



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN PROBABLE DE UN  
INDIVIDUO DE GUACAMAYA VERDE (*Ara militaris  
mexicanus*, RIDGWAY 1915) MEDIANTE TÉCNICAS  
MOLECULARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JESSICA JUAN ESPINOSA

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. FRANCISCO ALBERTO RIVERA ORTÍZ

**ASESOR INTERNO:**

M. EN C. GENARO MONTAÑO ARIAS

CIUDAD DE MÉXICO, 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **JUAN ESPINOSA JESSICA**, con número de cuenta **308123832**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **13 de marzo de 2018** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Biól. CRISTÓBAL GALINDO GALINDO

**VOCAL** Dr. FRANCISCO ALBERTO RIVERA ORTIZ\*

**SECRETARIO** M. en C. GENARO MONTAÑO ARIAS

**SUPLENTE** M. en E.S. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

**SUPLENTE** Dr. GABRIEL GUTIÉRREZ GRANADOS

El título de la tesis que presenta es: **Identificación del origen probable de un individuo de guacamaya verde (*Ara militaris mexicanus* Ridgway, 1915) mediante técnicas moleculares.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 06 de febrero de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
  
ZARAGOZA DIRECCION

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por ser mi hogar y por esta maravillosa profesión que es la Biología.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala que me abrió las puertas para culminar esta etapa y por ser parte importante de mi formación académica.

Gracias especialmente al Dr. Francisco Alberto Rivera Ortíz por darme la oportunidad de llevar a cabo la tesis bajo su dirección, por las enseñanzas, el conocimiento compartido, el tiempo dedicado a este proyecto, por su paciencia, pero sobre todo, por ser un excelente ser humano y un gran ejemplo a seguir.

Gracias a mi asesor interno M. en C. Genaro Montaña Arias por la confianza, el apoyo y los consejos que siempre brinda en ámbitos académicos y personales a cada uno de sus alumnos.

A la Dra. Sofía Solórzano Lujano por brindarme el espacio para realizar el trabajo experimental, por sus consejos y su paciencia en mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular de la FESI. A Fabián Macías y Nelly M. López por el grato compañerismo.

A la Dra. María del Coro Arizmendi por permitirme realizar el servicio social y animarme a continuar la tesis en el Laboratorio de Ecología FESI.

A mis sinodales Biol. Cristóbal Galindo Galindo, M. en E. S. María Cristina Alvarado Domínguez y el Dr. Gabriel Gutiérrez Granados, por los comentarios y observaciones que ayudaron a enriquecer y mejorar el trabajo.

A la UMA Fundación AFP OCEAN por las muestras de guacamaya verde que fueron la base de este proyecto.

## DEDICATORIA

A mis padres Natalia Espinosa y Francisco Juan por su amor incondicional, por comprenderme, apoyarme y tenerme paciencia en todo el transcurso de mi vida, principalmente en esta etapa que culmina. Gracias por sus enseñanzas, por todo el esfuerzo y los sacrificios que han hecho, los amo.

A mis hermanos Francisco y Julio por los buenos y malos momentos que hemos estado juntos, por sus enseñanzas y todas las cosas buenas que me han dado, los quiero mucho.

A Laura por darnos a esa pequeña alegría llamada Camila, porque en momentos difíciles también has estado para escucharme y ¿por qué no? para regañarme cuando hace falta. Alejandra por los consejos y los ánimos, ya tendré oportunidad de regresártelos, sigue adelante.

A mis padrinos Marcelo† y Leonor por quererme como una hija más, a mi padrino donde quiera que estés, espero estés orgulloso de mí. A mis abuelos. A mi tía Roselia por ser mi segunda mamá y al mismo tiempo mi hermana mayor, por los dos pequeños traviesos que han sido mi alegría, aunque también me saquen de quicio, los quiero Fer y Jorge. A Jorge S. por el apoyo y el cariño.

Paco Beto por aceptarme como tú alumna, por la confianza en que podía lograr este proyecto. Infinitas gracias por tus enseñanzas, por compartirme tus experiencias, por los consejos académicos y personales, siempre eh dicho a todos que no podría tener mejor director, te admiro y respeto. También por no rendirte conmigo para que siga el camino de la Genética y la Ecología... y las guacamayas.

Gracias a todo el Laboratorio de Ecología de la UBIPRO, FESI. Ana Contreras, María Félix, Andrés Reséndiz, Marlen, Gabriel Segoviano, Jessica y Salomón Sanabria todos excelentes personas, grandes investigadores de la ciencia y compañeros, porque todos me abrieron las puertas y compartieron conocimientos, vivencias y momentos agradables que me ayudaron consciente o inconscientemente a sobre llevar momentos estresantes.

Ahora no puedo dejar de lado a todas las personas que en un dado momento fueron y siguen siendo importantes en mi vida, mis amigos. Empezare con Viridiana por aguantarme durante más de diez años, por ser tan comprensiva, te quiero.

Nallely y Samanta que a pesar de que no hablamos constantemente las aprecio y recuerdo con cariño, gracias por todas las aventuras que vivimos, por compartir sus logros y sus hermosas familias, mis amigas de CCH.

Anita Cuautle, por ser mi sostén en momentos difíciles, escucharme, regañarme y seguir con esta amistad, te quiero. Pequeña Dany Mitzuki gracias por todo, has sido un apoyo muy importante estos últimos años, que esta amistad dure toda la vida. Lorena gracias por las tarde de películas y la comida, por ser tan divertida, por la amistad y por la mamá tan linda que compartes con todos. A Tefy por todos las cosas chidas que hemos hecho, por las charlas y la buena vibra, te quero. Paquito Sandoval, que aunque no tengas tiempo para verme (si es un reclamo) te extraño y te quiero, gracias por las largas charlas entre clases y

por soportarme; Archuro, Carlos, Katy, Vivi, Luis Javier, Ricardo Gen, Efraín (Tamandua), Diego y Wendy no me olvido de ustedes, por los magníficos momentos que pasé en clases y fuera de ellas (sobre todo en campo), gracias.

Irma, House, Maguito mis amigos de campo, de congreso, de laboratorio, de mamíferos, mapas, de estancias o más bien voluntariados, de cursos, de optativas en otras facultades, mis amigos de experiencias, de gomitas y una lista interminable de vivencias, de tener el gusto de poder llamarlos mis amigos. Gracias por entender mi amor por las aves (ya sé que van a decir que me fui con mis traicioneras aves, pero también me gustan los mamíferos), por acompañarme en crecimiento personal, académico y de experiencias inolvidables, sigamos juntos el camino de la biología, los amo.

*“Dentro de veinte años estarás más decepcionado de las cosas que no hiciste que de las que hiciste. Así que desata amarras y navega alejándote de los puertos conocidos. Aprovecha los vientos alisos en tus velas. Explora. Sueña. Descubre.” Mark Twain*

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	II
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	II
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1 Tráfico ilegal una amenaza para los psitácidos .....	4
1.2 Acciones de conservación de psitácidos en México.....	4
1.3 Genética de la Conservación .....	6
1.4 Sistema de estudio .....	8
1.4.1 Clasificación .....	8
1.4.2 Ciclo reproductivo .....	9
1.4.3 Alimentación .....	10
1.4.4 Problemática de la guacamaya verde .....	11
1.4.5 Genética de la guacamaya verde .....	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	15
GENERAL .....	15
PARTICULARES .....	15
<b>5. MÉTODOS</b> .....	16
5.1 Trabajo de gabinete .....	16
5.2 Extracción de ADN .....	16
5.3 Amplificación de secuencias de microsatélites .....	16
5.4 Secuenciación de microsatélites .....	17
5.5 Análisis de los datos.....	18
5.5.1 Análisis Factorial de Correspondencias (AFC) .....	18
5.5.2 Asignación genética.....	19
5.5.3 Maximizar el éxito de asignación.....	22
<b>6. RESULTADOS</b> .....	23
6.1 Análisis Factorial de Correspondencias (AFC).....	23
6.2 Asignación genética .....	25
6.3 Éxito de asignación .....	27

7.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	28
8.	<b>IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN</b> .....	30
9.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	32
10.	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	33
11.	<b>ANEXO</b> . Certificado de nacimiento del individuo en cautiverio.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Distribución potencial de la guacamaya verde ( <i>Ara militaris</i> ) en México. ....	9
<b>Figura 2.</b>	Estrucutra genética de <i>Ara militaris</i> en México. ....	12
<b>Figura 3.</b>	Mapa de las muestras de referencia: .....	13
<b>Figura 4.</b>	AFC bidimensional. Prueba 1 .....	23
<b>Figura 5.</b>	AFC bidimensional. Prueba 2.....	24
<b>Figura 6.</b>	AFC bidimensional. Prueba 3.....	24
<b>Figura 7.</b>	Proporción de ascendencia en STRUCTURE.....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Locus de microsatélites que se amplificaron .....	17
<b>Tabla 2.</b>	Probabilidades de asignación calculada con GENECLASS 2.0.....	26
<b>Tabla 3.</b>	Desempeño de los criterios de asignación implementados en GENECLASS 2.0. ...	27
<b>Tabla 4.</b>	Raking de loci realizado por WHICHLOCI con ocho microsatélites. ....	27



## RESUMEN

La guacamaya verde (*Ara militaris*) pertenece al orden de los Psitaciformes, uno de los grupos de aves más amenazados en el mundo. Los principales factores que las amenazan son la pérdida y fragmentación del hábitat y el tráfico ilegal. La estructura genética que presentan las poblaciones más grandes de *Ara militaris* registradas en México permite distinguir dos grupos genéticos a lo largo de tres áreas fisiográficas (Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur y Sierra Madre Oriental). El primer grupo comprende poblaciones de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur y el segundo comprende poblaciones de la Sierra Madre Oriental, que de acuerdo a la significativa diferenciación genética, estos dos grupos deben ser considerados como unidades de conservación independientes, específicamente como unidades de manejo (MUs). El objetivo de este estudio fue identificar el posible origen de un individuo en cautiverio mediante el uso de herramientas moleculares, en este caso el análisis de microsatélites y métodos de asignación que permitan tomar decisiones en planes de reintroducción a la vida silvestre, disminuyendo las probabilidades de provocar extinciones locales. Adicionalmente se evaluó el desempeño de cuatro criterios de asignación/exclusión que permiten determinar el éxito de asignaciones correctas y que amplifican las probabilidades de asignar correctamente al individuo en cautiverio con mayor seguridad. Los resultados obtenidos muestran que los ocho loci de microsatélites y los diferentes métodos de asignación arrojan probabilidades aceptables de que el posible origen del individuo en cautiverio es en la población de Santa María de Cocos, Querétaro. Con lo cual se concluye que es posible identificar poblaciones de origen aunque con probabilidades bajas, por lo que se vuelve necesario enfocar recursos disponibles en estudios sobre la diversidad genética de poblaciones que aún faltan por muestrear y de esta forma mejorar los éxitos de asignación ya que es una herramienta útil para de tomar decisiones de sitios de reintroducción y por otro lado reconocer sitios de intensa captura ilegal.

## 1. INTRODUCCIÓN

El orden de Psitaciformes está representado por 352 especies que incluyen cotorros, loros, pericos, guacamayas, cacatúas y periquitos (Juniper y Parr, 1998). Este orden es muy abundante en los subtrópicos alcanzando su máxima diversidad en América del sur, sureste de Asia y Australia (Collar, 1991).

El grupo presenta un gran número de especies en peligro de extinción, ya que de las 352 especies, el 26% de estas se encuentran amenazadas y a punto de extinguirse como lo es el guacamayo azul de spixii (*Cyanopsitta spixii*) (Collar, 2000). Esta situación se vuelve más evidente en el nuevo mundo donde cerca de 44 de las 146 representantes están en riesgo de extinción (Collar, 1996; Collar, 2000). Tan solo en México de las 22 especies que existen (Berlanga et al., 2015; Juniper y Parr, 1998), 20 se encuentran en alguna categoría de riesgo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 059-2010 (NOM-059-SEMARNAT-2010).

El número de especies amenazadas es mucho mayor para los psitácidos que cualquier otro grupo de aves (Collar, 2000; Collar y Juniper, 1992), entre las causas que las han llevado a estar en esta situación destacan dos factores principales: 1) la pérdida, fragmentación y degradación del hábitat (Collar, 1996; Macías et al., 2000) y 2) la explotación directa de ejemplares para el tráfico ilegal a nivel nacional e internacional de mascotas (Iñigo y Ramos, 1991; Collar y Juniper, 1992; Macías et al., 2000).

