



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Ara militaris*
(Psittacidae) EN MÉXICO**

Tesis

Que como requisito para obtener
el título profesional de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

MVZ. JUAN PABLO CASTREJON GAONA

**ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO
COASESORA: DRA. GABRIELA PADILLA JACOBO**

Morelia Michoacán, marzo de 2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
Distribución de psitácidos en México	5
Clasificación y características morfológicas de <i>Ara militaris</i>	6
Hábitat y alimentación	7
Distribución de <i>Ara militaris</i> en México	8
Estatus de conservación	10
Estudios genéticos en <i>Ara militaris</i>	10
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Muestras biológicas y secuencias	17
Extracción de ADN	17
Amplificación de marcadores mitocondriales	18
Secuenciación y análisis del ADN	19
Análisis de las relaciones genealógicas	19
RESULTADOS	21
Extracción de ADN y amplificación de marcadores mitocondriales	21
Métricas de diversidad genética	22
Relaciones genealógicas	24
Marcador Cytb	24
Marcador ND2	27
Marcador RC	30
DISCUSIÓN	34
Diversidad genética	34
Relaciones genealógicas	36
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA	42

RESUMEN

Ara militaris es un ave carismática, de gran tamaño y con tendencia a vocalizar, debido a ello, en México es la cuarta especie de psitácido más incautada del tráfico ilegal. Esta condición, y la destrucción de su hábitat han provocado la extirpación de sus poblaciones en diferentes regiones de su distribución original. Como consecuencia, en la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 se encuentra enlistada como en peligro de extinción. Actualmente, las estrategias de conservación requieren de la información genética que ayude a priorizar poblaciones para la conservación de las especies. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética y las relaciones genealógicas de *A. militaris* a través de los marcadores de ADN mitocondrial Cytb, ND2 y RC. Se realizó el análisis de un grupo de individuos de Sinaloa y Michoacán, México, y adicionalmente se incluyeron las secuencias reportadas para la especie en la base de datos internacional GeneBank-NCBI. Se revisaron los índices de diversidad genética y se estimaron las relaciones genealógicas a través de redes de haplotipos y árboles genealógicos. Los individuos de *A. militaris* analizados mostraron una diversidad haplotípica alta para los tres marcadores. Con Cytb se detectó una diversidad nucleotídica baja y valores de D_T negativos, lo cual sugiere que la población pasó por un cuello de botella seguido de una expansión rápida. Sin embargo, con ND2 y RC se observó una diversidad nucleotídica moderada, sugiriendo una población grande y estable con historia evolutiva antigua, aunque en este caso, los datos de D_T , no apoyan contundentemente la estabilidad poblacional. Para los individuos de la vertiente del Pacífico se detectó una diversidad haplotípica alta y una diversidad nucleotídica baja con los tres marcadores analizados, sugiriendo que esta población pasó por un cuello de botella seguido de una expansión rápida. A través de las redes de haplotipos y de los árboles genealógicos, se detectaron cuatro grupos genéticos para *A. militaris*. En México se encontraron dos grupos en la vertiente del Pacífico y uno en la vertiente del Golfo, y se identificó un cuarto grupo genético en Bolivia. Se propone que los tres grupos genéticos de México sean considerados como Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs).

Palabras clave: ADN mitocondrial, marcadores moleculares, genealogías.

ABSTRACT

Ara militaris is a charismatic bird, large in size and with a tendency to vocalize, due to this, in México it is the fourth most seized parrot species from illegal traffic. This condition, and the destruction of their habitat have caused the extirpation of their populations in different regions of their original distribution. As a consequence, in the official Mexican norm NOM-059-SEMARNAT-2010 it is listed as in danger of extinction. Currently, conservation strategies require genetic information to help prioritize populations for the conservation of species. The objective of this study was to analyze the genetic diversity and genealogical relationships of *A. militaris* through the mitochondrial DNA markers Cytb, ND2 and RC. The analysis of a group of individuals from Sinaloa and Michoacán, México was carried out, and the sequences reported for the species in the international GeneBank-NCBI database were also included. Genetic diversity indices were reviewed, and genealogic relationships were estimated through haplotype networks and genealogic trees. The individuals of *A. militaris* analyzed showed high haplotype diversity for the three markers. With Cytb, low nucleotide diversity and negative D_T values were detected, suggesting that the population went through a bottleneck followed by rapid expansion. However, with ND2 and CR, a moderate nucleotide diversity was observed, suggesting a large and stable population with an ancient evolutionary history, although in this case, the D_T data do not strongly support population stability. For individuals from the Pacific slope, a high haplotype diversity and a low nucleotide diversity were detected with the three markers analyzed, suggesting that this population went through a bottleneck followed by a rapid expansion. Through haplotype networks and genealogic trees, four genetic groups for *A. militaris* were detected. In México, two groups were found on the Pacific slope and one on the Gulf slope, and a fourth genetic group was identified in Bolivia. It is proposed that the three genetic groups of Mexico be considered as Evolutionarily Significant Units (ESUs).

