a 24
9. Adicionar 1 volumen de Cloroformo:Alcohol isoamil (24:1) (refrigeradora 2-4°C)
10. Agitar por 10 min
11. Centrifugar 14.000 rpm por 15 min
12. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo
13. Adicionar 100 µl de Acetato de Amonio 7.5 M (refrigeradora) y completar con isopropanol helado (refrigeradora)
14. Invertir hasta la precipitación del ADN

15. Incubar en freezer para precipitar

Etapa de recuperación y dilución del DNA (Día 3)

1. Centrifugar 14.000 rpm 15 min a 4°C
2. Descartar el sobrenadante
3. Adicionar 1000 µl de etanol 70% helado (refrigeradora o freezer)
4. Centrifugar 14.000 rpm 15 min
5. Descartar sobrenadante cuidadosamente
6. Dejar secar bien en la estufa (60°C max 1hr)
7. Adicionar 50 µl de Low TE (refrigeradora) (el volumen va depender de la cantidad de ADN obtenida)
8. Incubar en baño a 37°C 30 min (u overnight)
9. Almacenar las muestras en refrigeradora
10. Depositar muestras en freezer -80°C

Anexo C: Geles de Electroforesis - Amplificación del gen CHD-1

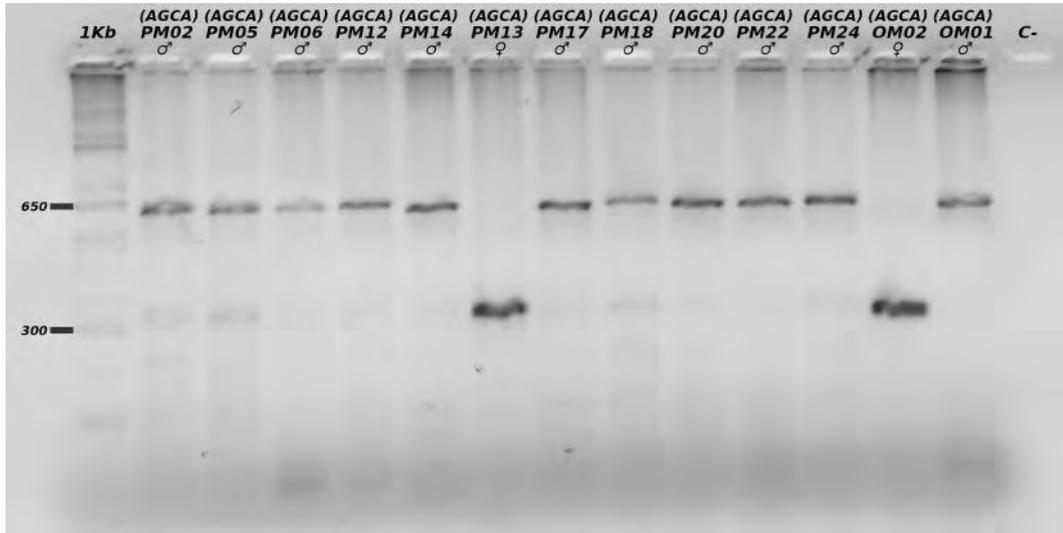


Figura N° 37: Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-R por TD-PCR, en agarosa 2% (3). Nota. AGCA: *A. castelnaudii*, C-: Control.

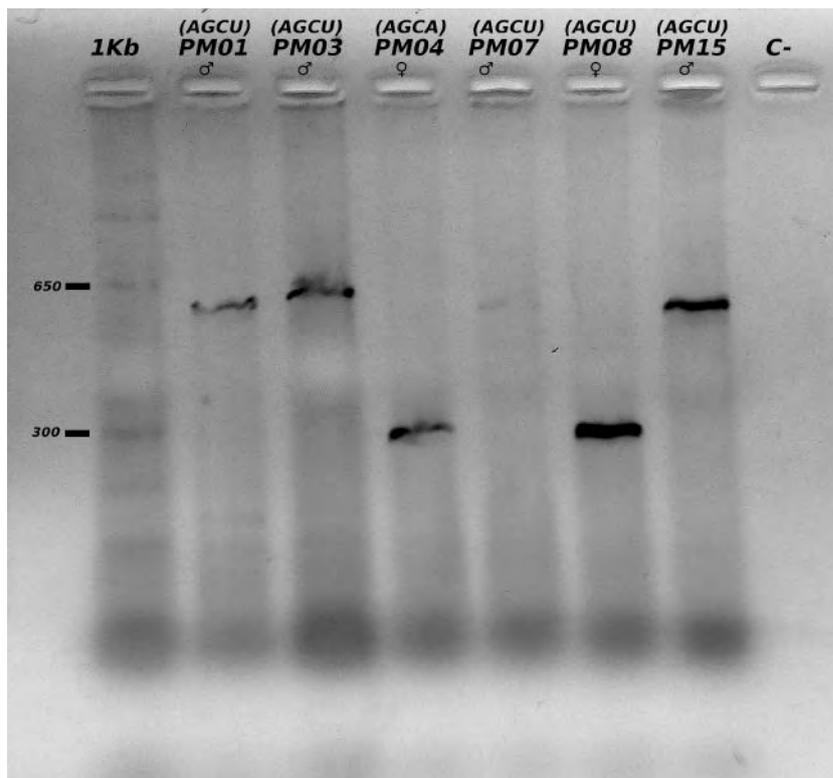


Figura N° 38: Análisis de productos amplificados con el cebador CHD-F/CHR-R por TD-PCR, en agarosa 2% (4). Nota. AGCA: *A. castelnaudii*, AGCU: *A. cupripennis*, C-: Control.

Anexo E: Secuenciamiento de fragmentos del gen CHD-1Z

ag-cup-CHD1Z	1	TGGCTGCAGA-TCCACAT-CCTGTCCCA-CCATGGTCCTTACAGGCTGKTGGAT
ag-cas-CHD1Z	1	TGGCTGCAGATTCCACATCCCTGTCCACCCATGGTCCTTACAGGCTG-TGGAT
ag-cup-CHD1Z	53	CCAACMCACCTG--CCCCACCGTGGTCCTTCAGGGACTCCTCCACCAGTCTTCTT
ag-cas-CHD1Z	55	CCA--CCACCTGCCCCACCAGTGGTCCTTCAGGGA-----CCACCAGTCTTCTT
ag-cup-CHD1Z	106	CCATGGGTACAGGGCGGGACATCTTGCTATCTCCACCACCAGGCTGCAGCAAAAT
ag-cas-CHD1Z	103	CCATGGGTACAGG- GGGACATCTTGCTATCTCCACCACCAGGCTGCAGCAAAAT
ag-cup-CHD1Z	161	C-TCTGCTTGGGT--AGAGATCCTCTCCCTTCTTTCTACCAA-CCTTGCTATCA
ag-cas-CHD1Z	157	CTTCTGTTTGGGTCTYAGAGATCCTCTCCCTTCTTTCTACCAAACCTTGCTATCA
ag-cup-CHD1Z	212	CCTT-CCCCTCTCCTCTGCTCTCAGGTCTTTTTGCAGTTTTWGGTTTTTTTTTTT
ag-cas-CHD1Z	212	CCTTCCCCCTCTCCTCTGCTCTCAGGTCTTTTTGCAGTTTT-GTTTTTTTTTTTT
ag-cup-CHD1Z	266	AATTTCTGAATGTGTTATTACAGAGGTGCATCCAGCTTCCCTAATCTTGGCTTT
ag-cas-CHD1Z	266	AATTTCTGAATGTGTTATTACAGAGGTGCATCCAGCTTCCCTAATCTTGGCTTT
ag-cup-CHD1Z	321	GGCCAGAAATGGAGCTGGGGGAGCTTCCAGCAGCTTCTTACAGGAGCCTCCCCTCC
ag-cas-CHD1Z	321	GGCCAGAAATGGAGCTGGGGGAGCTTCCAGCAGCTTCTTACAGGAGCCTCCCCTCC
ag-cup-CHD1Z	376	CTCCCCCGCAAAACCCCGCCATCAAAACATCTGCTTCTGCTGTCTCACCTGAG
ag-cas-CHD1Z	376	CTCCCCCGCAAAACCCCGCCATCAAAACATCTGCTTCTGCTGTCTCACCTGAG
ag-cup-CHD1Z	431	TAGGGAAWGTCA GACAAGATGACCTCCAGAGGTCTCTTCTAACTGTTGCATGAAT
ag-cas-CHD1Z	431	TAGGGAA-GTCW GACAAGATGACCTCCAGAGGTCTCTTCTAACTGTTGCATGAAT
ag-cup-CHD1Z	486	ATATGATCTGTTACTACTTTTGCTTAAGAAAAATATATGAAAAATTGTTCTGTTA
ag-cas-CHD1Z	485	ATATGATCT-TTACTACTTTTGCTTAAGAAAAATATATGAAAAATTGTTCTG-TA
ag-cup-CHD1Z	541	AAGACTGACAGTTTGCTYCTATGCTACACCTGTATTTGAAA-TTAAACTGAATT
ag-cas-CHD1Z	538	AAGACTGAMAG-TTGCT-CTATGCTACA-CTGTATTTGAAAATTTAAACTGA--T
ag-cup-CHD1Z	595	GAACTGCAAAATCCGCATTAATTTTTTTTTCTTTCATTCMAATAAACACTTTTGG-
ag-cas-CHD1Z	588	GAACTGCAAAATCCGCATTAATTTTTTTTTCTTCTTCMACATAAACACTTTTGGG
ag-cup-CHD1Z	649	-CAGTTGGAGTATTGCAAGTTGGCTCC--GGATTTTAATAT-TKGTACAAGAA
ag-cas-CHD1Z	643	CAGTKGGAGTATTCCAGGTGGCCCTTGGAAATTTATATATTGTACAAGAA