La pérdida del hábitat por el cambio de uso de suelo, es una de las principales amenazas para la biodiversidad (Primack, 2014), ya que modifica el hábitat adecuado y esencial para la supervivencia y reproducción exitosa de las especies (Lindenmayer y Fisher, 2013). Esta pérdida ocasiona la disminución de poblaciones que están sujetas a un rápido descenso y hay un mayor riesgo de extinción local a través de eventos estocásticos como: i) fluctuaciones demográficas debido a las variaciones en las tasas de natalidad y mortalidad; ii) fluctuaciones ambientales debido a catástrofes naturales que se producen a intervalos irregulares, tales como incendios, inundaciones o sequías y finalmente iii) la pérdida de la variabilidad genética (Saunders et al., 1991; Lindenmayer y Fisher, 2013; Primack, 2014; Frankham et al., 2004).

Collar (2000) menciona que la pérdida del hábitat es la principal amenaza para 71 especies de psitácidos en la Lista Roja (IUCN), ya que la mayoría de las especies

amenazadas ocurren en regiones donde la destrucción de la vegetación ha sido y continúa siendo particularmente severa (Collar y Juniper, 1992).

Recientemente se han desarrollado un conjunto de metodologías en las que se estima la distribución potencial de especies mediante el uso de modelos ecológicos de nicho, donde se evalúan cambios hipotéticos en la disponibilidad de hábitat (Marín-Togo et al., 2012; Monterrubio-Rico et al., 2011; Monterrubio-Rico et al., 2016; Ríos-Muñoz y Navarro-Sigüenza, 2009; Rivera-Ortíz et al., 2013). Para los psitácidos en México, Ríos-Muñoz y Navarro-Sigüenza (2009), analizaron la modificación de la cobertura vegetal durante tres periodos (1976, 1996 y 2000) y su influencia en la distribución hipotética de 22 especies, en los resultados obtenidos observan que hay una pérdida del 86% para *Ara macao*, especie potencialmente más afectada, hasta un 15% para *Aratinga brewsteri* con los valores de menor pérdida de hábitat.

En la costa central del Pacífico, las áreas donde existían bosques tropicales subcaducifolios han sido degradados a pastizales para ganadería, agricultura y plantaciones de frutales, a una tasa anual estimada de 0.65% (Monterrubio-Rico et al., 2014), que ha tenido drásticas consecuencias para el loro *Amazona oratrix* donde se estima ha tenido una pérdida de hábitat hipotética del 58% (Ríos-Muñoz y Navarro-Sigüenza, 2009). Para *Ara militaris* la distribución potencial hipotética se ha reducido un 29% para el año 2000 y hasta un 32% por el cambio de uso de suelo para el 2010 (Ríos-Muñoz y Navarro-Sigüenza, 2009; Rivera-Ortíz et al., 2013). Sin embargo, los modelos de distribución potenciales basados en hábitat pueden sobreestimar o subestimar la distribución actual de los psitácidos, ya que no se toma en cuenta que ciertas especies pueden ser extirpadas en una región debido a la fuerte captura y saqueo de nidos para el tráfico ilegal (Marín-Togo et al., 2012; Monterrubio-Rico et al., 2010). Algunas poblaciones de psitácidos en México han sido extirpadas de áreas en donde el hábitat se conserva, como ocurre en las costas del Pacífico con *Amazona oratrix*, *Amazona finschi* y la endémica *Forpus cyanopygius*, las cuales han disminuido su distribución original principalmente por la captura para el comercio ilegal (Cantú et al., 2007; Marín-Togo et al., 2012).

### **1.1 Tráfico ilegal una amenaza para los psitácidos**

Los psitácidos han sido el grupo de aves tropicales más directamente explotados por los humanos por cientos de años, debido a su belleza, carisma y habilidad para imitar la voz humana (Iñigo y Ramos, 1991; Macías et al., 2000).

La captura ha tenido efectos perjudiciales en las poblaciones debido a varias razones: disminuye las poblaciones, inhibe reproducciones futuras, causa la mortalidad de pollos y huevos abandonados, provoca la pérdida de sitios de anidación y la captura constante puede detener el crecimiento poblacional e incluso llevar a extirpaciones locales (Cantú et al., 2007).

En México el tráfico ilegal ha afectado negativamente a 19 de las 22 especies que hay en el país (Macías et al., 2000). Sin embargo, existen pocos estudios que arrojen datos sobre la cantidad de individuos capturados anualmente. La primer evaluación documentada por Cantú et al. (2007) estima que se captura un rango de 65,000 a 78,000 individuos al año para el tráfico ilegal. De estos individuos se calcula que hay una tasa de mortalidad acumulativa del 77% que se traduce en 50,000 a 60,000 ejemplares muertos anualmente, donde la pérdida es mayor durante el confinamiento debido a la mala alimentación, estrés y hacinamiento (Cantú et al., 2007; Iñigo y Ramos, 1991), y solo el 2% de estos individuos son decomisados por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) (Cantú et al., 2007).

### **1.2 Acciones de conservación de psitácidos en México**

Hasta hace más de 30 años el gobierno permitía la captura de diferentes especies de psitácidos, fue hasta el año 2003 que se prohibieron las capturas para todas las especies de psitácidos que presentan distribución en el país (Cantú et al., 2007). Actualmente la Ley General de Vida Silvestre (LGVS) en el Artículo 6o Bis 2, prohíbe la extracción de ejemplares de psitácidos que se distribuyen en el país, y solo otorga permisos con fines de conservación o investigación científica (LGEEPA SEMARNAT, 2016).

En el año 2000 se desarrolló el “Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de los Psitácidos en México” (PREP), en la que se evalúa el estado de amenaza de todas las especies y se proponen estrategias de conservación como en la guacamaya roja (*Ara macao*) que es una de las especies prioritarias de conservación y

recuperación, ya que su distribución se había reducido a la selva Lacandona y era la última población viable de esta especie (Iñigo, 1999). Con este proyecto se ha logrado la reintroducción de 45 ejemplares en Los Tuxtlas, Veracruz, llevada a cabo desde el 2014 a partir de una población criada en cautiverio en los aviarios de Xcaret en Quintana Roo (Ortiz-Pulido et al., 2016).

Por otro lado, los decomisos a partir del comercio ilegal realizados por la PROFEPA y otras instituciones del gobierno son resguardados en los Centros para la Conservación e Investigación de la Vida Silvestre (CIVS) donde esperan la decisión sobre su destino legal: investigación, cría en cautiverio en las Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) y exhibición en Zoológicos. Algunos ejemplares son reintroducidos a la vida silvestre, y aproximadamente el 45% muere en manos de la PROFEPA y dentro de los CIVS (Cantú et al., 2007).

De acuerdo a la LGVS las UMA tienen como objetivo general la conservación del hábitat natural, poblaciones y ejemplares de especies silvestres. De manera específica, las UMA podrán encaminar esfuerzos de recuperación, reproducción, reintroducción, investigación, entre otras prácticas de manejo (Moya et al., 2011). Sin embargo, considerando que la procedencia exacta de la mayoría de los individuos decomisados es desconocida, debido a que la captura pudo haber sido en diferentes sitios de origen, la liberación de los individuos incautados al medio natural debe ser llevada con precaución, ya que en algunos casos la mezcla entre diferentes poblaciones puede inducir a una depresión por exogamia en la población local (Edmands, 2007; Fernandes y Caparroz, 2013; Lynch, 1991).

La depresión exogámica es una reducción de la aptitud reproductiva, es decir, una reducción de la capacidad de aparearse, producir descendencia, fertilizar e incluso sobrevivir en las primeras o posteriores generaciones después de la cruce entre poblaciones (Edmands, 2007; Frankham et al., 2011). Esta pérdida de la aptitud puede ser debido a una disrupción en la adaptación local (interacciones entre individuos y el medio ambiente); sobredominancia o interacciones epistémicas (Edmands, 1999; 2007) que potencialmente pueden tener efectos nocivos (Edmands, 2007).

Edmands y Timmerman (2002), sugieren que, además de la distancia genética, otros factores como el tamaño de población, la tasa de mutación, la tasa de recombinación,

entre otros, pueden ser importantes y aumentar el riesgo de una depresión exogámica en las poblaciones. El problema con la hibridación es que las amenazas y los beneficios potenciales son tan difíciles de predecir (Edmands, 2015), ya que en algunos taxa, la hibridación a largo plazo resulta en una reducción de la aptitud física seguida de una recuperación, mientras que otros taxa aparentemente nunca se recuperan (Edmands, 2015).

Para evitar la depresión exogámica, los individuos incautados se deben liberar en poblaciones locales que son genéticamente y adaptativamente similares (Fernandes y Caparroz, 2013; Frankham et al., 2011; Presti et al., 2015).

### **1.3 Genética de la Conservación**

Durante las últimas dos décadas el papel de la genética en biología de la conservación y ecología en general ha hecho hincapié en gran medida (Pertoldi et al., 2007), estableciendo una nueva disciplina: la genética de la conservación cuyo principal objetivo es preservar las especies en peligro de extinción como entidades dinámicas capaces de enfrentar los cambios ambientales a largo plazo (Frankham et al., 2010).

Algunos de los enfoques en los que se centra la genética de la conservación son la pérdida de la diversidad genética, los efectos de la endogamia y en algunas ocasiones efectos de la exogamia, así como definir incertidumbres taxonómicas y definir unidades de manejo dentro de las especies (Allendorf et al., 2012; Frankham et al., 2010) entre otros.

La diversidad genética es el conjunto de variaciones heredables (alelos y genotipos) que se producen en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Hartl y Clark, 1997). Esta diversidad genética es necesaria para que las poblaciones o especies respondan a cambios ambientales importantes (Frankham et al., 2010; Pertoldi et al., 2007), y proporciona una visión retrospectiva de los linajes evolutivos de los taxa, la estructura actual dentro y entre poblaciones, y una visión hacia el futuro potencial evolutivo de las poblaciones y especies (Allendorf et al., 2012).

En pequeñas poblaciones la pérdida de la variabilidad genética aumenta la probabilidad de sufrir una serie de efectos genéticos deletéreos como la depresión por

endogamia (apareamiento entre congéneres), la depresión por exogamia (e. g. polinización cruzada) y la pérdida del potencial evolutivo (Hedrick, 2011; Primack, 2014).

En la genética de la conservación el uso de marcadores genéticos nos permiten identificar poblaciones con diversidad genética reducida y generalmente más vulnerables a un posible cambio ambiental, así como distinguir subpoblaciones genéticamente diferenciadas del resto para dirigir los esfuerzos de conservación hacia ellas, también permiten descubrir genealogías génicas y conocer el grado de parentesco entre individuos (González, 2003).

Uno de los marcadores más utilizados son los microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSR por sus iniciales en inglés), estos son, como lo dice su nombre, secuencias repetidas en tándem (1 a 6 pb), se encuentran en regiones codificantes (aunque con baja frecuencia) y no codificantes (Schlötterer, 2004; Zane et al., 2002). Algunas características de estos marcadores que son considerados como importantes ventajas son: que presentan un elevado grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple y son codominantes (Aranguren-Méndez et al., 2005; González, 2003).

Debido a estas particulares ventajas, el uso de microsatélites permite abordar problemas como pruebas de paternidad (Fridolfsson et al., 1997), estructura genética poblacional (Leite et al., 2008), distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Paetkau et al., 1997), así como definir unidades de conservación (Frankham et al., 2010) lo que demuestra que su uso resulta muy adecuado tanto a nivel específico como individual y su aplicación en conservación es amplia (González, 2003).

De esta forma la genética de la conservación y el uso de marcadores genéticos ayudan a los gestores a proteger la biodiversidad mediante la identificación de unidades de conservación que son: Unidades Evolutivamente Significativas (ESUS), Manejo de Unidades (MUs), Unidades de Acción (AUs) y Redes Familiares (FRs) (Qiu-Hong et al., 2004).

Toda la información expuesta sirve como marco teórico para entender el caso de un individuo de guacamaya verde que es parte de un programa de reproducción y reintroducción en una UMA ubicada en Querétaro. Siguiendo el concepto de Unidades de Acción, donde la diversidad genética tanto de poblaciones silvestres candidatas para la reintroducción y poblaciones cautivas deben ser investigadas para definir sitios apropiados en las que la variabilidad genética es similar en ambas poblaciones (Qiu-Hong et al., 2004).

## 1.4 Sistema de estudio

### 1.4.1 Clasificación

De acuerdo a Joseph et al. (2012) ponen el orden Psitaciforme como un grupo monofilético que se divide en tres familias: i) Cacatuidae (cacatúas) con seis géneros y 21 especies, ii) Strigopidae (loros de Nueva Zelanda) con dos géneros y tres especies, y iii) Pittacidae (loros y guacamayas verdaderas) que incluye 78 géneros y 330 especies distribuidas en los trópicos y subtrópicos de América, África, Asia y Australia (Forshaw, 1989; Joseph et al., 2012).