INTRODUCCIÓN

En el mundo existen alrededor de 10,500 especies de aves, de las cuales entre 1,123 y 1,150, que corresponde a cerca del 11% del total mundial, habitan en México. Esto coloca al país en el onceavo lugar de acuerdo con su riqueza en especies de aves y en el cuarto lugar en proporción de endemismo entre los países megadiversos del mundo (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

Un total de entre 194 y 212 especies son endémicas de México, lo que equivale a aproximadamente entre el 18 y 20% del total de especies registradas en el país, y de estas entre 298 y 388 especies (26-33%) se encuentran en alguna categoría de amenaza de acuerdo con las autoridades nacionales o internacionales (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014).

De las diferentes familias de la clase de las Aves, la familia Psittacidae está compuesta por aproximadamente 374 especies incluyendo guacamayas, loros y pericos, los cuales se distribuyen en las regiones tropicales del hemisferio sur y el hemisferio norte, encontrándose la mayor diversidad principalmente entre los dos trópicos (el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio). Este grupo, se caracteriza por tener un pico robusto y curvado hacia abajo, garras prensiles con dos dedos dirigidos hacia delante y dos hacia atrás, a este tipo de patas en aves se le conoce como “zigodáctilas”, son comunes los colores llamativos y existe poco dimorfismo sexual (Ibáñez *et al.*, 2014).

Lamentablemente, hoy en día el 26% de las especies del planeta se consideran amenazadas con la extinción y el 11% están bajo la categoría de casi amenazadas (Collar, 1997). En este caso la pérdida de hábitat en combinación con el saqueo de individuos para el comercio ilegal son las amenazas más significativas para las especies de este grupo de aves.

De acuerdo con Joseph *et al.* (2012), en la subfamilia Arinae se encuentran todos los psitácidos neotropicales. Esta subfamilia se ha subdividido en tres tribus, Arini, Incertae Sedis y Androglossini, y dentro de la tribu Arini está el género *Ara* que forma un grupo morfológicamente diverso denominado guacamayas, donde se incluyen ocho especies (*Ara ararauna*, *Ara glaucogularis*, *Ara macao*, *Ara chloropterus*, *Ara militaris*, *Ara ambiguus*, *Ara rubrogenys* y *ara severus*) y dos especies extintas (*Ara autocthonnes* y *Ara tricolor*). Seis especies del género *Ara* se clasifican como guacamayas grandes.

La guacamaya verde, *Ara militaris*, tiene una distribución geográfica fragmentada; se encuentra tanto en México como en América del Sur en Venezuela y Argentina (Howell y Webb, 1995). Dentro de cada uno de estos países, la especie tiene una distribución muy irregular que coincide aproximadamente con la de los bosques secos tropicales (Collar, 1997). Anteriormente, el tamaño de la población se calculaba en alrededor de 10,000-19,999 individuos, sin embargo, las estimaciones recientes calculan una población de apenas 3,000 a 10,000 individuos de los cuales equivalen de 2,000 a 6,600 en la etapa madura (Bird Life international, 2020). Sin embargo, esta población presenta una tendencia claramente decreciente (Collar *et al.*, 1992, Snyder *et al.*, 2000, Bird Life Internacional, 2020). Actualmente, en México las estimaciones indican un tamaño de población de 1,563 y 3,263 individuos (Monterrubio-Rico *et al.*, 2021).