Figura N° 39: Secuenciamiento del gen CHD-1Z

Anexo D: Datos usados para el análisis

Tabla N° 25: Datos usados en el análisis de datos morfométricos numéricos para *A. castelnaudii*

Fecha	Hora	Estacion	Grasa	Bp	Cp	Sexo	Muda Cuerpo	Muda Limite	Desgaste	Estrias	Ciclo Muda	Ala	Cola	Tarso	Pico Narinas	Culmen Ancho	Peso	Muda
2016-11-21	16:58	YANA01	1	1	2	D	0	D	2	0	DCB	70	46	7.4	19.1	3.1	6.54	N
2016-11-21	16:39	YANA01	0	4	1	D	0	D	2	50	FCF	75	50	4.9	18	2.7	6.67	N
2016-11-21	16:39	YANA01	0	4	1	D	0	D	3	10	DCB	77	49	5.4	16	2.6	6.84	N
2016-11-21	9:33	YANA01	1	2	3	D	1	D	1	0	DCB	68	49	5.6	19.4	3.8	6.93	N
2016-11-21	7:30	YANA01	0	0	3	D	0	D	1	10	DCB	77	48	5.3	19.5	3.8	6.93	N
2016-11-22	11:15	YANA01	1	1	3	D	1	D	2	50	FCF	71	47	5.1	18.8	3	6.68	N
2017-10-20	8:35	YANA02	0	0	1	D	2	D	0	0	DCB	69	46	6.1	19.3	2.8	6.93	N
2017-10-20	12:00	YANA02	0	1	2	D	2	D	1	50	FCF	81	48	5.7	19.2	3.3	7.01	N
2017-10-20	10:43	YANA02	0	0	1	D	2	D	0	0	FAJ	72	49	6	18.8	2.9	7.15	N
2017-11-19	10:30	YANA02	1	1	2	D	0	D	1	95	FCF	75	48	5.9	17	2.5	6.47	N
2017-11-19	10:30	YANA02	1	0	2	D	0	D	4	50	FCF	74	51	6.4	17.1	3.2	6.91	N
2017-12-17	7:50	YANA02	1	0	3	D	0	N	1	10	DCB	82	51	5.3	17.1	2.4	7.19	N
2018-08-18	7:13	YANA02	0	0	1	D	0	N	5	0	DCB	74	47	5.6	18.7	3	6.79	N
2018-08-18	6:32	YANA02	0	0	0	D	2	N	5	70	FCF	74	50	6.1	18.4	3	6.85	N
2018-08-18	13:25	YANA02	1	0	0	D	1	N	4	95	FCF	65	51	5.3	18.6	2.7	7.4	N
2018-08-18	10:59	YANA02	0	0	1	D	0	N	5	95	FCF	71	49	5.2	18.7	3.2	6.82	N
2018-08-19	11:18	YANA02	0	0	2	D	1	P	4	60	FCF	71	46	6.6	16.5	3.3	6.2	N
2018-08-19	10:36	YANA02	1	0	1	D	3	N	2	10	DPB	69	44	5	17.2	2.8	6.55	Y
2018-08-19	11:06	YANA02	1	1	2	D	2	N	4	50	FCF	70	49	7.3	16.5	2.9	6.65	N
2018-08-19	10:10	YANA02	0	1	2	D	2	N	4	10	DCB	73	48	5.7	16	2.5	6.72	N
2018-08-19	11:00	YANA02	0	0	2	D	1	N	3	95	FPF	70	50	5.1	19.1	3.2	6.82	N
2018-08-19	10:41	YANA02	0	0	1	D	0	N	1	70	FCF	74	44	7	16.1	3.1	6.88	N
2018-08-19	10:53	YANA02	0	0	1	D	0	N	5	75	FCF	75	50	5.3	18.8	3	7.06	N
2018-08-19	10:23	YANA02	1	0	2	D	2	N	5	95	FCF	81	50	5.4	16	3.2	7.12	N
2018-08-28	12:00	YANA02	1	1	3	D	2	D	3	0	FAJ	72	48	5	17.3	3.2	6.86	N
2018-08-28	18:00	YANA02	0	0	3	D	0	D	2	0	DCB	75	45	5.4	18.2	3.2	7.29	N
2018-08-29	7:30	YANA02	1	1	3	D	0	D	3	90	FCF	70	49	5.7	18.7	3.5	6.58	N
2018-08-29	10:00	YANA02	2	2	3	D	0	D	4	0	FAJ	68	46	5.2	17.2	2.8	6.74	N
2018-09-26	6:45	YANA02	1	0	3	D	1	N	3	30	FCF	76	47	6.1	17.7	2.9	6.64	N
2018-09-26	7:40	YANA02	2	3	2	D	1	N	5	30	FCF	70	46	6.5	17.4	2.8	7.52	N
2018-09-27	7:20	YANA02	2	0	1	D	0	N	5	0	FAJ	75	48	5.4	18.3	3.1	6.45	N
2018-09-27	8:40	YANA02	1	2	3	D	0	N	5	30	FAJ	74	49	5.9	17.1	2.5	6.99	N
2018-09-30	9:58	YANA03	0	1	1	D	1	N	4	70	FCF	66	46	6.1	21.4	2.8	6.83	N
2018-09-30	7:50	YANA03	0	0	1	D	0	N	4	90	FCF	69	46	5.5	18.9	3.5	6.95	N

Tabla N° 26: Datos usados en el análisis de datos morfométricos numéricos para *A. castelnaudii* (parte 2)