La familia Psittacidae está conformada por cinco subfamilias, la subfamilia Arinae está constituida por 30 géneros con 148 especies, siendo uno de los más representativos el género *Ara* (guacamayas) (Collar, 1997; Forshaw, 1989), dentro de esta gran familia se encuentra la especie *Ara militaris* que tiene una distribución fragmentada en las regiones tropicales y subtropicales desde el norte de México hasta el noroeste de Venezuela, noroeste de Bolivia, este-sur de Colombia, este de Ecuador, noroeste de Perú y noroeste de Argentina (Forshaw, 1989; Iñigo, 1999; Strewé y Navarro, 2003).

Actualmente el ITIS (Integrated Taxonomic Information System, consultado el 22 de diciembre del 2016), reconoce tres subespecies: *A. m. militaris* (Linnaeus, 1766); *A. m. bolivianus* (Reichenow, 1908) y *A. m. mexicanus* (Ridgway, 1915).

La subespecie *A. m. mexicanus* solo se distribuye en México de forma fragmentada en colonias aparentemente aisladas en dos áreas separadas (Howell y Webb, 1995), la primera en la vertiente del Pacífico en regiones tropicales secas, desde el sureste de Sonora pasando por Chihuahua hasta Chiapas (Howell y Webb, 1995; Peterson y Chaliff, 1989), y la segunda en la vertiente del Golfo donde se ha reportado en Tamaulipas, San Luis Potosí y Querétaro (Arizmendi y Márquez, 2000; Iñigo, 1999; Howell y Webb, 1995; Peterson y Chaliff, 1989). En el interior del país se localiza en el Sótano del Barro en Querétaro y en la Cañada Cuicateca en Oaxaca (Contreras-González et al., 2009; Gaucín, 2000; Rivera-Ortíz et al., 2008) (Figura 1).





**Figura 1.** Distribución potencial de la guacamaya verde (*Ara militaris*) en México. Tomado y modificado de CONABIO (2011). Fichas de especies prioritarias.

#### 1.4.2 Ciclo reproductivo

La guacamaya verde en México se reproduce en bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios que se localizan entre los 200 y 2200 msnm (Collar y Juniper, 1992; Forshaw, 1989; Howell y Webb, 1995), aunque Necedal et al. (2006), reportan una población de guacamaya verde que anida en árboles de pino en la sierra de Durango a más de 2200 msnm. Presenta dos formas de anidación; en el bosque tropical seco se le observa anidar en agujeros de riscos de roca caliza y en el bosque tropical subcaducifolio y de pino-encino anida en agujeros de árboles vivos y muertos con un Diámetro a la altura del pecho (D.A.P) mayor a los 60 cm, lo que podría significar que prefieren árboles más altos y longevos (Carreón, 1997; Gómez, 2004; Necedal et al., 2006; Rivera-Ortíz et al., 2008; Rivera Ortiz et al., 2013).

El inicio de la reproducción varía de acuerdo a la zona de distribución, Carreón (1997) reporta que la reproducción inicia en octubre con el cortejo y termina en marzo con el vuelo de los primeros volantones en la zona de la vertiente del Pacífico, y en algunos

lugares de la Sierra Madre Occidental se reproducen de abril a noviembre (Nocedal et al., 2006). En la zona del centro del país y en la vertiente del Golfo de México, Gaucín (2000) y Rivera-Ortíz et al. (2008) reportan que el inicio de la reproducción empieza en diciembre-enero con el cortejo y termina en julio-septiembre con el vuelo de los volantones.

El comportamiento de anidación de la guacamaya verde es muy parecido a otras especies de psitácidos (e. g. Monterrubio-Rico et al., 2002; Fernandes-Seixas y Mourao, 2002). El ciclo reproductivo está representado por seis periodos: i) cortejo y formación de parejas, ii) selección de cavidades, iii) copulación, iv) incubación, v) crianza de pollos y vi) vuelos de los juveniles (Carreón, 1997; Gaucín, 2000; Gómez, 2004; Loza, 1997; Rivera-Ortíz et al., 2008). El éxito reproductivo es bajo, alrededor del 8.5% al 23.3% de los pollos alcanzan a ser juveniles (Gaucín, 2000; Rivera-Ortíz et al., 2008) y solo en una población se ha reportado un éxito reproductivo del 66% (Carreón, 1997), de los cuales se estima que no alcanzan la madurez sexual hasta los tres o cuatro años (Iñigo, 1999).

### **1.4.3 Alimentación**

La guacamaya verde realiza migraciones altitudinales hacia diferentes tipos de vegetación que se encuentran entre los 60 a 2300 msnm. Durante estos movimientos migratorios utilizan el bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio y bosques de encino de tierras bajas (Contreras-González et al., 2009; Gaucín, 2000). El cambio en la abundancia de los recursos alimenticios es el factor que se ha propuesto como la causa de los desplazamientos altitudinales en *Ara militaris* como en otras especies de aves frugívoras (Codensido y Bilenca, 2004; Contreras-González et al., 2009; Karubian et al., 2005; Symes y Perrin, 2003).

Se alimentan principalmente de semillas y frutos aunque pueden complementar su dieta con vainas, hojas e insectos (Contreras-González et al., 2009; Iñigo, 1999). Se considera que la guacamaya verde presenta una dieta especializada ya que solo consume del 10 al 23% de los recursos disponibles (Contreras-González et al., 2009; Iñigo, 1999). Las especies arbóreas que forman parte de su dieta presentan una marcada estacionalidad entre las cuales se destacan: *Cyrtocarpa*, *Bursera*, *Celtis*, *Brosimum*, *Plumeria*, *Quercus*, *Lysuloma*, *Bunchosnia* y *Pseudobombax*, las cuales presentan una gran cantidad de

proteínas y lípidos, que son indispensables en la época reproductiva (Carreón, 1997; Contreras-González et al., 2009; Gaucín, 2000; Iñigo, 1999).

#### **1.4.4 Problemática de la guacamaya verde**

Se estima que la guacamaya verde tiene una población mundial en un rango que va de los 10,000 a los 20,000 individuos (Birdlife International, 2016). En los últimos 70 años las poblaciones de esta especie han disminuido drásticamente en el país, poniendo en riesgo su viabilidad biológica (Iñigo, 1999). Esta especie es considerada amenazada a nivel mundial en el Apéndice I de la CITES, vulnerable por la UICN en la redList y bajo riesgo en peligro de extinción en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en México.

Se ha propuesto que la fragmentación del hábitat y el cambio de uso de suelo son una de las principales amenazas para sus poblaciones que la han llevado al declive poblacional (Ríos-Muñoz y Navarro-Sigüenza, 2009; Rivera-Ortíz et al., 2013). Otro factor que amenaza sus poblaciones es el saqueo de individuos en los sitios de reproducción para el comercio ilegal (Iñigo, 1999). Sin embargo, aún no hay un estudio donde evalúen la magnitud de este saqueo sobre las poblaciones silvestres.

En conjunto estos factores (fragmentación, pérdida de hábitat y el saqueo de nidos) han colocado a la guacamaya verde, una de las especies más carismáticas del continente americano, en un estado de conservación amenazado pero poco documentado (Iñigo, 1999).

#### **1.4.5 Genética de la guacamaya verde**

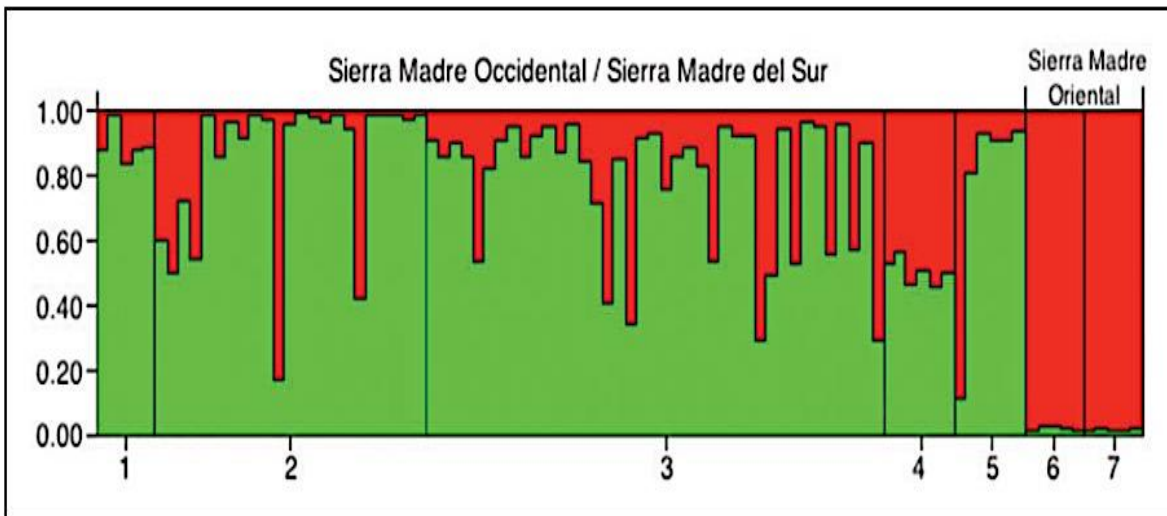
En el caso de las guacamayas, los estudios de los niveles de diversidad genética han sido principalmente en América del Sur (Faria et al., 2008; Caparroz et al., 2003), donde se ha encontrado cierta correlación entre la diversidad genética y el nivel de amenaza (Rivera-Ortíz et al., 2017). En México existen pocos estudios de diversidad genética en psitácidos.

Para la guacamaya verde, Eberhard et al. (2015) reportan mediante el análisis filogeográfico de secuencias mitocondriales una clara diferenciación genética que separa las poblaciones de Suramérica de las poblaciones de México, dando un soporte genético a la división de subespecies que anteriormente se basaban principalmente en caracteres morfológicos.

Por otro lado Rivera-Ortíz et al. (2017) en un estudio sobre la diversidad y estructura genética que presentan las poblaciones remanentes de la guacamaya verde en México mediante análisis de datos de secuencias de microsátelites (ADN nuclear), se encontró que las poblaciones muestreadas presentan niveles moderados de riqueza alélica y heterocigocidad que son similares a otras especies del género *Ara*, aunque la diversidad de *Ara militaris* en México fue menor que la encontrada para otras guacamayas del mismo género en América del sur.

Por otro lado tanto los análisis con ADN mitocondrial (Eberhard et al., 2015) y de ADN nuclear (Rivera-Ortíz et al., 2017) de poblaciones en México muestran una estructura genética con una concordancia geográfica, que diferencia las poblaciones de la Sierra Madre Oriental de las poblaciones de la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del Sur.

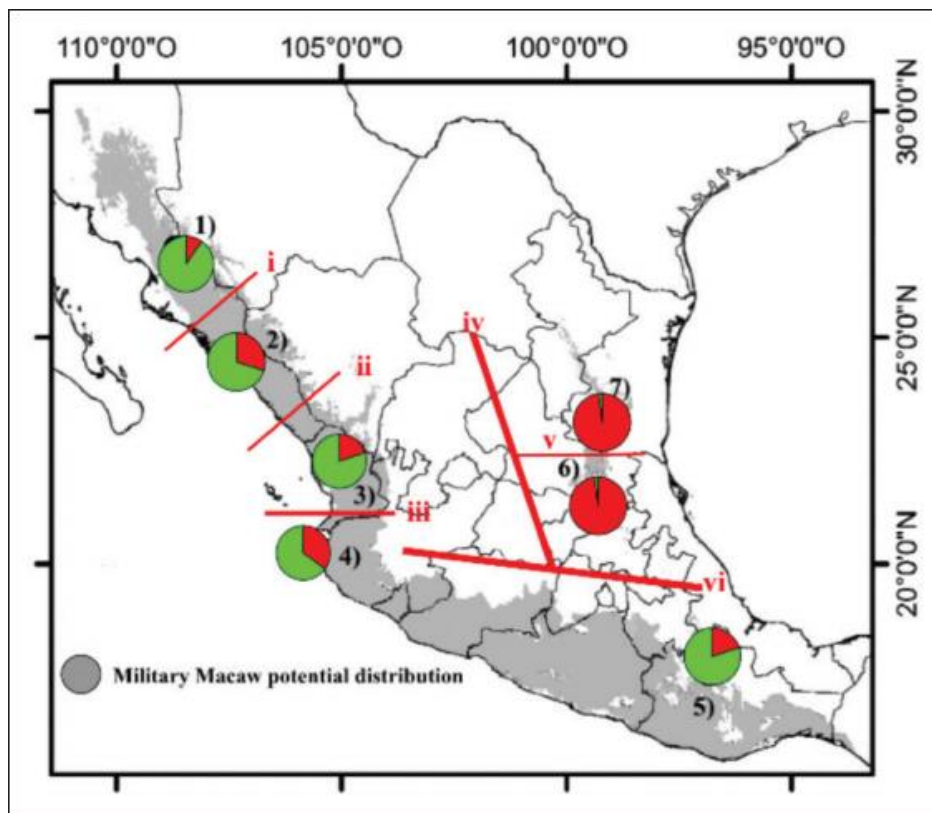
Estos resultados proponen que el aislamiento geográfico es aparentemente responsable del aislamiento evolutivo debido a la presencia de barreras geográficas como las cadenas montañosas que hay en el país (Eberhard et al., 2015; Rivera-Ortíz et al., 2017). De esta forma Rivera-Ortíz et al. (2017) propone la protección de dos grupos genéticos encontrados en las tres regiones fisiográficas como unidades de conservación prioritarias independientes (MUs) (Figura 2 y 3).