En México, las poblaciones de *A. militaris* han sido severamente saqueadas en los últimos 70 años. Cantú *et al.* (2007) estiman que los traficantes ilegales capturan entre 65,000 y 78,500 psitácidos anualmente, incluyendo más de 500 guacamayas verdes, con una tasa de mortalidad del 77%. Muchas de las especies de psitácidos incluyendo a *A. militaris* existen en hábitats altamente degradados, por lo que sus poblaciones se encuentran en declive (Fogel *et al.*, 2016). Por lo anterior, sería de gran valor estimar la diversidad genética de las poblaciones para que a través de ella se pueda proponer el establecimiento de unidades para la conservación de la especie.

En la actualidad, a través de la secuenciación de ADN se puede observar la variación de caracteres presentes en el ADN nuclear (ADNnu) y mitocondrial (ADNmt). Estos datos, permiten, por ejemplo, determinar si una población está evolucionando independientemente, si se intercambian individuos entre poblaciones o si hay un estado intermedio de aislamiento. En el área de la biología de la conservación pueden ayudar a identificar prioridades en los planes de manejo y conservación dentro de las especies (Zink, 2004; Phillimore and Owens, 2006). Bajo este marco la filogenia y la conservación se unen en el concepto de Unidades Evolutivamente Significativas (ESU), esta idea básicamente propone que se debe tomar en cuenta la información histórica que reflejan los caracteres moleculares para diseñar estrategias de manejo y conservación de las especies (Moritz, 1994).

ANTECEDENTES

Distribución de psitácidos en México

En México, la familia Psittacidae está representada por 21 especies (American Ornithologists' Union, 1998; Howell y Webb, 1995), todas pertenecientes a la tribu monofilética Arini, con una presencia exclusiva en el continente americano, y cuya distribución más septentrional se encuentra en México. En nuestro país, se puede encontrar a estas especies en bosques tropicales perenifolios, bosque tropical seco, bosques de pino y manglares, principalmente en los estados de la vertiente del Pacífico desde Sonora hasta Chiapas, y por la vertiente del Golfo desde Tamaulipas hasta la Península de Yucatán (Forshaw, 1989; HBW, 2018; Howell y Webb, 1995, Joseph *et al.*, 2012).

De las 21 especies registradas para nuestro país, el 100% se encuentran en alguna categoría de riesgo debido principalmente a dos razones, una es la fuerte problemática de explotación local y regional para el comercio ilegal de mascotas, y la otra, son las altas tasas de deforestación tanto de bosques templados como de bosques tropicales. Ambas tienen un impacto negativo reduciendo la distribución de las poblaciones de las diferentes especies (Cantú *et al.*, 2007).

La norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye 10 especies de psitácidos en peligro de extinción; *Amazona auropalliata*, *Amazona farinosa*, *Amazona finschi*, *Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*, *Ara macao*, *Ara militaris*, *Pyrilia haematotis*, *Rhynchopsitta pachyrhyncha* y *Rhynchopsitta terrisi*. Adicionalmente, tres subespecies endémicas: *Psittacara holochlorus brevipes*, *P. h. brewsteri* y *Forpus cyanopygius insularis*. Además, otras cuatro especies se encuentran bajo la categoría de protección especial (*Amazona albifrons*, *Eupsittula canicularis*, *Eupsittula nana* y *Forpus cyanopygius*) y seis especies se encuentran bajo la categoría de amenazadas (*Amazona xantholora*, *Psittacara holochlora*, *Psittacara strenuus*, *Bolborhynchus lineola*, *Brotogeris jugularis* y *Pionus senilis*) (Semarnat, 2010), y para *Amazona autumnalis* no hay datos.

En el caso de los psitácidos, como una consecuencia del saqueo y la venta para el mercado de mascotas, una especie puede ser extirpada de una región aún en presencia de hábitat primario. Un ejemplo de este caso se documentó para el loro cabeza amarilla (*Amazona oratrix*) en la costa de Michoacán, donde se estimó que la tercera parte de

pérdida de distribución de la especie no se debió a la reducción del hábitat, sino al fuerte comercio ilegal y saqueo de nidos, ya que en áreas donde fue extirpada todavía presentaba hábitat para su presencia, representando hasta un 38% de la pérdida de distribución para una región (Monterrubio-Rico *et al.*, 2007).

Las especies de psitácidos carismáticos, de mayor tamaño y que además tienden a vocalizar, son las más vulnerables al saqueo de nidos como es el caso de la guacamaya verde, que fue extirpada de la costa de Michoacán en los años ochenta (Monterrubio-Rico *et al.*, 2011).