Fecha	Hora	Estacion	Grasa	Bp	Cp	Sexo	Muda Cuerpo	Muda Limite	Desgaste	Estrias	Ciclo Muda	Ala	Cola	Tarso	Pico Narinas	Culmen Ancho	Peso	Muda
2018-10-24	10:00	YANA02	1	3	1	D	0	N	4	0	FAJ	74	50	7.6	21.7	2.5	6.17	N
2018-10-24	11:00	YANA02	3	4	2	D	3	N	5	0	FCF	74	48	6.5	17.1	3.1	7.13	N
2018-10-24	13:00	YANA02	0	4	2	D	0	N	5	30	DCB	72	40	7.1	20.3	2.9	7.26	N
2018-10-24	12:00	YANA02	2	4	2	D	0	N	5	0	FCF	81	49	6.5	21.2	2.2	7.48	N
2018-10-24	12:00	YANA02	1	2	2	D	2	N	5	50	FPF	65	43	7.1	18	2.4	7.6	N
2018-10-24	7:00	YANA02	1	2	3	D	1	N	5	0	FAJ	73	51	6	23.5	2.9		N
2019-08-10	16:48	YANA04	0	2	1	M	3	N	5	25	FPF	72	47	6.5	18.4	2.6	6.8	Y
2019-08-10	16:16	YANA04	0	0	0	F	0	N	5	75	FCF	75	51	7.4	18.6	3.2	6.86	N
2019-08-10	15:50	YANA04	0	0	2	M	0	N	3	25	FCF	75	50	6.1	18.5	3.1	7.04	N
2019-08-10	16:35	YANA04	0	0	1	M	2	N	5	0	DPB	50	7.1	20.1	3.2	7.21		Y
2019-08-11	11:45	YANA04	0	0	1	M	0	N	4	75	FCF	75	50	6.4	19.4	2.3	7.06	N
2019-09-29	7:40	YANA04	0	1	2	M	2	N	4	0	DCB	78	48	7.4	19.8	2.3	6.88	N
2019-09-29	8:33	YANA04	0	0	2	F	3	N	5	0	DPB	69	49	7.4	19.5	2.7	6.9	Y
2019-09-29	12:55	YANA04	0	0	2	M	1	N	5	0	DCB	75	46	7.2	19.5	2.7	7.1	N
2019-09-29	8:11	YANA04	0	0	2	M	1	N	5	95	FCF	73	48	7.2	19.5	2.7		N
2019-10-26	14:20	QELLO01	0	0	2	M	0	N	5	50	DCB	77	50	7.4	18.5	2.8	6.61	N
2019-10-27	7:00	QELLO01	0	0	2	M	0	N	4	0	DCB	74	48	7.5	18.7	2.8	6.47	N
2019-10-27	9:00	QELLO01	0	0	1	M	0	N	5	25	DCB	80	46	6.8	18.2	2.7	6.74	N
2019-11-25	12:15	POLY01	0	0	2	M	0	N	5	10	DCB	75	48	7.1	19.8	2.7	6.61	N
2019-12-20	16:00	YANA02	0	1	0	M	0	N	5	0	DCB	75	46	7.2	18.3	2.9	6.03	N
2019-12-20	8:00	YANA02	0	0	2	F	2	N	4	0	DCB	75	47	7.2	18.9	2.7	7.58	N

Tabla N° 27: Datos usados en el análisis de datos morfométricos numéricos para *A. cupripennis*

Fecha	Hora	Estacion	Grasa	Bp	Cp	Sexo	Muda Cuerpo	Muda Limite	Desgaste	Estrias	Ciclo Muda	Ala	Cola	Tarso	Pico Narinas	Culmen Ancho	Peso	Muda
2018-08-18	10:50	YANA02	0	0	0	D	2	N	5	80	FCF	80	52	5.1	17.1	2.1	6.48	N
2018-08-18	7:28	YANA02	0	0	0	D	4	N	4	80	FCF	73	47	4	16.7	2.8	6.74	N
2018-08-19	11:44	YANA02	1	0	1	D	3	N	4	90	FPF	77	46	6.7	17.3	2.8	6.51	Y
2018-08-19	11:23	YANA02	1	0	2	D	5	N	3	95	FPF	84	48	5	17	3	6.63	Y
2018-08-19	10:25	YANA02	0	1	1	D	0	N	3	60	FCF	76	41	6.6	16.1	2.4	6.74	N
2018-08-19	11:10	YANA02	0	0	1	D	1	N	4	90	FCF	81	50	5.8	16.5	2.7	6.89	N
2018-08-19	13:11	YANA02	0	0	1	D	0	N	4	25	DCB	70	50	5.5	18.1	3.2	6.94	N
2018-08-19	10:48	YANA02	1	0	2	D	4	N	2	50	DPB	84	46	5.5	16.5	3	7.05	Y
2018-08-19	13:03	YANA02	1	0	0	D	1	P	5	95	FCF	74	50	5.5	17.5	3.4	7.22	N
2018-08-19	12:00	YANA02	0	0	1	D	1	N	4	95	FCF	79	49	5.7	16.3	2.3	7.33	N
2018-09-27	9:00	YANA02	1	2	3	D	1	N	3	0	UCU	72	48	16.6	3.2	6.72		N
2018-09-27	12:00	YANA02	1	2	3	D	0	N	3	0	DPB	78	51	6.2	16	2.8	6.93	N
2018-09-30	9:55	YANA03	0	0	1	D	0	P	5	90	FCF	77	47	4.9	17.5	3.4	6.27	N
2018-09-30	10:38	YANA03	0	0	0	D	1	P	4	50	FCF	87	45	6.6	18.3	2.3	6.51	N
2018-09-30	10:21	YANA03	0	0	3	D	2	N	4	70	FCF	78	52	6.7	15.5	2.1	6.65	N
2018-09-30	13:23	YANA03	0	0	2	D	0	N	5	60	FCF	76	47	18.1	2.6	6.8		N
2018-09-30	10:24	YANA03	0	0	1	D	1	P	5	95	FCF	81	53	4.9	16.8	2.6	7.26	N
2018-10-23	18:00	YANA02	1	2	2	D	0	P	4	0	FCF	85	39	16.9	2.3	6.84		N
2018-10-24	10:00	YANA02	1	3	1	D	0	N	4	0	FAJ	74	50	7.6	21.7	2.5	6.17	N
2018-10-24	11:00	YANA02	3	4	2	D	3	N	5	0	FCF	74	48	6.5	17.1	3.1	7.13	N
2018-10-24	13:00	YANA02	0	4	2	D	0	N	5	30	DCB	72	40	7.1	20.3	2.9	7.26	N
2018-10-24	12:00	YANA02	2	4	2	D	0	N	5	0	FCF	81	49	6.5	21.2	2.2	7.48	N
2018-10-24	12:00	YANA02	1	2	2	D	2	N	5	50	FPF	65	43	7.1	18	2.4	7.6	N
2018-10-24	7:00	YANA02	1	2	3	D	1	N	5	0	FAJ	73	51	6	23.5	2.9		N
2019-08-10	16:48	YANA04	0	2	1	M	3	N	5	25	FPF	72	47	6.5	18.4	2.6	6.8	Y
2019-08-10	16:16	YANA04	0	0	0	F	0	N	5	75	FCF	75	51	7.4	18.6	3.2	6.86	N
2019-08-10	15:50	YANA04	0	0	2	M	0	N	3	25	FCF	75	50	6.1	18.5	3.1	7.04	N
2019-08-10	16:35	YANA04	0	0	1	M	2	N	5	0	DPB	50	7.1	20.1	3.2	7.21		Y
2019-08-11	11:45	YANA04	0	0	1	M	0	N	4	75	FCF	75	50	6.4	19.4	2.3	7.06	N
2019-09-29	7:40	YANA04	0	1	2	M	2	N	4	0	DCB	78	48	7.4	19.8	2.3	6.88	N
2019-09-29	8:33	YANA04	0	0	2	F	3	N	5	0	DPB	69	49	7.4	19.5	2.7	6.9	Y
2019-09-29	12:55	YANA04	0	0	2	M	1	N	5	0	DCB	75	46	7.2	19.5	2.7	7.1	N
2019-09-29	8:11	YANA04	0	0	2	M	1	N	5	95	FCF	73	48	7.2	19.5	2.7		N
2019-10-26	14:20	QELLO01	0	0	2	M	0	N	5	50	DCB	77	50	7.4	18.5	2.8	6.61	N
2019-10-27	7:00	QELLO01	0	0	2	M	0	N	4	0	DCB	74	48	7.5	18.7	2.8	6.47	N
2019-10-27	9:00	QELLO01	0	0	1	M	0	N	5	25	DCB	80	46	6.8	18.2	2.7	6.74	N
2019-11-25	12:15	POLY01	0	0	2	M	0	N	5	10	DCB	75	48	7.1	19.8	2.7	6.61	N
2019-12-20	16:00	YANA02	0	1	0	M	0	N	5	0	DCB	75	46	7.2	18.3	2.9	6.03	N
2019-12-20	8:00	YANA02	0	0	2	F	2	N	4	0	DCB	75	47	7.2	18.9	2.7	7.58	N

Anexo E: Imágenes del procedimiento



(a) Estación de muestreo Polylepis.