**Figura 2.** Estructura genética de *Ara militaris* en México. Cada color representa un grupo genético.

Cada línea vertical representa a un individuo donde los segmentos de color representan la proporción de su pertenencia a un grupo. Las líneas negras separa a las diferentes poblaciones de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur (1=Sonora, 2=Sinaloa, 3=Nayarit, 4=Jalisco y 5=Oaxaca) y de la Sierra Madre Oriental (6=Querétaro y 7=Tamaulipas) (Rivera-Ortíz et al. 2017).

Con base en la información presentada y disponible, la presente investigación tuvo como objetivo estudiar el origen probable de un individuo de guacamaya verde que es un ejemplar criado en cautiverio y cuyos progenitores son ejemplares donados por pobladores de Santa María de Cocos, Querétaro. Este individuo fue seleccionado para una posible liberación en esta zona. Los procedimientos aprobados por la Ley General de Vida Silvestre en el Capítulo 10 sobre la liberación de ejemplares al hábitat natural por la CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), incluye una evaluación genética previa de los ejemplares, para determinar el origen de los individuos, que muestre que sus características genéticas son viables para una posible liberación.



**Figura 3.** Mapa de las muestras de referencia: Localidades muestreadas por Rivera-Ortíz et al. (2017) (1=Sonora, 2=Sinaloa, 3=Nayarit, 4=Jalisco, 5=Oaxaca, 6=Querétaro y 7=Tamaulipas). Los números romanos indican barreras genéticas y/o geográficas entre las localidades: las líneas delgadas indican barreras débiles (20%) y las líneas gruesas indican barreras fuertes (95%) (Rivera-Ortíz et al. 2017), estas últimas corresponden a las principales cadenas montañosas del país.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El creciente interés científico por conservar las especies en peligro de extinción como la guacamaya verde (*Ara militaris*), exige estrategias de conservación que integren métodos genéticos que permitan identificar el origen de ejemplares en cautiverio o provenientes de decomisos del tráfico ilegal. La importancia de realizar estos análisis genéticos es primordial para evitar una contaminación genética a las poblaciones locales que tengan efectos graves (e.g. depresión exogámica).

## **3. HIPÓTESIS**

El individuo en cautiverio estará más relacionado genéticamente con las poblaciones de la vertiente del Golfo y específicamente a la población silvestre en Querétaro, debido a los antecedentes de los progenitores, ya que posiblemente estos fueron extraídos de este lugar y mantenidos en cautiverio.

#### **4. OBJETIVOS**

##### **GENERAL**

Determinar el origen geográfico y poblacional de un individuo en cautiverio de guacamaya verde (*Ara militaris*) como una herramienta para futuros programas de reintroducción.

##### **PARTICULARES**

Determinar las relaciones genéticas de un individuo en cautiverio de guacamaya verde (*Ara militaris*) con las poblaciones caracterizadas genéticamente por Rivera-Ortíz et al. (2017).

Proponer estrategias de conservación para la guacamaya verde (*Ara miliatris*) mediante herramientas genéticas que guíen posibles programas de reintroducción y liberación.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Trabajo de gabinete

El trabajo de gabinete consistió en la selección de plumas que anteriormente fueron colectadas por personal especializado en el manejo de individuos de guacamaya verde, las plumas fueron donadas por la UMA Fundación AFP OCEAN A. C. Una vez seleccionadas las plumas para realizar los análisis genéticos, se procedió a limpiar el raquis de cada pluma con alcohol al 70% y agua destilada para eliminar posibles contaminantes en la extracción del ADN, posteriormente se cortaron 2 mm de raquis que fueron debidamente separados y etiquetados en tubos de microcentrifuga de 1ml.

### 5.2 Extracción de ADN

El ADN total se extrajo a partir de 2 mm de raquis de la pluma utilizando el método de digestión estándar de proteinasa K/SDS: se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1 ml con 400 µl de buffer de lisis (10 mM Tris HCl; 2 mM EDTA; 10 mM NaCl; pH 8.0), 40 µl de SDS al 10% y 30 µl de proteinasa K (la digestión se llevó a cabo durante 24 a 48 hrs a 37°C), seguido de purificación por fenol : cloroformo como describe Leeton y Christidis (1993). El ADN obtenido se visualizó por electroforesis en geles de agarosa (0.8%), teñidos con bromuro de etidio y revelados con luz ultravioleta, cada muestra se almaceno a -20°C para las siguientes reacciones.

### 5.3 Amplificación de secuencias de microsatélites

Se amplificaron ocho loci de microsatélites que ya habían sido utilizados por Rivera-Ortíz et al. (2017) para la guacamaya verde. Se utilizaron estos ocho loci, para facilitar la comparación genética entre los individuos silvestres y el individuo en cautiverio. De éstos loci: cinco fueron designados para el guacamayo azul y amarillo (*Ara ararauna*) (Caparroz et al., 2003), y tres para la amazona de san Vicente (*Amazona guildingui*) (Russello et al., 2001; Russello et al., 2005) (Tabla 1).

Los ocho loci se prepararon en reacciones de PCR individuales, cada reacción con 5 µl de Multiplex PCR kit (QUIAGEN), incluyendo master Mix (HotStarTaq ADN Polymerase,



Buffer de PCR Multiplex, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y dNTPs), 1 µl de primer F, 1 µ de primer R y 3 µl de ADN genómico total. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, EUA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: etapa de activación inicial de 95° durante 15 min. Posteriormente, cada ciclo de PCR consistió en 30 s de desnaturalización a 94°C, seguido de 90 s de alineación de primers a temperaturas específicas ( $T_m$ = temperatura de alineamiento de los primers, Tabla 1) y 60 s de extensión a 72°C. Después de 30 ciclos, se dio una extensión final de 7 min a 72°C.

Los productos de amplificación de PCR se visualizaron con luz ultravioleta en geles de agarosa al 1.2 %, teñidos con bromuro de etidio. El gel se dejó correr durante 40 min a 90V.

**Tabla 1.** Locus de microsatélites que se amplificaron.

Locus	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
UnaCT21*	CTTCCATACTTAGCCATA	58
UnaCT32*	TCTTGCTTATTCTTCCCCAG	56
UnaCT43*	TCATCCTATCACCAGAAGG	60
UnaCT74*	CTGGACTGCTGCTCTTAAA	60
UnaGT55*	TCTGCCCTCTGTCTTATGCC	58
AgGT17 <sup>''</sup>	CCTGGATGTGCTCTGTGAG	56
AgGT19 <sup>x</sup>	CCTGCCTCCAAAAGAAGT	58
AgGT32 <sup>x</sup>	ACCCAGCTTAGGTTTGTA	60

Caparroz et al. 2003\* Russello et al. 2001<sup>''</sup> Russello et al. 2005<sup>x</sup>

#### 5.4 Secuenciación de microsatélites

Los análisis electroforéticos se llevaron a cabo en el secuenciador ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems), los productos de PCR se mezclaron con formamida y Gen Scan LIZ-500 para determinar el tamaño del fragmento y se desnaturalizó durante 5 min a 95°C para analizarlos en el secuenciador. Los análisis de los fragmentos y su tamaño final se determinaron utilizando el software Gene Mapper 4.0 (Applied Biosystems). Dado que el programa determina el tamaño de los alelos, se comprobó visualmente los

electroferogramas de microsátélites para corroborar el tamaño y su número. Se repitieron las secuencias de PCR para las muestras que mostraron electroferogramas poco claros y resolver estas ambigüedades (Morin et al., 2001).

## 5.5 Análisis de los datos

Las pruebas de asignación permiten determinar a qué población pertenece un individuo o individuos y se divide en dos tipos de métodos: de clasificación y de asignación (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013).

**Métodos de clasificación:** Se caracterizan por asignar los individuos a categorías predefinidas, dentro de estos métodos se incluyen los análisis de componentes principales y los análisis de discriminantes (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013).

**Métodos de asignación:** Con los métodos de asignación genética es posible determinar qué tan indicativo es el genotipo de un individuo de la población en la que cual fue muestreado, es decir, permite asignar o excluir las poblaciones referencia como posibles orígenes de los individuos sobre la base de genotipos multilocus y dada la frecuencia alélica de los loci de todos los individuos en diferentes poblaciones (Dawson y Belkhir, 2001; Piry et al., 2004).

Se utilizaron tanto métodos de clasificación como el Análisis Factorial de Correspondencias y métodos de asignación genéticos para evaluar si el individuo de guacamaya verde en cautiverio pertenecía a cualquiera de las dos grandes metapoblaciones o alguna de las siete subpoblaciones identificadas por Rivera-Ortíz et al. (2017).

### 5.5.1 Análisis Factorial de Correspondencias (AFC)

El Análisis Factorial de Correspondencias (AFC) es un método estadístico multivariable de interdependencia (ninguna variable es definida como independiente o dependiente) bien adaptado para describir asociaciones entre variables cualitativas (Hair et al., 1999). El objetivo del AFC es encontrar una estructura más simple reduciendo la dimensión de las variables sin perder información (Valiente, 2007). Este análisis está adaptado para el uso con datos genéticos diploides que permite investigar la

correspondencia entre filas (individuos, poblaciones) y columnas (alelos) en una tabla de contingencia. Como resultado este método permite visualizar gráficamente el clúster de cada población en una nube de puntos, sin suposiciones a priori sobre la agrupación utilizando cada alelo como variable independiente (Valiente, 2007; Li et al., 2005).

El AFC se realizó con el software GENETIX 4.05.4 (Belkhir, 2004) para visualizar la relación genética entre el individuo en cautiverio y los individuos pertenecientes a las referencias poblacionales tomadas de Rivera-Ortíz et al. (2017), se realizaron tres combinaciones de datos: i) individuo en cautiverio + la metapoblación de la Sierra Madre Oriental + la metapoblación de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur, ii) individuo en cautiverio + metapoblación de la Sierra Madre Oriental, iii) individuo en cautiverio + la metapoblación de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur; estas combinaciones se hicieron con la finalidad de determinar si existen distinciones entre el individuo en cautiverio y cada una de las poblaciones.

### **5.5.2 Asignación genética**

Se emplearon cuatro métodos de asignación genética con genotipos multilocus; el primer enfoque fue propuesto por Pritchard et al. (2000), el cual se basa en una agrupación completamente bayesiana, esta se basa en la información genética para asignar a qué población pertenece un individuo, sin suponer poblaciones predefinidas (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). Produce un valor de probabilidad posterior que puede ser interpretada directamente como la probabilidad de origen de cada individuo de cada población muestreada y compara la probabilidad posterior del individuo de originarse en una población a un umbral elegido (Manel et al., 2002).

Para asignar el individuo en cautiverio a cualquiera de las siete poblaciones y/o a las dos metapoblaciones se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.1 que asigna a los individuos a un número específico de poblaciones (K) a partir de sus genotipos y simultáneamente, estima las frecuencias alélicas de los individuos de las poblaciones por medio de simulaciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) con el método de Gibbs sampling, el cual consiste en un algoritmo de MCMC para obtener una secuencia de muestras al azar a partir de una distribución de probabilidades multivariada, y que es adecuada cuando se trata de agrupación de datos (Pritchard et al., 2000). El modelo puede

asumir admixtur (asume que el individuo puede provenir de varias poblaciones K); o bien puede asumir sin-admixtur (asume que el origen de cada individuo es a partir de una única población K) (Falush et al., 2003; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013; Pritchard et al., 2000).

STRUCTURE 2.3.1 (Falush et al., 2003; Pritchard et al., 2000) fue empleado para agrupar al individuo en cautiverio usando de referencia las siete poblaciones y los dos grupos genéticos definidos por Rivera-Ortíz et al. (2017). El programa se ejecutó 10 veces con un valor de  $K= 2$ , este valor de K se definió de acuerdo a la estructura poblacional descrita por Rivera-Ortíz et al. (2017). Todos los ensayos tuvieron una duración de quemado de 500,000 pasos, seguido de  $10^6$  interacciones bajo el supuesto de no-admixture y sin considerar locapriori (asumiendo que el individuo en cautiverio no proviene de ninguna población muestreada). A continuación se estimó el coeficiente de pertenencia a las agrupaciones (Q) con el software CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007), utilizando el algoritmo de LargeKGredy con 1,000 órdenes de entrada aleatoria. Estos valores se visualizaron con diagramas de barras construidos con el software DISTRUCT (Rosenberg, 2004) lo que permitió visualizar a que población de referencia y a que grupo genético se agrupo el individuo en cautiverio.