La actividad de captura de aves con fines de ornato o compañía se remonta a tiempos prehispánicos y es una de las actividades de mayor presencia en la sociedad mexicana. Las personas que practican esta actividad reciben la denominación de pajareros, y más de la mitad de los pajareros del país tiene orígenes indígenas, es un oficio familiar que se transmite de una generación a otra. Según datos oficiales de la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), en 2016 había 568 pajareros con permisos para capturar aves silvestres (Roldan-Clara, 2017).

Clasificación y características morfológicas de *Ara militaris*

La clasificación taxonómica de *A. militaris* se describe a continuación:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Aves

Orden: Psittaciformes

Familia: Psittacidae

Género: *Ara*

Especie: *Ara militaris*

La guacamaya verde, es un ave de aproximadamente 70 cm de longitud, de color verde lima oscuro con frente roja y área facial desnuda de color blanco con líneas negras. Las plumas de vuelo son de color azul en la parte superior y amarillo en la parte inferior, espalda baja color azul, y la cola es de color azul con parte intermedia roja. El pico es

grueso, curvado hacia abajo y completamente negro. Tiene una voz ruidosa similar a un cr-aaak además de gritos aulladores (CITES, 2018).

Adicionalmente, con base en algunas diferencias morfológicas y a su distribución en el continente americano, Forshaw (1989), Howell y Webb (1995) y Collar *et al.*, (2017) han propuesto tres subespecies; *A. m. militaris*, *A. m. mexicanus* y *A. m. bolivianus*. Las características distintivas de cada subespecie propuesta son:

Ara m. militaris: cara desnuda con plumas a modo de líneas por delante y debajo de los ojos, la garganta se presenta ligeramente impregnada de un color castaño oliva, la cola es de color rojo oscuro con la punta azul. Se le encuentra desde Santa María, Sierra de Perijá y la Cordillera de la Costa norte en Venezuela hacia el sur a través de los Andes de Colombia, este de Ecuador, Perú y oeste de Bolivia.

Ara m. mexicanus: es más grande que *A. m. militaris*, presenta cola larga, verde y azul en general, la parte inferior de las plumas de vuelo son de color metálico amarillento. Se distribuye desde el oeste y noreste de México por el Pacífico desde el sur de Sonora hasta el sur de Oaxaca, y al este de Nuevo León hasta el este de San Luis Potosí.

Ara m. bolivianus presenta un color marrón rojizo en la garganta; las plumas que se encuentran en la base de los oídos presentan un color rojizo, las plumas de la cola son de color azul más oscuro. Se distribuye desde el este de los Andes, sur de Bolivia (oeste de Santa Cruz) y al norte de Argentina.

Hábitat y alimentación

En México, *A. militaris* vive en bosques tropicales secos y laderas de montañas con bosques de pino–encino (Íñigo–Elías, 1999; Forshaw, 2006). Se encuentran a alturas que van desde el nivel del mar hasta los 3,100 metros sobre el nivel del mar (msnm). Sin embargo, la mayor abundancia de individuos se correlaciona con ambientes donde la precipitación anual es superior a 1,100 mm y la extensión de bosque es de alrededor de 1,800 km², con presencia de bosques tropicales semicaducifolios y de pino-encino (Monterrubio-Rico *et al.*, 2021). Las guacamayas verdes anidan principalmente en colonias dentro de cavidades tanto en árboles como en paredes verticales y acantilados (Íñigo-Elias, 1999). La alimentación de la especie depende principalmente de las plantas, incluyendo en su dieta frutos, semillas, hojas, brotes, tallos y algunas veces insectos. Las

principales familias de plantas que componen su dieta son *Anacardiaceae*, *Apocyanaceae*, *Cactaceae*, *Leguminosae*, *Mimosaceae*, *Leguminosae*, *Malpighiaceae*, *Ulmaceae*, *Palmaceae*, *Burseraceae*, *Moraceae*, *Sapotaceae*, *Euphorbiaceae*, *Bromeliaceae* y *Orchidaceae*, entre otras (Iñigo-Elias, 1999; Contreras-González *et al.* 2009). Sin embargo, se le puede considerar como una especie con una dieta muy especializada ya que solo consume entre el 10 y 23% de los recursos vegetales que se encuentran disponibles en su hábitat (Iñigo-Elias, 1999).