(b) Vista de la laguna de Yanacocha.



(c) Estación de muestreo Quellococha.



(d) Estación de muestreo Yanacocha



(e) Toma de datos morfológicos en campo.



(f) Toma de datos en campo.



(g) Revisión: patrones de muda y color.

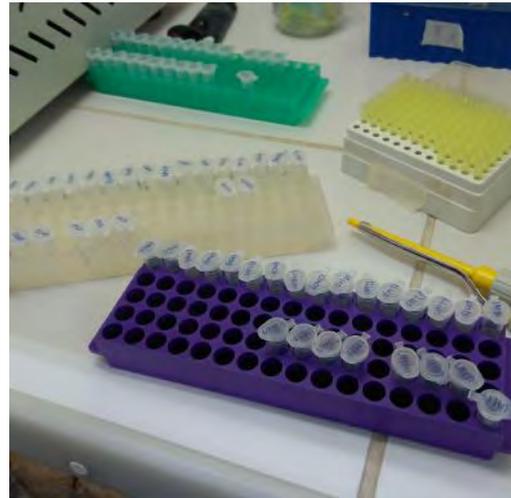


(h) Toma de muestras de sangre.

Figura N° 40: Monitoreo en campo y toma de muestras.



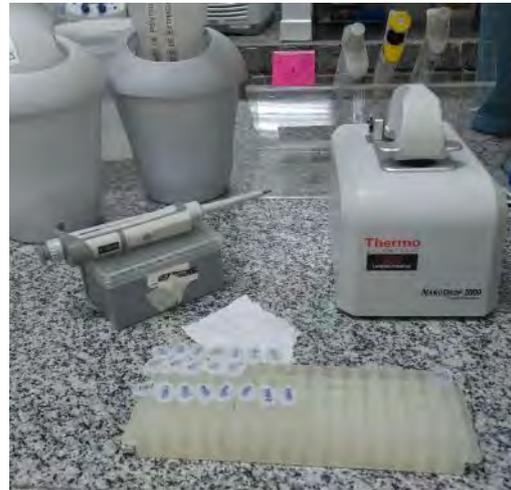
(a) Preparación para extracción de ADN.



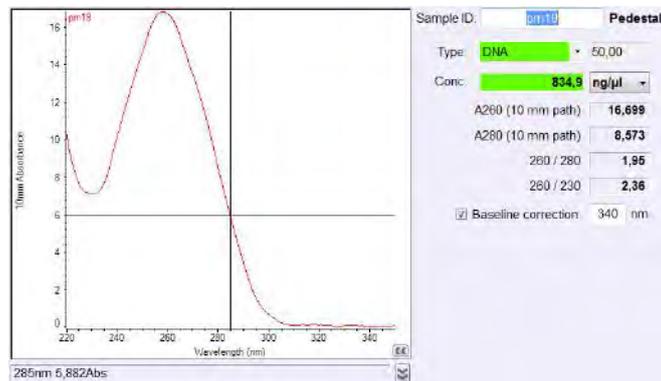
(b) Extracción de ADN de sangre y plumas.



(c) Extracción por el protocolo de fenol cloroformo.

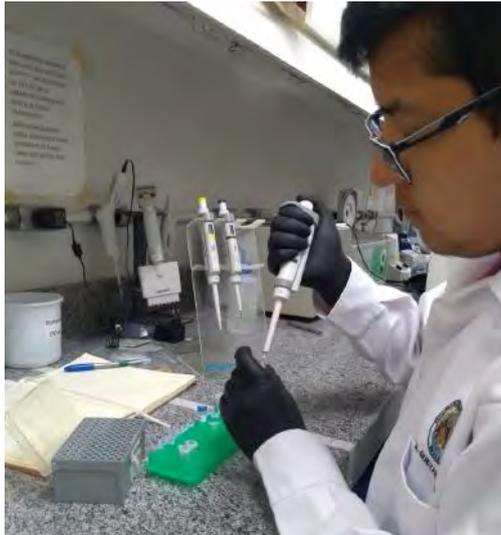


(d) Revisión con el espectrofotómetro.



(e) Resultados de análisis espectrofotométría.

Figura N° 41: Extracción de ADN



(a) Preparación de master mix para PCR.



(b) Preparación de muestras para PCR.



(c) Carril de tubos de PCR.



(d) Programación de termociclador.



(e) Electroforesis.



(f) Revisión de geles con transiluminador UV.

Figura N° 42: PCR y visualización de Geles de Agarosa



Figura N° 43: Equipo de trabajo de campo en Agosto 2019.



Figura N° 44: Equipo de trabajo de laboratorio en Febrero del 2020.

Anexo F: Permisos de Investigación y Autorización del Comité de Ética UN-SAAC



RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA
N° 151 -2018-MINAGRI-SERFOR/ATFFS CUSCO

Cusco, 03 SEP 2018

VISTO:

La solicitud s/n, ingresada el 23 de julio del 2018, por el Sr. David Guevara Apaza, quien solicita autorización para realizar investigación científica en fauna silvestre, fuera de Áreas Naturales Protegidas, sin colecta o captura temporal de fauna silvestre en el bosque de Yanacocha, ACP la Verónica ambos de la provincia de Urubamba; Qolqanpata Inca Park en la Provincia de Cusco; El bosque de Zurite, en la provincia de Anta e Ipal Ecolodge, Distrito de Huayopata Provincia de la Convención, todos en el departamento de Cusco, como parte del estudio titulado: "Ecología y conservación de avifauna en bosques montanos de Cusco", y;

CONSIDERANDO:

Que, el artículo 66° de la Constitución Política del Perú de 1993, establece que los recursos naturales, renovables y no renovables, son patrimonio de la Nación. El Estado es soberano en su aprovechamiento; asimismo, en su artículo 68° establece que es obligación del Estado promover la conservación de la diversidad biológica;

Que, la Ley N° 26821, Ley Orgánica para el Aprovechamiento Sostenible de los Recursos Naturales, establece en su artículo 9°, referido a la investigación científica, que el Estado promueve la investigación científica y tecnológica sobre la diversidad, calidad, composición, potencialidad y gestión de los recursos naturales. Asimismo, promueve la información y el conocimiento sobre los recursos naturales. Para estos efectos, podrán otorgarse permisos para investigación en materia de recursos naturales;

Que, mediante Decreto Legislativo N° 997, Decreto Legislativo que aprueba la Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Agricultura, ahora Ministerio de Agricultura y Riego, modificado por la Ley N° 30048, dispone que este Ministerio es el órgano rector del Sector Agrario, el cual comprende entre otras: las tierras de uso agrícola, de pastoreo, las tierras forestales, las eriazas con aptitud agraria; los recursos forestales y su aprovechamiento; la flora y fauna; las actividades de producción, transformación y de comercialización de cultivos y crianzas; asimismo, dispone, entre otros, que este Ministerio diseña, establece, ejecuta y supervisa las políticas nacionales y sectoriales en materia agraria; ejerce la rectoría en relación con ella y vigila su obligatorio cumplimiento por los tres niveles de gobierno;