Para los siguientes enfoques, se realizaron pruebas de asignación/exclusión con el software GENECLASS 2.0 (Piry et al., 2004). Este software utiliza tres criterios para asignar o excluir un individuo a una población que son: i) basados en frecuencias alélicas (Paetkau et al., 1995), ii) un enfoque bayesiano (Rannala y Mountain, 1997) y por último iii) basado en distancias genéticas (Cornuet et al., 1999).

**Criterio de frecuencias:** Este criterio está basado en frecuencias alélicas, presentado por primera vez por Paetkau et al. (1995). Este método asigna un individuo a la población donde su frecuencia de genotipo esperada es más alta, y se puede utilizar para cualquier nivel de ploidía o para grupos de individuos (Paetkau et al., 1995; Piry et al., 2004). El método implica tres etapas: i) calcular las frecuencias alélicas en todas las poblaciones de candidatos, ii) calcular las probabilidades de que el genotipo multilocus del individuo en cautiverio ocurra en cada población, y iii) asignar el individuo en cautiverio a

la población donde la probabilidad de ocurra su genotipo sea la más alta (Paetkau et al., 1995).

Paetkau et al. (1995) señala que cuando un individuo tiene un alelo raro que no está presente en una población candidata, puede ocasionar que el cálculo de la frecuencia alélica del individuo en una población dada sea igual a cero, lo que lleva a la eliminación del alelo en esta población. Para evitar este inconveniente Paetkau et al. (1995) sugiere añadir sistemáticamente al individuo a todas las muestras de población, lo que evita las frecuencias de alelos nulos.

Se calcularon las frecuencias alélicas de las siete poblaciones candidatas incluyendo al individuo en cautiverio en cada una de las poblaciones de referencia, con la finalidad de evitar obtener alelos nulos en los resultados. Se calculó la probabilidad de que ocurra el genotipo del individuo en cautiverio en cada una de las siete poblaciones candidatas; posteriormente se utilizó el algoritmo de simulación propuesto por Paetkau et al. (2004) para asignar al individuo en cautiverio a una de las siete poblaciones candidatas con un remuestreo de Monte Carlo de 10,000 y un umbral de probabilidad de 0.05.

**Criterio bayesiano:** este segundo criterio basado principalmente en Rannala y Mountain (1997), es una prueba parciamente bayesiana que utiliza el enfoque bayesiano para estimar las frecuencias de alelos de una población y un enfoque de frecuencias para estimar la significación estadística de las asignaciones individuales (Manel et al., 2002). Con el programa GENECLASS 2.0 se utilizó el método bayesiano propuesto por Rannala y Mountain (1997) y el algoritmo de simulación de Paetkau et al. (2004), con un remuestreo de 10,000 individuos simulados y un umbral de probabilidad de 0.05.

**Criterio de distancias:** los índices de distancia genética se calculan entre el individuo o el grupo de individuos a asignar y cada población de referencia (Cornuet et al., 1999). Con el software GENECLASS 2.0 se implementaron las siguientes distancias: distancia mínima de Nei (Nei, 1973) y la distancia DA de Nei (Nei et al., 1983).

Se evaluó el desempeño de los cuatro criterios de asignación implementados en el software GeneClass 2.0 mediante ensayos de re-asignación con un umbral de probabilidad 0.05 utilizando el procedimiento “leave one out” (Piry et al., 2004). La población de origen

se definió como aquella a la cual el individuo fue muestreado, y se evaluaron el número de asignaciones correctas (Larraín et al., 2014).

### **5.5.3 Maximizar el éxito de asignación**

Los estudios teóricos han considerado cuántos loci y cuántos alelos podrían ser necesarios para maximizar el éxito de la asignación, la proporción de asignaciones correctas sobre todas las decisiones (es decir, asignaciones correctas e incorrectas más no asignaciones) (Banks et al., 2003).

WHICHLOCI es un programa que selecciona la mejor combinación de loci para la asignación de la población y/o individuos a través del análisis de datos extraídos de poblaciones candidatas (Banks et al., 2003), en general determina el poder discriminatorio relativo de loci alternativo y combinaciones de loci para la asignación de los individuos a la población con el fin de evaluar qué combinación contiene el número mínimo de loci necesarios para alcanzar un nivel específico de éxito de asignación (Banks et al., 2003).

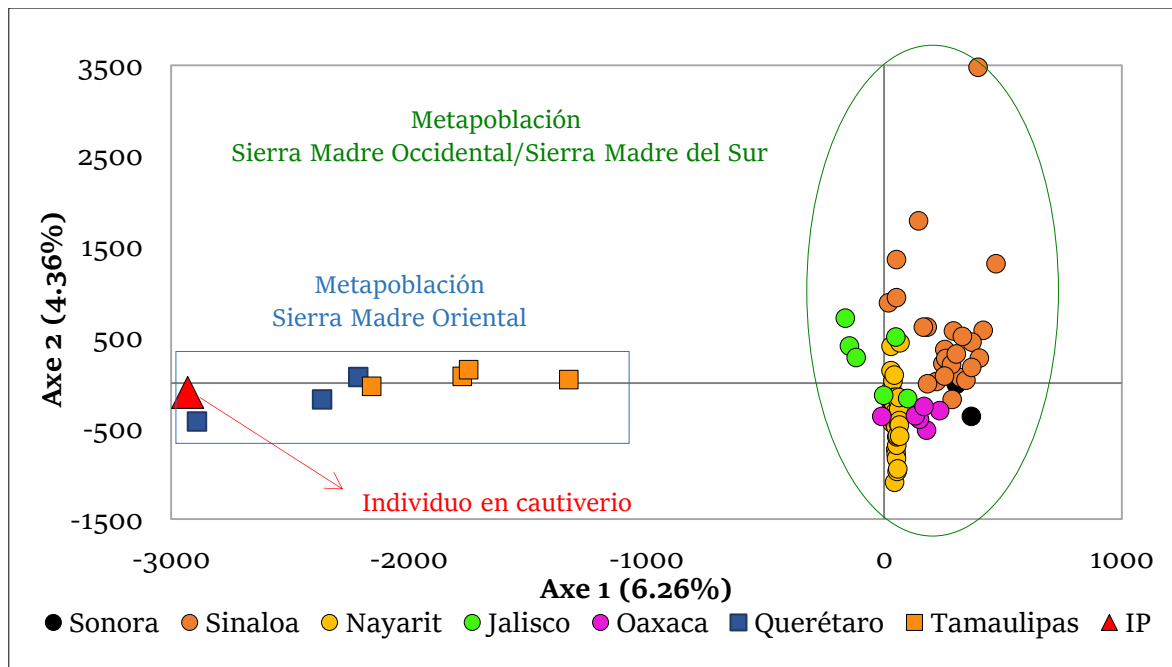
Las asignaciones de prueba con un loci a la vez permiten clasificar los loci en términos de su eficiencia para una correcta asignación de los individuos a la población, y por el contrario, su propensión a causar falsas asignaciones (Banks et al., 2003). Se realizaron ensayos con números crecientes de loci para determinar que combinación contiene el mínimo de loci para alcanzar un nivel definido de éxito de asignación (Banks et al., 2003, Yue et al., 2012).

Se examinó la puntuación de cada marcador y sus combinaciones para determinar cuáles son las mejores combinaciones de microsatélites para la correcta asignación del individuo en cautiverio con el software WHICHLOCI. Se combinaron de 2-8 microsatélites (del marcador con la puntuación de asignación más alta al más bajo) para probar la potencia de las combinaciones de los marcadores (Yue et al., 2012).

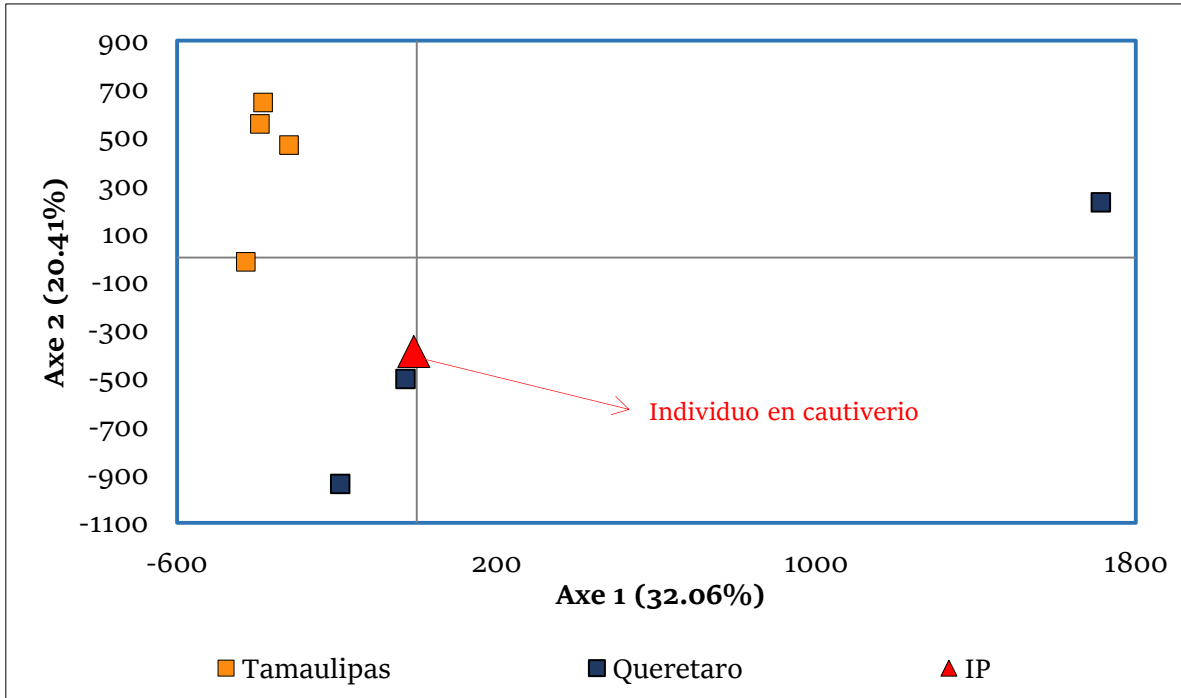
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis Factorial de Correspondencias (AFC).

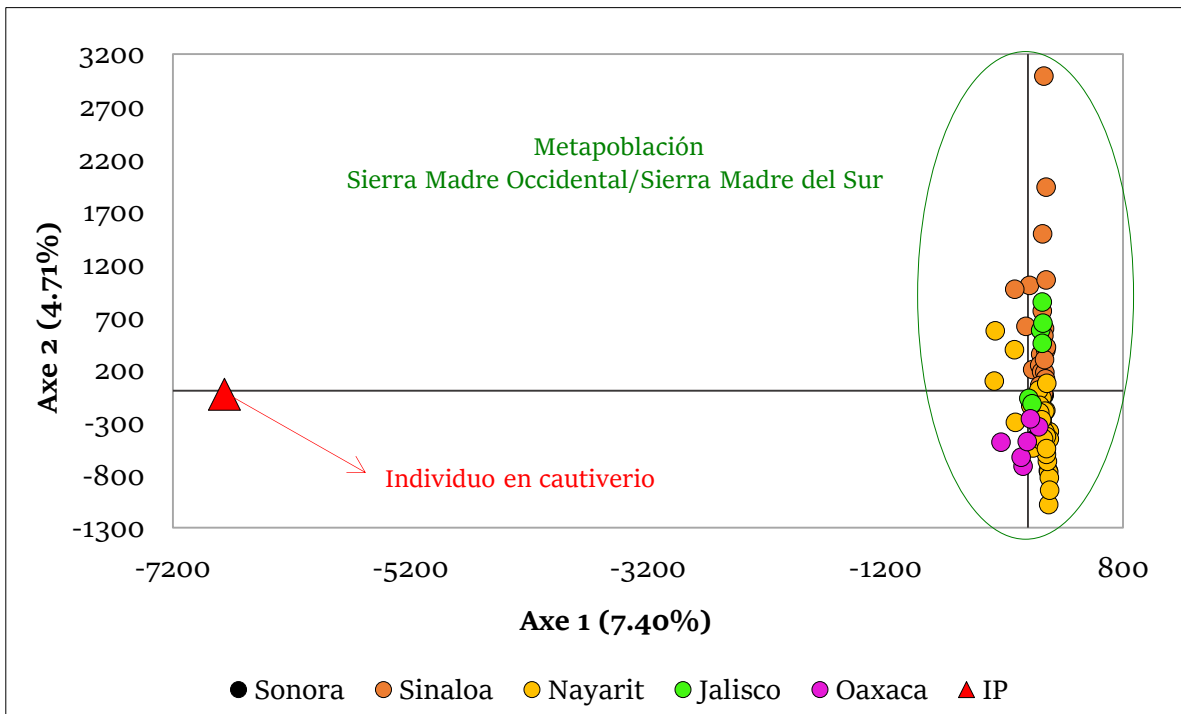
El AFC arroja una nube de puntos donde se observa la posición en el espacio bidimensional que adoptan los 86 individuos de siete poblaciones candidatas y el individuo en cautiverio en dos grupos genéticos claramente separados: i) poblaciones candidatas de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur (vertiente del Pacífico) y ii) poblaciones candidatas de la Sierra Madre Oriental (vertiente del Golfo de México). Las tres pruebas de AFC realizadas en GENETIX 4.05.4 sugieren que el individuo en cautiverio se ubica dentro de la metapoblación de la Sierra Madre Oriental, donde se puede observar que el individuo en cautiverio se encuentra más próximo a individuos de la población de Querétaro (Figura 4 y 5). Por otro lado, el individuo en cautiverio se muestra bastante alejada de la metapoblación de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur (Figura 6).