Distribución de *Ara militaris* en México

A. militaris es la especie de guacamaya que presenta la distribución más al norte en el continente americano. La distribución histórica se estima en un área de 464,161 Km² y la distribución contemporánea en un área de 263,919 Km², aunque la ocupación actual es de 29% (75,899 Km²) (Fig. 1) (Monterrubio-Rico *et al.*, 2016; Monterrubio-Rico *et al.*, 2021). En la vertiente del Pacífico, la distribución ocurre desde el sur de Sonora a lo largo de la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre del Sur, algunas zonas costeras, llegando hasta los estados de Oaxaca y Chiapas, donde se estima que fue extirpada a inicios del siglo pasado. En el golfo la distribución incluye la Sierra Madre Oriental desde el este de Nuevo León hasta el noreste de Querétaro (Fig. 1) (Monterrubio-Rico *et al.*, 2016). La distribución potencial de guacamaya verde en México sugiere la existencia de 226 000 km² de área climática adecuada sin considerar ningún impacto causado por el cambio en el uso del suelo (Monterrubio-Rico *et al.*, 2016). Se estima una reducción del 29 al 43% en la distribución potencial de la especie en áreas con hábitat primario, debido principalmente al saqueo de nidos y la tala selectiva de árboles maduros (Snyder *et al.*, 2000; Monterrubio-Rico *et al.*, 2016). Recientemente se ha reportado la presencia de 35 poblaciones en cuatro regiones de 16 estados con un estimado de 1,563-3,263 guacamayas, lo cual es menor a lo requerido para una viabilidad a largo plazo. Se considera que adicionalmente puede haber pequeñas poblaciones de 40 individuos o más, que no se han detectado (Monterrubio-Rico *et al.*, 2021).

En el estado de Michoacán, la presencia de la guacamaya verde está confirmada en dos regiones, utilizando potencialmente una superficie relativamente extensa en dos de las tres regiones de su presencia histórica. Sin embargo, la distribución confirmada solo

equivale al 29% de la superficie con el ambiente primario y que cuenta con las condiciones aptas para la especie (Monterrubio-Rico *et al.*, 2011).

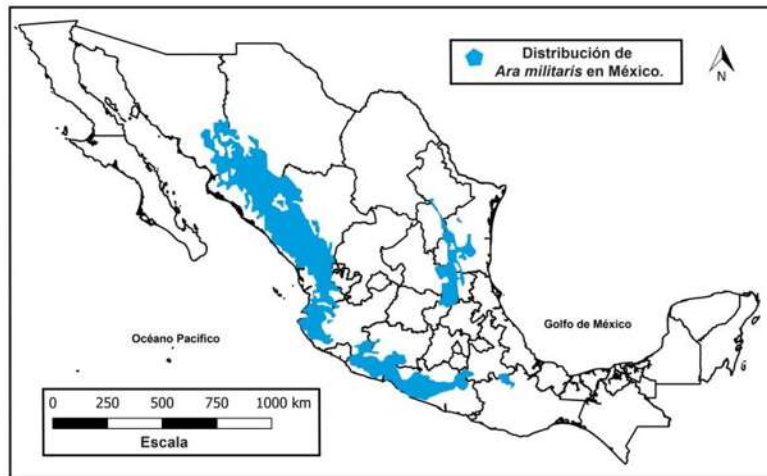


Figura 1. Distribución geográfica de *Ara militaris* en México. El área en azul representa la distribución actual estimada de la especie. Mapa modificado de Howell y Webb (1995) y Monterrubio-Rico *et al.* (2016), tomado de Rodríguez-González (2019).

Como se observa en la figura 2, la especie no se registra actualmente en la costa de Michoacán. La distribución histórica de *A. militaris* sugiere que existió en esta región la cual aún cuenta con el ambiente primario necesario para la existencia de la guacamaya. Por lo tanto, su exterminación en esta zona no se debió a la pérdida del hábitat por cambio de uso de suelo ni la destrucción de estos sitios, sino a la fuerte actividad de saqueo de individuos para comercio ilegal (Monterrubio-Rico *et al.*, 2011).