Que, el artículo 13° de la Ley N° 29763, crea el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, como organismo público técnico especializado, con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego. Asimismo, se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre (SINAFOR), y se constituye en su autoridad técnico normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito;

Que, el Reglamento de Organización y Funciones del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR, aprobado mediante Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI, y modificado mediante el D.S. N° 016-2014-MINAGRI, establece en su primera Disposición



Complementaria Transitoria que, las Administraciones Técnicas Forestales y de Fauna Silvestre se incorporan al SERFOR, como órganos desconcentrados de actuación local del SERFOR, con pliego presupuestal adscrita al Ministerio de Agricultura y Riego;

Que, el Decreto Supremo N° 004-2014-MINAGRI, aprueba la categorización de especies amenazadas de fauna silvestre legalmente protegidas;

Que, mediante Decreto Supremo N° 018-2015-MINAGRI, se aprobó el Reglamento para la Gestión Forestal, el mismo que en el artículo 154, menciona que la investigación científica del Patrimonio se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país, respecto a su patrimonio genético nativo; así mismo señala que las ARFFS otorgan autorizaciones con fines de investigación científica, que impliquen la utilización de métodos directos e indirectos para especies no categorizadas como amenazadas, no listadas en los Apéndices CITES y que en ningún caso otorgue el acceso a los recursos genéticos o sus productos derivados, de acuerdo con los lineamientos aprobados por el SERFOR para la evaluación de las solicitudes, así como los criterios para la verificación de cumplimiento de los compromisos de los investigadores.

Que, mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, del 01 de abril del 2016, se aprueban los: "Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre";

Que, mediante solicitud s/n, ingresada el 23 de julio del 2018, por el Sr. David Guevara Apaza, quien solicita autorización para realizar investigación científica en fauna silvestre, fuera de Áreas Naturales Protegidas, sin colecta o captura temporal de fauna silvestre en el bosque de Yanacocha, ACP la Verónica ambos de la provincia de Urubamba; Qolqanpata Inca Park en la Provincia de Cusco; El bosque de Zurite, en la provincia de Anta e Ipal Ecolodge, Distrito de Huayopata Provincia de la Convención, todos en el departamento de Cusco, como parte del estudio titulado: "Ecología y conservación de avifauna en bosques montanos de Cusco";

Que, el Informe Técnico N° 483-2018-MINAGRI-SERFOR/ATFFS CUSCO, de fecha 29 de agosto del 2018, emitido por la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco, recomienda autorizar la investigación científica de fauna silvestre, con captura temporal de aves y colecta definitiva de plantas y ácaros, y sin acceso a recursos genéticos, fuera de Áreas Naturales Protegidas titulada " **Ecología y conservación de avifauna en bosques montanos de Cusco**", por el periodo de quince (15) meses, al Sr. David Guevara Apaza y su equipo de investigación;

Que, el precitado Informe Técnico señala también que la solicitud materia de resolución, cumple con presentar la documentación necesaria; y,

De conformidad a lo establecido en la Ley Forestal y de Fauna Silvestre, Ley N° 29763; el Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, aprobado por Decreto Supremo N° 0189-2015-MINAGRI; y en uso de las atribuciones conferidas por el Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, modificado por el Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI y la Resolución de Dirección Ejecutiva N° 121-2017-SERFOR-DE;

SE RESUELVE:

Artículo 1º.- Otorgar la autorización para realizar la investigación científica de fauna, sin colecta o captura temporal y sin acceso a recursos genéticos, fuera de Áreas Naturales





Protegidas al Sr. David Guevara Apaza y a los profesionales indicados en la tabla N° 01, correspondiéndole el Código de Autorización N° 08-CUS-AUT-IFS-2018-002.

Tabla N° 01 Investigadores que participarán en el estudio

Nombre	Función	DNI o Pasaporte	Nacionalidad
David Guevara Apaza	Investigador principal	DNI 70386803	Peruana
Macgregor Alexander Ross Aubertin - Young	Co- Investigador	AD719891	Canadá
Rosio Vega Quispe	Co- Investigador	DNI 75503055	Peruana
Micah Noel Scholer	Colaborador	5152880065	E.E.U.U.
Daniel Paucarmayta Holgado	Colaborador	DNI 72749432	Peruana

Artículo 2°.- La autorización indicada en el artículo precedente permite realizar la investigación científica en fauna silvestre, con captura temporal de especímenes aves mediante redes de niebla y colecta definitiva de flora 02 ejemplares e invertebrados (colectados directamente de las fosas nasales de las aves), en el bosque de Yanacocha, ACP la Verónica ambos de la provincia de Urubamba; Qolqanpata Inca Park en la Provincia de Cusco; El bosque de Zurite, en la provincia de Anta e Ipal Ecolodge, Distrito de Huayopata Provincia de la Convención, todos en el departamento de Cusco, como parte del estudio titulado: "Ecología y conservación de avifauna en bosques montañosos de Cusco, por el periodo de quince (15) meses, contados a partir de la notificación de la presente Resolución, y en el que participarán los investigadores descritos en la tabla N° 01.

Artículo 3°.- El titular de la autorización, y sus colaboradores, tienen las siguientes obligaciones:

- No extraer especímenes, ni muestras biológicas de flora o fauna silvestre Amenazadas según Decreto Supremo N° 004-2014-MINAGRI o que figuren en alguno de los apendices de CITES.
- No relizar colecta o captura temporal de especímenes de flora o fauna silvestre.
- No contactar, ni ingresar a los territorios comunales sin contar con la autorización de las autoridades comunales correspondientes.
- Entregar a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco, una (01) copia del Informe Final en idioma español el cual debe de ser entregado de acuerdo al formato que se encuentra en el Anexo 1 de la presente resolución en un plazo que no deberá exceder los seis (06) meses de vencimiento del periodo de autorización; Asimismo, entregar una (01) copia de las publicaciones en formato impreso y digital que sean producto de la investigación autorizada en la presente resolución.
- Indicar el número de la Resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.

Artículo 4°.- La Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Cusco del SERFOR, no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por los solicitantes de esta autorización durante la ejecución del proyecto; asimismo, se reserva el derecho de demandar del proyecto de investigación los cambios a que hubiese lugar en los casos en que se dicten nuevas disposiciones legales o se formulen ajustes sobre la presente autorización.

Artículo 5°.- El incumplimiento de los compromisos adquiridos podrá ser causal para denegar futuras autorizaciones a nivel institucional, sin perjuicio de ejercer las acciones administrativas, civiles y/o penales que correspondan.

Artículo 6°.- Notificar la presente Resolución al Sr. David Guevara Apaza, a la Dirección General de Información y Ordenamiento Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR y



a la jefatura del Santuario Historico de Machupicchu, para su conocimiento y seguimiento o verificación de ejecución.

Artículo 7°.- Disponer la publicación de la presente Resolución en el Portal Web del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre: www.serfor.gob.pe.