**Figura 4.** AFC bidimensional. Prueba 1 para observar el comportamiento de todas las poblaciones candidatas con respecto al individuo en cautiverio (IP).



**Figura 5.** AFC bidimensional. Prueba 2 para analizar el comportamiento de las poblaciones candidatas de la Sierra Madre Oriental con respecto al individuo en cautiverio (IP).

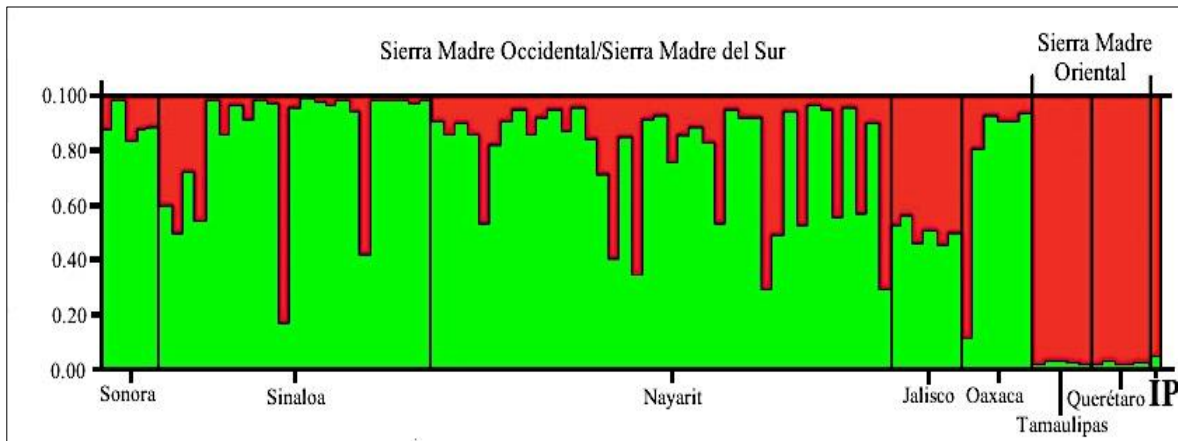


**Figura 6.** AFC bidimensional. Prueba 3 para analizar el comportamiento todas las poblaciones candidatas de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur con respecto al individuo en cautiverio (IP).



## 6.2 Asignación genética

El análisis de asignación completamente bayesiano realizado con STRUCTURE 2.3.4, muestra la proporción de ascendencia de cada uno de los individuos candidatos, así como del individuo en cautiverio en dos grupos genéticos ( $K=2$ ) que se muestran en verde y rojo (Figura 7). Las poblaciones candidatas de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Oaxaca representan el grupo I: Sierra Madre Occidental/de la Sierra Madre del Sur (verde); Las poblaciones candidatas de Querétaro y Tamaulipas y el individuo en cautiverio representan el grupo II: Sierra Madre Oriental (rojo), lo que indica que el posible origen del individuo en cautiverio se encuentra dentro de este grupo genético. La proporción de membresía de cada individuo a un grupo se estableció en 0.80 (Figura 7).



**Figura 7.** Proporción de ascendencia en STRUCTURE. Ascendencia de 86 individuos silvestres de guacamaya verde de siete poblaciones candidatas, así como del individuo en cautiverio. Cada barra representa el genotipo de cada individuo; los colores verde y rojo indican la proporción de ancestría a cada uno de los dos grupos genéticos detectables. Las líneas negras verticales forman los límites de los lugares de muestreo originales.

Para los análisis de asignación/exclusión generados en GENECLASS 2.0 se utilizaron los ocho loci de microsatélites. La probabilidad de exclusión por el método de Monte Carlo propuesto por Paetkau et al. (2004) ( $p < 0.05$ ) excluyó al individuo en cautiverio de todas las poblaciones de la de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur en los cuatro enfoques utilizados. El método bayesiano parcial propuesto por Rannala y Mountain (1997) y el método de frecuencias propuesto por Paetkau et al. (1995), asignó al individuo en cautiverio a una única población silvestre, con una probabilidad del 32.7% y 30.3 %

respectivamente a la población de Querétaro. El análisis de distancias genéticas de Nei y distancia mínima de Nei propuestas por Cornuet et al. (1999) arrojaron probabilidades de asignación a las poblaciones tanto de Querétaro como de Tamaulipas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Probabilidades de asignación calculada con GENECLASS 2.0. El individuo es asignado a la población donde se da la mayor probabilidad de que ocurra su genotipo. La probabilidad de exclusión calculado con el método de Monte Carlo de Paetkau et al. (2004) es de  $p < 0.05$ . Los valores en color rojos fueron donde se obtuvieron mayor probabilidad que ocurra el genotipo del individuo en cautiverio.

Software Criterio Algoritmo	SON	SIN	NAY	JAL	OAX	QUE	TAM	Número de Loci
GeneClass 2.0 Frecuencias Paetkau et al. (1995)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	<b>0.303</b> <b>(30.3%)</b>	0.068 (6.8%)	8
GeneClass 2.0 Bayesiano Rannala & Mountain (1997)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	<b>0.327</b> <b>(32.7%)</b>	0.034 (3.4%)	8
GeneClass 2.0 Distancia genética Nei (1983) Cornuet et al. (1999)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	<b>0.373</b> <b>(37.3%)</b>	<b>0.224</b> <b>(22.4%)</b>	8
GeneClass 2.0 Distancia mínima Nei (1973) Cornuet et al. (1999)	0.028 (2.8%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	0.00 (0%)	<b>0.461</b> <b>(46.1%)</b>	<b>0.418</b> <b>(41.85%)</b>	8

**SON:** Sonora, **SIN:** Sinaloa, **NAY:** Nayarit, **JAL:** Jalisco, **OAX:** Oaxaca, **QUE:** Querétaro, **TAM:** Tamaulipas.

Con un umbral de exclusión de 0.05, las pruebas de asignación/ exclusión implementadas en GeneClass 2.0 presentaron valores de asignaciones correctas mayores al 50%. Sin embargo, como sucedió con el individuo en cautiverio pocas muestras de los 86 individuos de referencia fueron asignados a una sola población nativa, por lo que se tomó como origen de los individuos a la población a la cual presentaron mayor probabilidad de asignación. Los criterios de asignación Bayesiana propuesto por Rannala y Mountain (1997) y distancia genética de Nei (Cornuet et al., 1999) tuvieron mayores proporciones de asignaciones correctas con un 74% y un 79% respectivamente (Tabla 3), lo que indica que posiblemente son los mejores criterios de asignación para estas poblaciones de guacamaya verde.

**Tabla 3.** Desempeño de los criterios de asignación implementados en GENECLASS 2.0. Se re-asignaron los 86 individuos silvestres de las siete poblaciones de referencia.

Software Criterio Algoritmo	Asignados correctamente	
	Número de individuos	%
GeneClass 2.0 Frecuencias Paetkau et al. (1995)	57	66
GeneClass 2.0 Bayesiano Rannala & Mountain (1997)	64	74
GeneClass 2.0 Distancia genética Nei (1983) Cornuet et al. (1999)	68	79
GeneClass 2.0 Distancia mínima Nei (1973) Cornuet et al. (1999)	46	53

### 6.3 Éxito de asignación

Las combinaciones óptimas de locus proporcionaron asignaciones del individuo en cautiverio entre las poblaciones candidatas de guacamaya verde. WHICHLOCI indicó que los ocho loci eran necesarios para una precisión de asignación del individuo en cautiverio a alguna de las poblaciones candidatas del 83%. Los loci se clasificaron de acuerdo a su contribución relativa a la precisión de la asignación del individuo en cautiverio de acuerdo a los análisis de las diferencias de frecuencias alélicas entre las poblaciones; la contribución de todos los loci oscilan entre el 9 % (AgGT32) al 15% (UnaCT21) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Raking de loci realizado por WHICHLOCI con ocho microsatélites.

Locus	Score	Score (%)	A (%)
UnaCT21	139.474	15.556	83%
UnaCT32	118.573	13.225	
UnaCT74	116.432	12.986	
UnaCT43	114.071	12.723	
UnaGT55	110.096	12.279	
AgGT17	109.722	12.237	
AgGT19	98.694	11.007	
AgGT32	89.51	9.983	

**A** = Asignación correcta con ocho loci

## 7. DISCUSIÓN

Con la disminución de las poblaciones de vida silvestre, los programas de reintroducción que integren métodos genéticos para identificar la población de ascendencia de individuos de origen desconocido, constituyen un componente importante de estrategias integradas de conservación especialmente en especies que se encuentren en niveles de riesgo como la guacamaya verde (Milián-García et al., 2015; Russello et al., 2007).

El objetivo de este estudio fue determinar el origen geográfico y poblacional de un individuo en cautiverio de guacamaya verde a partir del análisis de microsatélites y el uso de diferentes métodos de asignación y exclusión. Sin embargo, la identificación del origen geográfico de una muestra depende de nuestra capacidad de asignarla a una población en particular, que a su vez depende estrechamente del nivel de estructuración genética (Larraín et al., 2014; Ogden et al., 2009).

La estructura genética de las poblaciones está determinada por procesos microevolutivos (selección natural, deriva génica, flujo génico y mutación) y está reflejada en los niveles de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ). Los valores de diferenciación para un éxito razonable de asignación se citan usualmente como valores de  $F_{ST}$  que van de 0.05-0.2, donde se reportan del 80-100% de asignaciones correctas (Hauser et al., 2006; Manel et al., 2002; Ogden y Linacre, 2015). Las poblaciones de referencia citadas por Rivera-Ortíz et al. (2017) presentan valores de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones que oscilan entre los 0.025 (Nayarit-Sinaloa) hasta 0.253 (Tamaulipas y Sonora) siendo esta última la que presenta mayor diferenciación genética. Cuando se comparan las regiones fisiográficas el valor de  $F_{ST}$  más significativo es de 0.65 y se presenta solo entre la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental (Rivera-Ortíz et al., 2017).

Los valores de  $F_{ST}$  que presentan las poblaciones de guacamaya verde se ven reflejados en las gráficas obtenidas de las pruebas de AFC y STRUCTURE 2.3.2 (Figuras 4, 5, 6 y 7), donde se observan claramente dos grupos genéticos: i) Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur y ii) Sierra Madre Oriental, anteriormente reportados por Rivera-Ortíz et al. 2017. Debido a esta estructuración el individuo se asignó con una alta confianza a la metapoblación de la Sierra Madre Oriental y subsecuentemente a una de las dos poblaciones de este grupo genético.

Por otro lado los análisis de asignación/exclusión de GENECLASS 2.0 confirman que el posible origen del individuo en cautiverio se encuentra en alguna de las poblaciones de la Sierra Madre Oriental. Estadísticamente los cuatro criterios muestran mayor probabilidad de que este individuo pertenece a la población de Querétaro con un rango que oscila entre el 30-46% de probabilidad; no obstante, dos de estas pruebas no lograron asignar al individuo en cautiverio a una sola población nativa. Estos bajos porcentajes de probabilidad y la asignación a ambas poblaciones es posiblemente un reflejo del tamaño pequeño en algunas poblaciones de referencia ya que ciertos autores sugieren que es necesario una muestra de 30-50 individuos por población aunado a los valores de  $F_{ST}$  anteriormente mencionados para permitir estimaciones precisas (Cornuet et al., 1999; Manel et al., 2002; Ogden y Linacre, 2015).

No obstante, tomando en cuenta que las especies en peligro de extinción suelen tener tamaños pequeños de población siendo el caso de la guacamaya verde, de la cual en México se han reportado desde poblaciones pequeñas con tan solo 14-20 individuos (Jalisco), hasta poblaciones donde alcanzan aproximadamente los 70 individuos (Sierra Gorda de Querétaro), vuelve difícil obtener suficiente material de referencia (Gaucín, 2000; Ogden y Linacre, 2015; Palomera-García et al., 1994; Rivera-Ortíz et al., 2013).

El desempeño de los criterios de asignación utilizados en GENECLASS 2.0 fueron buenos (56-79% de asignaciones correctas) al compararlos con un estudio donde reportan que los métodos de frecuencia de alelos y distancias DA de Nei apenas alcanzan el 50% de asignaciones correctas utilizando nueve microsatélites y un tamaño de muestras de referencia necesarios para tener estimaciones precisas (N=50 por cada población) del mejillón *Mytilus chilensis*; sin embargo el  $F_{ST}$  global es de 0.046 (Larraín et al., 2014). Los resultados en este trabajo posiblemente son atribuibles a que la diferenciación genética de las poblaciones de guacamaya verde cumplen con valores suficientes de diferenciación genética para lograr una correcta asignación, lo que demuestra que se puede lograr un alto éxito de asignaciones usando pocos loci y tamaños de muestra pequeños si las poblaciones están fuertemente estructuradas y diferenciadas genéticamente (Cornuet et al., 1999).

Para realizar eficientemente el proceso de asignación es necesario analizar el poder de asignación de los marcadores, el uso del software WHICHLOCI permitió determinar el número mínimo de combinaciones de marcadores de microsatélites para alcanzar un nivel

específico de éxito de asignación, el cual demuestra que es necesario utilizar los ocho loci de microsatélites para tener un éxito de asignaciones correctas del 83%. A pesar de que este porcentaje parece favorable, los porcentajes de asignaciones correctas en el análisis del desempeño de los métodos de asignación de GENECLASS 2.0 utilizando los ocho microsatélites no alcanzan el 80% lo que sugiere que para obtener una asignación individual altamente precisa requeriría de loci adicionales o en algunos casos aumentar el número de muestras de referencia en algunas poblaciones, algunos autores como Kalinowski (2005) mencionan que cuando la FST es superior a 0.05, 20 individuos deberían de ser suficientes, también se sugiere que un número relativamente bajo de marcadores de microsatélites (n=10) proporciona suficiente poder de asignación para identificar el origen de la población como se han realizado en otros estudios en diferentes especies (Mateus y Almeida, 2015; Tonteri et al., 2009; Yue et al., 2012).

## 8. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN

El uso de herramientas moleculares para identificar el origen de individuos con fines de conservación es cada vez más utilizada para identificar sitios de tráfico ilegal y como herramienta en planes de reintroducción, así lo demuestran algunos estudios en diferentes especies como la guacamaya Jacinto (*Anodorhynchus hyacinthinus*), la guacamaya azul y amarillo (*Ara ararauna*) y la tortuga de estanque europea (*Emys orbicularis*) (Fernandes y Caparroz, 2013; Presti et al., 2015; Velo-Antón et al., 2007).

Para una especie que se encuentra en peligro de extinción como la guacamaya verde, donde las principales amenazas son la fragmentación del hábitat y el tráfico ilegal; entender y conocer la estructura genética de poblaciones silvestres es una herramienta importante para diseñar estrategias de manejo adecuadas (O'Biren, 1994; Rivera-Ortíz et al., 2017). La significativa diferenciación genética que existe entre las poblaciones de la Sierra Madre Occidental/Sierra Madre del Sur de las poblaciones de la Sierra Madre Oriental permite determinar el origen de individuos criados en cautiverio o confiscados del tráfico ilegal para asignarlo a poblaciones donde son genéticamente similares.

La reintroducción de ejemplares de guacamaya verde a la vida silvestre es parte de planes de manejo de UMA's como FUNDACION AFP OCEAN A.C. que deben cumplir con

todos los protocolos que establece la Ley General de Vida Silvestre para evitar dañar ecológica y genéticamente las poblaciones locales que las puedan llevar a una extinción local.

Para lograr obtener un mayor éxito de asignación de individuos de origen desconocido, es importante continuar con estudios genéticos de poblaciones silvestres que aún no están incluidas en los estudios de estructura genética e incluso un aumento del número de marcadores en las poblaciones de referencia utilizadas en este trabajo mejoraría los resultados obtenidos en este estudio.

Es importante que las estrategias de conservación enfocados a restauraciones demográficas o translocaciones para reducir niveles de endogamia (e.g Nayarit, Sinaloa y Querétaro) deben integrar esfuerzos en identificar el origen de individuos criados en cautiverio o decomisados del tráfico ilegal que serán liberados, con el fin de evitar en el proceso una depresión exogámica (Frankham et al. 2011) y asegurar la viabilidad y salud genética de cada población, reduciendo el riesgo de una extinción local.

Por último es necesario identificar sitios donde la captura ilegal es intensa utilizando métodos de asignación genética, enfocando esfuerzos y recursos en los sitios identificados de individuos incautados para planificar acciones y disminuir esta práctica ilegal con la ayuda de las comunidades locales.

## 9. CONCLUSIONES

- Los estudios genéticos enfocados en la guacamaya verde permiten identificar y determinar el origen desconocido de individuos criados en cautiverio o provenientes de decomisos del tráfico ilegal.
- A pesar de obtener probabilidades menores al 50%, el individuo en cautiverio es compatible genéticamente con la población de Querétaro y lo convierte en un potencial candidato para ser liberado en esta área.
- Es posible mejorar los éxitos de asignación aumentando ya sea el tamaño de muestras de referencia o el número de loci de microsatélites en cada población.
- Los métodos de asignación son herramientas importantes en estrategias de conservación de la guacamaya verde que en el futuro serán indispensables en los planes de manejo.



**10. LITERATURA CITADA**

- Allendorf, F. W., Luikart, G. H., & Aitken S. N. (2012). Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons.
- Aranguren-Méndez, J. A., Roman-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jornada, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *ALPA* 13(1), 1-6.
- Arizmendi, M. C., & Marquez-Valdelamar, L. (2000). Áreas de importancia para la conservación de las aves en México. CIPAMEX México, D. F. 280 p.
- Banks, M., Eichert, W., & Olsen, J. B. (2003). Which genetic loci have greater population assignment power? *Bioinformatics applications note* 19 (11), 1436-1438.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. Université de Montpellier II. Francia.
- Berlanga, H., Gómez de Silva H., Vargas-canales, V. M., Rodríguez-Contreras, V., Sánchez-González, L. A., Ortega-Álvarez, R., & Calderón-Parra, R. (2015). Aves de México: Lista actualizada de especies y nombres comunes. CONABIO. México, D. F.
- Birdlife International. (2016). Especie informativa: *Ara militaris*. Descargado de <http://www.birdlife.org> el 15/02/2016
- Cantú, J. C., Sánchez-Saldaña, M. E., Grosselet, M., & Silva-Gámez, J. (2007). Tráfico ilegal de pericos en México: una evaluación detallada. Teyeliz & Denfensors of wildlife. Washington. 75 p.
- Caparroz, R., Miyaki, C. Y., & Baker, A. J. (2003). Characterization of microsatellite loci in Blue-and-Gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes* 3, 441-443.
- Carreón, G. (1997). Estimación poblacional, biología reproductiva y ecología de la nidificación de la Guacamaya Verde (*Ara militaris*) en una selva estacional del oeste del estado de Jalisco. Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F.
- CITES. (2015). Apéndices I, II y II Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres. Ginebra, Suiza.

- Codensido, M., & Bilenca, D. (2004). Variación estacional de un ensamble de aves en un bosque subtropical semiárido del Chaco Argentino. *Biotropica* 36 (4), 544-554.
- Collar, N. J. (1997). Family Psittacidae (parrots). In: del Hoyo, J., Elliott, A., & Sargatal, J (Eds.), *Handbook of the birds of the world* (Vol. 4). Barcelona, Spain. Lynx Edicions.
- Collar, N. J. (1991). Threatened parrots of the Neotropics. *AFA Watchbird* 18(3), 43-48.
- Collar, N. J. (1996). Priorities for parrot conservation in the New World. *Cotinga* 5, 26-31.
- Collar, N. J. (2000). Globally threatened parrots: criteria, characteristics and cures. *Internant. Zoo Yearbook* 37, 21-35.
- Collar, N. J., & Juniper, A. T. (1992). Dimensions and causes of the parrot conservation crisis. Pp 1-24 in S. R. Beissinger & N. F. R. Snyder (eds). *New World parrots in crisis: solutions from conservation biology*. Washington, D. C. Smithsonian Institution Press.
- Contreras-González, A. M., Rivera-Ortíz, F. A., Soberanes-González, C., Valiente-Banuet, A., & Arizmendi, M. C. (2009). Feeding ecology of Military Macaws (*Ara militaris*) in a semi-arid región of central Mexico. *The Wilson Journal of Ornithology* 121 (2), 384-391.
- Cornuet, J.-M., Piry, S., Luikart, G., Estoup, A., & Solignac, M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153, 1989-2000.
- Dawson, K. J., & Belkhir, K. (2001). A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of the individuals. *Genetics Research Cambridge* 78, 59-77.
- Eberhard, J. R., Iñigo, E. E., Enkerlin-Hoeflich, E., & Cun, E. P. (2015). Phylogeography of the Military Macaw (*Ara militaris*) and the Great Green Macaw (*A. ambiguus*) based on mtDNA sequence data. *The Wilson Journal of Ornithology* 127 (4), 661-669.

- Edmands, S. (1999). Heterosis and outbreeding depression in interpopulation crosses spanning a wide range of divergence. *Evolution* 53 (6), 1757-1768.
- Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology* 16, 463-475.
- Edmands, S. (2015). Blurred lines: Scientific and legislative issues surrounding hybrids and conservation. *Current Zoology* 61(1), 128-131
- Edmands, S., & Timmerman, C. C. Modeling factors affecting the severity of outbreeding depression. *Conservation biology* 17(3), 883-892.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- Faria, P. J., Guedes, N. M. R., Yamashita, C., Martuscelli, P., & Miyaki, C. Y. (2008). Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinhinus*): Implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 17, 765-779.
- Fernandes, G. A., Caparroz, R. (2013). DNA sequence analysis to guide the release of blue-and-yellow macaws (*Ara ararauna*, Psittaciformes, Aves) from the illegal trade back into the wild. *Molecular Biology Reports* 40, 2757-2762.
- Fernandes-Seixas, G. H., & Mourao, G. D. (2002). Nesting success and hatching survival of the Blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Journal Field Ornithology* 73 (4), 399-409.
- Forshaw, J. M. (1989). Parrots of the world. 3rd ed. Lansdowne Editions.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. New York.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2010). Introduction to conservation genetics. 2nd ed. Cambridge University Press. New York.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Eldridge, M. D. B., Lacy, R. C., Ralls, K., Dudash, M. R., & Fenster, C. B. (2011). Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* 25 (3), 465-475.

- Fridolfsson, A. K., Gyllensten, U. B., & Jakobsson, S. (1997). Microsatellite markers for paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair Young in an island population. *Hereditas* 126, 127-132.
- Garrido-Garduño, T., & Vázquez-Domínguez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84, 1031-1054.
- Gaucín, R. N. (2000). Biología de la conservación de la guacamaya verde (*Ara militaris*) en el Sótano del Barro, Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. L204. México, D. F.
- Gómez, J. O. (2004). Ecología reproductiva y abundancia relativa de la Guacamaya Verde (*Ara militaris*) en Jocotlán Jalisco, México. Tesis (Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. 60 p.
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59, 377-388.
- Hair, J. F. (1999). Análisis multivariante. 5ta ed. Pearson Educación.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. (1997). Principles of population genetics. 3ra Ed. Sinauer Associates.
- Hauser, L., Seamons, T. R., Dauer, M., Naish, K. A., & Quinn, T. P. (2006). An empirical verification of population assignment methods by marking and parentage data: Hatchery and wild steelhead (*Oncorhynchus mikiss*) in Forks Creek, Washington, USA. *Molecular Ecology* 15(11), 3157-3173.
- Hedrick, P. W. (2011). Genetics of populations. Jones & Learning.
- Howell, S. N. G., & Webb, S. (1995). A guide to the birds of Mexico and Northern Central America. OUP Oxford.
- Iñigo, E. E., & Ramos, M. A. (1991). The psittacine trade in México. Pp 380-392 in J. G., Robinson, & K. H., Redford (eds). *Neotropical Wildlife use and conservation*. University of Chicago Press.
- Iñigo, E. E. (1999). Las guacamayas verde y escarlata en México. CONABIO. *Biodiversitas* 25, 7-11.