Regístrese y comuníquese



Miguel Angel Escalante Molina
ADMINISTRADOR TECNICO
SERVICIO NACIONAL FORESTAL Y
DE FAUNA SILVESTRE - SERFOR
ATFFS - CUSCO



Magdalena Del Mar, 14 de Diciembre del 2020

RDG N° D000399-2020-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

VISTOS:

La solicitud de autorización para realizar investigación científica en fauna silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas - ANP, presentada el día 4 de diciembre de 2019 por el señor **David Guevara Apaza** (CUT N° 60861-2019), ciudadano peruano identificado con DNI N° 70386803; así como, el Informe Técnico N° D000642-2020-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS, de fecha 14 de diciembre de 2020; y,

CONSIDERANDO:

Que, mediante el artículo 13 de la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, se creó el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, como un organismo público técnico especializado con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Agricultura y Riego; artículo en el que además se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre - SINAFOR, constituyendo su autoridad técnico normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito;

Que, a través del Decreto Supremo N° 019-2015-MINAGRI, se aprobó el Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, vigente desde el 1 de octubre de 2015, reglamento que en el numeral 134.1 de su artículo 134, precisa que la investigación científica del patrimonio se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país, respecto a su patrimonio genético nativo; asimismo, en el numeral 134.5 del citado artículo, se dispone que el desarrollo de actividades de investigación básica taxonómica de fauna silvestre, relacionada con estudios moleculares con fines taxonómicos, sistemáticos, filogeográficos, biogeográficos, evolutivos y de genética de la conservación, entre otras investigaciones sin fines comerciales, son aprobadas a través de autorizaciones de investigación científica;

Que, según el numeral 134.2 del artículo 134 del Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, es competencia del SERFOR la evaluación de la presente solicitud, toda vez que el estudio incluye el registro de especies amenazadas por el Decreto Supremo N° 004-2014-MINAGRI y listadas en los Apéndices de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres - CITES, además se hará uso de herramientas moleculares como parte de su metodología;

Que, de acuerdo al literal g) del artículo 53 del Reglamento de Organización y Funciones - ROF del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI; la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, tiene por función, entre otras, el otorgar permisos de investigación o de difusión cultural con o sin colecta de flora y fauna silvestre y sus recursos genéticos;



Que, mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE, expedida el 1 de abril de 2016, se aprobaron los “Lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación científica de flora y/o fauna silvestre”;

Que, en el actual Texto Único de Procedimientos Administrativos - TUPA del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 001-2016-MINAGRI y modificado por Resolución Ministerial N° 613-2016-MINAGRI, Resolución Ministerial N° 026-2019-MINAGRI y Resolución de Dirección Ejecutiva N° D000103-2020-MINAGRI-SERFOR-DE; no se contempla el procedimiento de autorización para realizar investigación científica fuera de ANP;

Que, en observancia del principio de impulso de oficio, previsto en el numeral 1.3 del artículo IV del Título Preliminar del Texto Único Ordenado - TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; se desprende que las autoridades deben dirigir e impulsar de oficio el procedimiento y ordenar la realización o práctica de los actos que resulten convenientes para el esclarecimiento y resolución de las cuestiones necesarias;

Que, por tanto, cabe señalar que en el numeral 26 del Anexo N° 2 del Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, en concordancia al numeral 6.6 de los lineamientos aprobados por Resolución de Dirección Ejecutiva N° 060-2016-SERFOR/DE; se establecen los siguientes requisitos para la autorización con fines de investigación científica fuera de ANP: i) Solicitud con carácter de declaración jurada que contenga información sobre el investigador, según formato; ii) Hoja de vida del investigador principal y plan de investigación, según formato; iii) Carta de presentación de los investigadores participantes, emitida por la institución académica u organización científica nacional o extranjera de procedencia; iv) Documento que acredite el consentimiento informado previo, expedido por la respectiva organización comunal representativa, de corresponder; y v) Documento que acredite el acuerdo entre las instituciones que respaldan a los investigadores nacionales y extranjeros, en caso la solicitud sea presentada por un investigador extranjero;

Que, mediante solicitud s/n recibida el 4 de diciembre de 2019, el señor David Guevara Apaza, (en adelante, el administrado), bachiller de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - UNSAAC, solicitó autorización para realizar investigación científica en fauna silvestre, con captura temporal de aves y colecta definitiva de plumas y sangre, como parte del proyecto titulado: “Determinación Sexual en aves monomórficas a través de herramientas genéticas en la cordillera del Vilcanota”; investigación a ser efectuada fuera de ANP, en los bosques de Yanacocha y en el Área de Conservación Privada - ACP Santuario de la Verónica, ambos ubicados en la provincia de Urubamba y departamento de Cusco, por el periodo de nueve (09) meses;

Que, mediante Memorándum N° 532-2019-MINAGRI-SERFOR-ATFFS - Cusco recibido el 19 de diciembre de 2019, la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre de Cusco del SERFOR remite a la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio de Fauna Silvestre – DGSPFS, la solicitud de Autorización con fines de investigación científica presentada por el señor David Guevara Apaza, toda vez que el proyecto de investigación solicitado incluye el uso de herramientas moleculares;



Que, a través del Decreto Supremo N° 008-2020-SA, publicado el 11 de marzo de 2020, se declaró en Emergencia Sanitaria a nivel nacional, por el plazo de noventa (90) días calendario, debido a la existencia del COVID-19; siendo que mediante Decreto Supremo N° 020-2020-SA, Decreto Supremo N° 027-2020-SA y Decreto Supremo N° 031-2020-SA, la Emergencia Sanitaria fue ampliada hasta el 6 de marzo de 2021;

Que, mediante Decreto Supremo N° 044-2020-PCM, publicado el 15 de marzo de 2020, se declaró el Estado de Emergencia Nacional por el plazo de quince (15) días calendario, ordenándose un aislamiento social obligatorio (cuarentena), a consecuencia del brote del COVID-19; así como, por Decreto Supremo N° 051-2020-PCM, Decreto Supremo N° 064-2020-PCM, Decreto Supremo N° 075-2020-PCM, Decreto Supremo N° 083-2020-PCM, Decreto Supremo N° 094-2020-PCM, Decreto Supremo N° 116-2020-PCM, Decreto Supremo N° 135-2020-PCM, Decreto Supremo N° 146-2020-PCM, Decreto Supremo N° 156-2020-PCM, Decreto Supremo N° 174-2020-PCM y el Decreto Supremo N° 184-2020-PCM, se dispuso prorrogar el Estado de Emergencia Nacional, hasta el 31 de diciembre de 2020;

Que, a través del numeral 2 de la Segunda Disposición Complementaria Final del Decreto de Urgencia N° 026-2020, publicado el 15 de marzo de 2020, se declaró la suspensión por treinta (30) días hábiles, del cómputo de los plazos de tramitación de los procedimientos administrativos sujetos a silencio positivo y negativo que se encontraban en trámite a la entrada en vigor de la citada norma, con excepción de aquéllos que contaban con un pronunciamiento de la autoridad pendiente de notificación a los administrados; suspensión que por Decreto Supremo N° 076-2020-PCM, fue ampliada por quince (15) días hábiles;

Que, mediante el artículo 28 del Decreto de Urgencia N° 029-2020, publicado el 20 de marzo de 2020, se declaró la suspensión por treinta (30) días hábiles, del cómputo de los plazos de inicio y de tramitación de los procedimientos administrativos y procedimientos de cualquier índole, incluso los regulados por leyes y disposiciones especiales, que se encontraban sujetos a plazo, siendo tramitados en entidades del sector público, y que no estaban comprendidos en los alcances de la Segunda Disposición Complementaria Final del Decreto de Urgencia N° 026-2020; suspensión que también resultó aplicable a los procedimientos en trámite a la entrada en vigor del Decreto de Urgencia N° 029-2020, la cual fue prorrogada por quince (15) días hábiles, en mérito al artículo 12 del Decreto de Urgencia N° 053-2020;

Que, mediante Decreto Legislativo N° 1497, publicado el 10 de mayo de 2020, se dispuso la suspensión hasta el 31 de diciembre de 2020, de la aplicación del numeral 134.3 del artículo 134 del TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, respecto a la obligación de la presentación física del escrito o documentación por parte de los administrados;

Que, a través del Decreto Supremo N° 087-2020-PCM, publicado el 20 de mayo de 2020, se dispuso ampliar hasta el día 10 de junio de 2020, la suspensión del cómputo de los plazos de tramitación de los procedimientos administrativos; suspensión que fue declarada por el numeral 2 de la Segunda Disposición Complementaria Final del Decreto de Urgencia N° 026-2020, y por el artículo 28 del Decreto de Urgencia N° 029-2020;