- ITIS. (2016). Integrated Taxonomic Information System. Consultado el 22 de diciembre de 2016. <http://www.itis.gov/>
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.
- Joseph, L., Toon, A., Schirtzinger, E. E., Wright, T. F., & Schodde, R. (2012). A revised nomenclature and classification for family-group taxa of parrots (Psittaciformes). *Zootaxa* 3205, 26-40.
- Juniper, T., & Parr, M. (1998). Parrots: a guide to parrots of the world. Christopher Helm Publishers. London.
- Kalinowski, S. T. (2005). Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity* 94, 33-36.
- Karubian, J., Fabara, J. Yunes, D., Jorgenson, J. P., Romo, D., & Smith, T. B. (2005). Temporal and spatial patterns of macaw abundance in the ecuadorian Amazon. *The Condor* 107, 617-626.
- Larraín, M. A., Díaz, N. F., Lamas, C., Uribe, C., & Araneda, C. (2014). Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey. *Food Research International* 62, 104-110.
- Leeton, P., & Christidis, L. (1993). Feathers from museum bird skins – a good source of DNA for phylogenetic studies. *The Condor* 95, 465-466.
- Leite, K. C. E., Seixas, G. H. F., Berkunsky, I., Collevatti, R. G., & Caparroz, R. (2008). Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. *Genetics and Molecular Research* 7 (3), 819-829.
- Li, M. H., Sternbauer, K., Haahr, P. T., & Kantanen, J. (2005). Genetic components in contemporary Faroe Island Cattle as revealed by microsatellite analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 309-317.
- Lindenmayer, D. B., & Fisher, J. (2013). Habitat fragmentation and landscape change and ecological and conservation synthesis. Island Press.

- Loza-Salas, C. A. (1997). Patrones de abundancia, uso de habitat y alimentación de la Guacamaya Verde (*Ara militaris*), en la presa Cajon de Peña, Jalisco, México. Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias UNAM. México D. F.
- Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution* 45 (3), 622-629.
- Macías, C., Iñigo, E. E., & Enkerlin-Hoeflich, E. C. (2000). Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable de los Psitácidos de México. SEMARNAP. México, D. F.
- Manel, S., Berthier, P., & Luikart, G. (2002). Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with bayesian assignment tests and multilocus genotypes. *Conservation Biology* 16 (3), 650-659.
- Marín-Togo, M. C., Monterrubio-Rico, T. C., Renton, K., Rubio-Rocha, Y., Macías-Caballero, C., Ortega-Rodríguez, J. M., & Cancino-Murillo, R. (2012). Reduced current distribution of Psittacidae on the Mexican Pacific coast: potential impacts of habitat loss and capture for trade. *Biodiversity conservation* 21, 451-473.
- Mateus, J. C., & Russo-Almeida, P.A. (2015). Traceability of 9 Portuguese cattle breed with PDO products in the market using microsatellites. *Food Control* 47, 4867-492.
- Milián-García, Y., Jensen, E. L., Madsen, J., Álvarez-Alonso, S., Serrano-Rodríguez, A., Espinosa-López, G., & Russello M. A. (2015). Founded: Genetic reconstruction of lineage diversity and kinship informs *Ex situ* conservation of cuban Amzon Parrots (*Amazona leucocephala*). *Journal of Heredity* 106, 573-579.
- Monterrubio-Rico, T. C., Enkerlin-Hoeflich, E., & Hamilton, R. B. (2002). Prductivity and nesting succes of Thick-Billed parrot. *The Condor* 104, 788-794.
- Monterrubio-Rico, T. C., Álvarez-Jara, M., Téllez-García, L., & Tena-Morelos, C. (2014). Hábitat de anidación de *Amazona oratrix* (Psittaciformes: Psittacidae) en el Pacífico Central, México. *Revista Biológica Tropical* 62 (3), 1053-1072.
- Monterrubio-Rico, T. C., Charre-Medellín, J. F., Pacheco-Figueroa, C., Arriaga-Weiss, S., Valdez-Leal, J. de D., Cancino-Murillo, R., Escalona-Segura, G., Bonilla-Ruz, C., & Rubio-Rocha, Y. (2016). Distribución potencial histórica y contemporánea de la familia Psittacidae en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87, 1103-1117.


- Monterrubio-Rico, T. C., Labra-Hernández, M. A., Ortega-Rodríguez, J. M., Cancino-Murillo, R., & Villaseñor-Gómez, J. F. (2011). Distribución actual y potencial de la guacamaya verde en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82, 1311-1319.
- Monterrubio-Rico, T. C., Renton, K., Ortega-Rodríguez, J. M., Pérez-Arteaga, A., & Cancino-Murillo, R. (2010). The endangered yellow-headed parrot *Amazona oratrix* along the Pacific coast of Mexico. *Oryx* 44 (4), 602-609.
- Morin, P. A., Chambers, K. E., Boesch, C., & Vigilant, L. (2001). Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10, 1835-1844.
- Moya, H., Peters, E., & Zamorano, P. (2011). La importancia de un enfoque regional para la conservación del hábitat natural en la frontera norte de México. Pp 49-68 en O., Sánchez, P., Zamorano, E., Peters, & H., Moya (eds). Temas sobre conservación de vertebrados silvestres en México. INE-SEMARNAT.
- Nei, M. (1973). The theory and estimation of genetic distance. Pp 45-51 in *Genetic Structure of population*. N. E., Morton (ed). University Press Hawaii, Honolulu.
- Nei, M., Tajima, F., & Tatenó, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153-170.
- Necedal, J., Sierra, D., & Arroyo, S. (2006). Es la Guacamaya Verde realmente un ave tropical? Nidificación y Alimentación en bosques templados de pino-encino del sur de Durango, México. Proceedings of the IV North American Ornithological Conference, Veracruz, Méxic. Octubre, 5, 2006. 264 p.
- Norma Oficial Mexicana 059 SEMARNAT. (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo.
- O'Brien, S. J. (1994). A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 5748-5755.
- Ogden, R., & Linacre, A. (2015). Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Fonsensic Science International: Genetic* 18, 152-159.

- Ogden, R., Dawnay, N., & McEwing, R. (2009). Wildlife DNA forensics – bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research* 9, 179-195.
- Ortiz-Pulido, R., Alcántara-Carbajal, J. L., Cueva, H., Martínez-Gómez, J., Escalante-Pliego, P., Parra-Martínez, S. M., Arroyo, T. P. F. & Albert, S. (2016). Conservación de aves en México, una instantánea de 2015. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología* 17 (2), 234-238.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4, 347-354.
- Paetkau, D., Waits, L. P., Clarkson, P. L., Craighead, L., & Strobeck, C. (1997). An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* 147, 1945-1957.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., & Estoup, A. (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13, 55-65.
- Palomera-García, C., Santana, E., & Amparán-Salido, R. (1994). Patrones de distribución de la avifauna en tres estados del occidente de México. *Anales del Instituto de Biología* 5, 137-175.
- Pertoldi, C., Bijlsma, R., Loeschke, V. (2007). Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity Conservation* 16, 4147-4163.
- Peterson, R. T., & Chalif, E. L. (1989). Aves de México. Guía de campo: Identificación de todas las especies encontradas en México, Guatemala, Belice y El Salvador. Diana.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.-M., Paetkaeu, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *The Journal of Heredity* 95, 536-539.
- Presti, F. T., Guedes, N. M. R., Antas, P. T. Z., & Miyaki, C. Y. (2015). Population genetic structure in Hyacinth Macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and identification of the probable origin of confiscated individuals. *The Journal of Heredity* 106, 491-502.



- Primack, R. B. (2014). Essentials of conservation biology. 6ta Ed. Sinauer Associates Incorporated. Pp 176-271.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Qiu-Hong, W., Hua, W., Tsutomu, F., & Sheng-Guo, F. (2004). Which genetic marker for which conservation issue? *Electrophoresis* 25, 2165-2176.
- Rannala, B., & Mountain, J. (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. National Aademic of Sciences* 94, 9197-9201.
- Ríos-Muñoz, C. A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2009). Efectos del cambio de uso de suelo en la disponibilidad de hábitat para los psitácidos de México. *Ornitología Neotropical* 20, 491-509.
- Rivera-Ortíz, F. A., Contreras-González, A. M., Soberanes-González, C. A., Valiente-Banuet, A., & Arizmendi, M. C. (2008). Seasonal abundance and breeding chronology of the Military Macaw (*Ara militaris*) in a semi-arid región of central Mexico. *Ornitología Neotropical* 19, 255-263.
- Rivera-Ortíz, F. A., Oyama, K., Ríos-Muñoz, C. A., Solórzano, S., Navarro-Sigüenza, A. G., & Arizmendi, M. C. (2013). Habitat characterization and modeling of the potential distribution of the Military Macaw (*Ara militaris*) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84, 1200-1215.
- Rivera-Ortíz, F. A., Solórzano, S., Arizmendi, M. C., Dávila-Aranda, P., & Oyama, K. (2017). Genetic diversity and structure of the Military Macaw (*Ara militaris*) in Mexico: implications for conservation. *Tropical Conservation Science* 10, 1-12.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.
- Russello, M. A., Calcagnotto, D., DeSalle, R., & Amato, G. (2001). Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes* 1, 162-164.
- Russello, M. A., Hyseni, C., Gibbs, J. P., Cruz, S., Marquez, C., Tapia, W., Velensky, P., Powell, J. R., & Caccone, A. (2007) Lineage identification of Galápagos tortoises in captivity worldwide. *Animal Conservation* 10, 304-311.

- Russello, M. A., Lin, K., Amato, G., & Caccone, A. (2005). Additional microsatellite loci for the endangered St. Vicent Parrot, *Amazona guildingii*. *Conservation Genetics* 6, 643-645.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J., & Margules, C. R. (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5(1), 18-32.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews. Genetics* 5, 63-69.
- Strewe, R., & Navarro, C. (2003). New distributional records and conservation importance of the San Salvador valley, Sierra Nevada de Santa Marta, northern Colombia. *Ornitología Colombiana* 1, 29-41.
- Symes, C. T., & Perrin, M. R. (2003). Seasonal occurrence and local movements of the grey-headed (Brown-necked) parrot *Poicephalus fuscicollis suahelicus* in southern Africa. *African Journal of Ecology* 41, 299-305.
- Tonteri, A., Je, A., Zubchenko, A. V., Lumme, J., & Primmer, C. R. (2009). Microsatellites reveal clear genetic boundaries among Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations from the Barents and White seas, northwest Russia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, 717-735.
- Valiente, Q. J. (2007). Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas. Tesis (Doctorado). Universidad de Córdoba. Departamento de genética. Córdoba, España.
- Veló-Antón, G., Godinho, R., Ayres, C., Ferrand, N., & Cordero-Rivera, A. (2007). Assignment tests applied to relocate individuals of unknown origin in a threatened species, the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Amphibia-Reptilia* 28, 475-484.
- Yue, G. H., Xia, J. H., Liu, P., Liu, F., Sun, F. & Lin, G. (2012). Tracing asian seabass individuals to single fish farms using microsatellites. *PLOS ONE* 7 (12), 1-5.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

	<b>ORGANIZACION PARA LA CONSERVACION, ESTUDIO Y ANALISIS DE LA NATURALEZA A.C.</b>
<b>CERTIFICADO DE NACIMIENTO EN CAUTIVERIO</b>	
<b>FOLIO</b> 123	<b>CLAVE DE REGISTRO</b> DGVS-CR-IN-0878-GTO./06
FECHA DE NACIMIENTO: 03-septiembre-2012	
NOMBRE COMUN: Guacamaya verde.	
NOMBRE CIENTIFICO: Ara Militarisis.	
SEXO:	MARCA: R FEXQT.328
PADRE: 007562 788	MADRE: 005322 842
<small>Este documento no es valido sin el sello y la firma original</small>	
<b>CERTIFICA</b>  MVZ FRANCISCO ACEVEDO ARTEAGA RESPONSABLE TECNICO CÉDULA: 1874226	 OCEAN, A.C. FUNDACION AFP OCE940815B12
<small>El poseedor de este animal está obligado y se compromete a dar seguimiento a todos los tramites que marcan las leyes y reglamentos correspondientes.</small>	
<small>CRIADERO: OFICINA: CALLE 5 DE MAYO No.17 NAUCALPAN DE JUAREZ, ESTADO DE MEXICO TEL.: 58 70 15 00 ( EXT. 127) FAX: 58 72 32 37 E-mail tgerardo@yahoo.com.mx E-mail fcoacevedoa@yahoo.com.mx</small>	

11. ANEXO. Certificado de nacimiento del individuo en cautiverio