Que, mediante correo electrónico de fecha 08 de abril de 2020, efectuado a la dirección electrónica autorizada por el administrado (davidguevaraapaza@gmail.com); la Dirección de Gestión Sostenible del Patrimonio de Fauna Silvestre - DGSPFS comunicó las observaciones identificadas en la solicitud antes mencionada, a fin que fueran subsanadas, las mismas que consistieron en: i) La Sección 6, Métodos y Técnicas detallados, subtítulo “Metodología para estudio temporal de aves” se indica que: “En el caso de las aves pequeñas, serán anilladas para posterior monitoreo y liberadas”; al respecto, debido que no se evidencia de manera explícita la experiencia del investigador en el uso de la técnica de marcaje por anillamiento, se debe sustentar esta experiencia incluyéndolo en la hoja de vida, o indicar la experiencia de alguno de los otros investigadores participantes; ii) Indicar el tipo de anillos a utilizar y definir el término “aves pequeñas”; iii) Presentar mayores detalles metodológicos en relación a la manipulación de las aves durante el marcaje, y la extracción de muestras de sangre y plumas; además, acotar las medidas de bioseguridad que se contemplaran durante estos procedimientos, asimismo, se debe considerar en todo momento los criterios de bienestar animal (Ley 30407, 2016); iv) Detallar los datos del/los laboratorio (s) donde se realizarán los estudios moleculares (extracción, amplificación y secuenciamiento) a partir de las muestras colectadas, indicando el nombre de la institución, nombre del responsable del laboratorio, dirección legal de la institución, teléfono y correo electrónico de contacto, asimismo, se deberá informar cuál será el destino de las muestras remanentes de sangre y plumas luego de realizado los análisis; v) En relación a la sección 7, Detalle y Justificación de la colecta definitiva y/o Captura temporal, no se indica el número de individuos por especie de los que se extraerán muestras; en ese sentido, se deberá incluir una tabla donde se indique la especie, el número máximo de individuos de donde se extraerá muestra (para sangre y pluma) por cada localidad y si se trata de una especie protegida (D.S. N° 004-2014-MINAGRI), especie CITES como las especies de la familia Trochilidae), o con endemismo marcado; y vi) Finalmente en caso de contar con la autorización de ingreso al Área de Conservación Privada La Verónica, adjuntarlo;

Que, mediante correo electrónico de fecha 8 de mayo de 2020, el administrado remitió la subsanación de las observaciones comunicadas, conforme se precisa a continuación: i) Adjuntó su CV, como sustento de su experiencia en manejo de aves, anillamiento y toma de muestras; ii) Señaló que los tipos de anillos y el uso de "aves pequeñas" están aclarados en el Anexo II del documento adjunto; iii) Remitió un nuevo plan de investigación con las precisiones solicitadas e inclusión de un nuevo cronograma de trabajo extendiendo la investigación por un periodo de doce (12) meses; iv) Remitió la lista de especies en el Anexo I del documento adjunto; y v) Con respecto al ACP Santuario de la Verónica, indicó que cuenta con un acuerdo oral y un compromiso escrito del propietario, el mismo que informó de la redacción de la carta de autorización de este año, no obstante debido al retraso de la autorización y el contexto actual, no se ha podido concretar la suscripción de dicha carta; subsanando así las observaciones comunicadas;

Que, a través de la Resolución Ministerial N° 0177-2020-MINAGRI, expedida el 31 de julio de 2020, se aprobó el “Protocolo para la implementación de medidas de vigilancia, prevención y control frente al COVID-19 en las actividades de fauna silvestre”;



Que, mediante Informe Técnico N° D000642-2020-MIDAGRI-SERFOR-DGSPFS, emitido el 14 de diciembre de 2020 y cuyo contenido forma parte integrante de la presente resolución; la DGSPFS precisa que la presente investigación prevé la captura temporal in situ de especímenes de la Clase Aves, para marcaje, para toma de datos biométricos y obtención de muestras de sangre, plumas y la colecta de artrópodos ectoparásitos encontradas en las aves capturadas; para realizar el análisis genético con fines taxonómicos;

Que, asimismo, tras el análisis de las conclusiones y recomendaciones expuestas en el referido informe técnico; se desprende, entre otros, lo siguiente: i) De acuerdo a los objetivos, métodos y técnicas detallados en el plan de investigación, el estudio no representa un riesgo para las poblaciones silvestres presentes en el área de estudio; ii) La presente investigación reviste de importancia porque permitirá generar información referido al sexo de aves alto andinas monocrómicas de los bosques de Yanacocha y el ACP Santuario de la Verónica, Cusco a través de herramientas moleculares; iii) El área de estudio de la presente investigación se circunscribe a la localidad de Yanacocha, ubicada en el distrito de Huayllabamba y al ACP Santuario de la Verónica, ubicada en el distrito de Ollantaytambo, previa autorización para el ingreso y desarrollo de la investigación que nos ocupa, emitida por el responsable o representante de dicha ACP; ambos ubicados en la provincia de Urubamba y departamento de Cusco; iv) La solicitud materia de evaluación, cumple con todos los requisitos exigidos en el numeral 26 del Anexo N° 2 del Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, y en los lineamientos para el otorgamiento de la autorización con fines de investigación de flora y/o fauna silvestre; por lo que se recomienda aprobar la solicitud de autorización presentada por el señor David Guevara Apaza, para realizar la investigación científica: “Determinación Sexual en aves monocrómicas a través de herramientas genéticas en la cordillera del Vilcanota”, por el periodo de doce (12) meses, según el cronograma de trabajo presentado; v) Corresponde incorporar en la Resolución de Dirección General que apruebe la autorización de investigación científica, como parte de las obligaciones, el implementar las medidas dispuestas en el “Protocolo para la implementación de medidas de vigilancia, prevención y control frente al COVID-19 en las actividades de fauna silvestre”, establecidas en los numerales 8, 11, 12 y 12.1.3, en lo que resulte aplicable; protocolo aprobado por Resolución Ministerial N° 0177-2020-MINAGRI; y vi) Corresponde incorporar como parte de los compromisos, la aplicación de medidas en campo que garanticen la protección y bienestar de los especímenes a estudiar durante la ejecución del proyecto, además de implementar protocolos de bioseguridad, necesarios para evitar las zoonosis procedentes de las poblaciones de fauna silvestre;

Que, de conformidad con lo establecido en la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, el Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, aprobado mediante Decreto Supremo N° 019-2015-MINAGRI, el TUO de la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, aprobado por Decreto Supremo N° 004-2019-JUS; así como, en ejercicio de las atribuciones conferidas por el literal g) del artículo 53 del Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI;



SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Otorgar la autorización con fines de investigación científica de fauna silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas, al señor **David Guevara Apaza**, investigador de nacionalidad peruana, identificado con DNI N° 70386803, para la realización de la investigación científica titulada: **“Determinación Sexual en aves monomórficas a través de herramientas genéticas en la cordillera del Vilcanota”**, en virtud de las consideraciones antes expuestas; correspondiéndole el **Código de Autorización N° AUT-IFS-2020-060**.

Artículo 2°.- La autorización de investigación científica otorgada, implica la captura temporal in situ de especímenes de la Clase Aves, para marcaje, toma de datos biométricos y colecta de muestras de sangre, plumas y artrópodos ectoparásitos encontradas en las aves capturadas; para realizar el análisis genético con fines taxonómicos; a ser realizado en la localidad de Yanacocha, distrito de Huayllabamba, departamento Cusco y en el ACP Santuario de la Verónica, distrito de Ollantaytambo, departamento Cusco, de acuerdo a lo descrito en el Anexo 1 adjunto. Sin embargo, el ingreso al ACP Santuario de la Verónica, corresponde ser autorizado previamente, por lo que es responsabilidad del señor David Guevara Apaza, gestionar la citada autorización; es decir, la presente autorización de investigación, no comprende la autorización que debe ser emitida por el responsable del ACP citada, respecto al ingreso y desarrollo de la investigación que nos ocupa.

Artículo 3°.- El marcaje únicamente será realizado para aves pequeñas, especies de diversas familias que no superen 30 cm de la cordura alar y que el tamaño del anillo metálico sea menor a 5.56 mm, serán anilladas con anillos de aluminio para posterior monitoreo y liberadas luego de la toma de datos.

Artículo 4°.- En mérito a la autorización que precede, el señor David Guevara Apaza se encuentra sujeto al cumplimiento del cronograma de trabajo aprobado, el cual comprende un periodo de doce (12) meses, a ser contabilizados a partir del día hábil siguiente de la fecha de notificación de la presente resolución.

Artículo 5°.- Autorizar la participación de los investigadores propuestos por el señor David Guevara Apaza, para integrar el correspondiente equipo de investigación, conforme se detalla a continuación:

Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Documento de Identidad	Cargo	Institución
Julia Griselda Muñiz Durand	Peruana	DNI N° 23822964	Colaboradora	UNSAAC
Rubens Brayan Ñaca Tuco	Peruana	DNI N° 70329961	Co-investigador	UNSAAC
Erick Waldir Huamán Vargas	Peruana	DNI N° 76476962	Co-investigador	UNSAAC
Karen Marcela Miranda Pino	Peruana	DNI N° 75157942	Colaboradora	UNSAAC

Artículo 6°.- En atención a la autorización otorgada, el titular adquiere las siguientes obligaciones:

- No extraer especímenes ni muestras biológicas de fauna silvestre no



autorizadas, no ceder los mismos a terceros, ni utilizarlos para fines distintos a lo autorizado.

- b) Cumplir con el plan de investigación aprobado, el cual incluye la metodología, área de estudio, cronograma de trabajo, entre otros.
- c) No contactar ni ingresar a territorios comunales, sin contar con la autorización del representante legal de la comunidad correspondiente.
- d) Solicitar el correspondiente Permiso de Exportación ante la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, así como pasar el control respectivo, en caso se requiera enviar al extranjero parte del material colectado, por razones científicas acotadas. Los ejemplares únicos de los grupos taxonómicos colectados y holotipos, solo podrán ser exportados en calidad de préstamo.
- e) Entregar a la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, una (01) copia del informe final (incluyendo versión digital) como resultado de la autorización otorgada, copias del material fotográfico, diapositivas y cualquier otro material que pueda ser utilizado para difusión. Asimismo, entregar una (01) copia de las publicaciones producto de la investigación realizada en formato impreso y digital. El formato de informe final que debe ser usado, se encuentra en el Anexo 2 adjunto.
- f) El cumplimiento de lo señalado en el literal e), no deberá exceder los seis (06) meses posteriores al término de vigencia de la presente autorización.
- g) Los derechos otorgados a través de la presente autorización, no eximen al titular de contar con la autorización respectiva para el ingreso a predios privados ni a áreas comprendidas en títulos habilitantes, por lo que es responsabilidad del titular gestionar las autorizaciones necesarias.
- h) Implementar, en lo que resulte aplicable, las medidas dispuestas en los numerales 8, 11, 12 y 12.1.3 del "Protocolo para la implementación de medidas de vigilancia, prevención y control frente al COVID-19 en las actividades de fauna silvestre", aprobado por Resolución Ministerial N° 0177-2020-MINAGRI.

Artículo 7°.- El titular de la autorización se compromete a:

- a) Comunicar con anticipación a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre de Cusco del SERFOR, el ingreso y salida a campo para la realización de las actividades de investigación.
- b) Solicitar anticipadamente ante la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR y dentro del plazo de vigencia de la autorización, cualquier cambio en las características del estudio aprobado (V.g. cronograma, inclusión de especialistas, etc.), que demande la modificación de la presente resolución.
- c) Indicar el número de la resolución en las publicaciones generadas a partir de la autorización concedida.
- d) Aplicar medidas de campo que garanticen la protección y bienestar de los especímenes a estudiar durante la ejecución de la investigación, además de implementar protocolos de bioseguridad, necesarios para evitar las zoonosis procedentes de las poblaciones de fauna silvestre.
- e) En caso sobrevenga algún hecho o evento que imposibilite la ejecución de la investigación autorizada o que origine que no se pueda continuar con el desarrollo de la misma, corresponde al titular solicitar por escrito ante la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, la renuncia a la autorización otorgada; renuncia que



deberá ser solicitada dentro del plazo de vigencia de la autorización, precisándose el hecho o evento que origina la imposibilidad de ejecutar o de continuar ejecutando la investigación aprobada, debiendo además el titular adjuntar la documentación de sustento que estime necesaria, de ser el caso.

Artículo 8°.- El incumplimiento de las obligaciones y/o compromisos adquiridos por el titular, podrá constituir una causal para denegar futuros actos administrativos o títulos habilitantes a nivel institucional, sin perjuicio del ejercicio de las acciones civiles, administrativas y/o penales que correspondan.

Artículo 9°.- La Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre del SERFOR, no se responsabiliza por accidentes o daños sufridos por el titular ni por los investigadores que participarán en el estudio; asimismo, se reserva el derecho de demandar al titular los cambios a que hubiese lugar en los casos en que se formulen ajustes sobre la presente autorización.

Artículo 10°.- Notificar la presente resolución y el Informe Técnico N° D000642-2020-MIDAGRI-SERFOR-DGSPFS, al señor David Guevara Apaza; para su conocimiento y fines.

Artículo 11°.- Remitir la presente resolución a la Dirección General de Información y Ordenamiento Forestal y de Fauna Silvestre, a la Dirección de Control de la Gestión del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, y a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre de Cusco del SERFOR; para su conocimiento, seguimiento y/o verificación de ejecución.

Artículo 12°.- Disponer la publicación de la presente resolución en el portal web del SERFOR: www.gob.pe/serfor.

Regístrese, comuníquese y publíquese,

Documento firmado digitalmente

Miriam Mercedes Cerdán Quiliano

Directora General

Dirección General de Gestión Sostenible del
Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre

Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR



RESOLUCIÓN DE DIRECCIÓN GENERAL

ANEXO 1

Coordenadas referenciales de las localidades propuestas para el desarrollo del proyecto ubicado en el departamento de Cusco

Localidad	Distrito	Provincia	Departamento	UTM - WGS 84 (Zona 18)		Situación frente a una ANP
				Este	Norte	
Yanacocha	Huayllabamba	Urubamba	Cusco	819712	8529388	Fuera de ANP
ACP Santuario de la Verónica	Ollantaytambo	Urubamba	Cusco	785856	8540413	Fuera de ANP

Código: CBI-UNSAAC2020-003

INFORME FINAL DE ASPECTOS BIOÉTICOS DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Datos del Investigador Principal

Nombre: Bach. David Guevara Apaza

Facultad: Facultad de Ciencias.

Departamento: Biología.

Universidad: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

Correo electrónico: 134093@unsaac.edu.pe

Teléfono: 932918059

Datos del Proyecto de investigación

Título: “Determinación sexual mediante los genes CHD-1 en picaflores neotropicales altoandinos monocromáticos de bosques de Polylepis en la cordillera del Vilcanota, Cusco”.

Fecha de ingreso: 16-11-2020

Fecha de emisión de informe final: 18-02-2021.

Resultado de la evaluación a aspectos bioéticos: APROBADO.

Observaciones: El proyecto de Tesis presentado a consideración del Comité de Bioética Institucional de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (CBI-UNSAAC), ha sido evaluado por el CBI-UNSAAC y por el Sub Comité de Bioética Institucional de estudio con animales, vegetales y/o material genético no humano de la UNSAAC, emitiendo un informe donde se consideró observaciones tanto desde el punto de vista bioético como desde el punto de vista metodológico. El Sr. Bach. David Guevara Apaza, autor del proyecto, cumple con el levantamiento de observaciones además de entregar las autorizaciones respectivas para llevar a cabo el estudio, material que ha sido revisado. El CBI-UNSAAC emite el resultado final de la evaluación.

Atentamente,

Dr. Ramón Figueroa Mujica.
Presidente del Comité de Bioética Institucional de la UNSAAC
comite.bioetica@unsaac.edu.pe