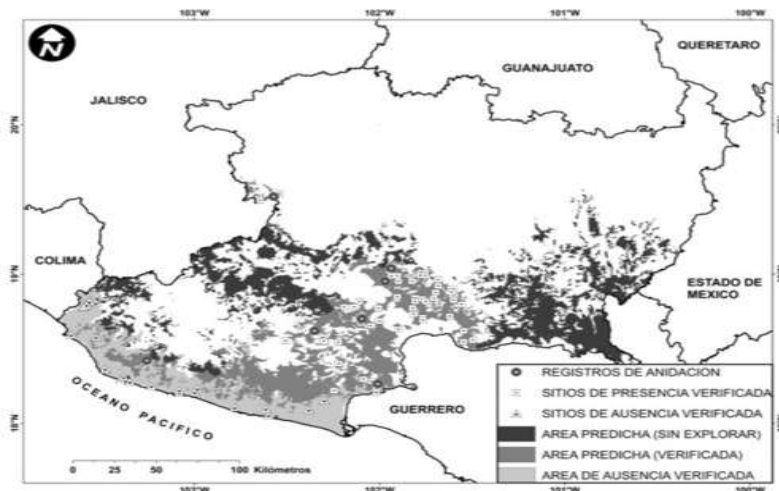


Figura 2. Distribución de la guacamaya verde en Michoacán. Se indican las áreas de distribución confirmada, distribución potencial y las áreas de extirpación (Monterrubio-Rico *et al.*, 2011).

Estatus de conservación

A. militaris es un psitácido que está considerado en peligro de extinción en México bajo la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) y en el mundo está catalogada como especie vulnerable (IUCN, 2011). Además, está listada en el apéndice I de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 1998). Está legalmente protegida en Venezuela, Perú y la provincia de Salta en Argentina (Bird Life international, 2016). En México, esta especie sigue siendo una de las más buscadas para el comercio ilegal; entre 1995 y 2005, fue la quinta especie de psitácidos más incautada por la Agencia de Ejecución Ambiental de USA, y para el periodo de 2007 a 2010 se convirtió en la cuarta especie más incautada (Bird Life International, 2018).

Adicionalmente, la población va en descenso debido a la destrucción o fragmentación del hábitat. La tasa anual de deforestación de los bosques es de alrededor del 3.27% al 5.21% donde se incluye el hábitat de la guacamaya verde en México (Iñigo-Elías, 1999). Se estima que, en un periodo de 30 años, del 29% al 32% del área de distribución de guacamaya verde ha sido deforestada y se han producido extinciones locales a lo largo de la vertiente del Pacífico (Marín-Togo *et al.*, 2012). Sin embargo, la especie esta principalmente amenazada por su baja abundancia total, distribución fragmentada y la pérdida del bosque alrededor de las poblaciones con mayor abundancia (Monterrubio-Rico *et al.*, 2021).

Estudios genéticos en *Ara militaris*

Los estudios moleculares comenzaron a tener gran auge cuando se identificó la pérdida de potencial adaptativo asociado a la pérdida de diversidad genética, y la disminución de eficacia promedio, resultante de la acumulación de endogamia y de alelos deletéreos (Loo, 2011). Las poblaciones endogámicas tienen por consecuencia el incremento de la susceptibilidad a patógenos y disminuye la capacidad de sobrevivir frente a cambios ambientales (Loo, 2011). De ahí la importancia de que la diversidad genética presente en una población sea considerada en planes de conservación para evitar su extinción (Piñero *et al.*, 2008).

La diversidad genética es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones, ya que les otorga la capacidad de adaptación ante distintos ambientes. Además, con la conservación de las especies se preserva el patrimonio genético de una región, y el estudio de variedades particulares permite detectar genes únicos con posible utilidad para estas poblaciones (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001).

Los estudios genéticos a través de los marcadores moleculares no han dejado de crecer en las últimas décadas. La evaluación del estado genético de las poblaciones y la propuesta de medidas para preservar la diversidad genética y prevenir los riesgos de naturaleza genética para la persistencia de las poblaciones, han sido los objetivos centrales fundamentales de la genética de la conservación, donde los marcadores moleculares han resultado enormemente útiles. Por otro lado, la aplicación de los marcadores moleculares, también pueden contribuir de manera fundamental al entendimiento de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies en peligro, la ecología y el comportamiento de las especies que pueden ayudar a la evaluación de riesgos, la asignación de prioridades, la delimitación de unidades y el diseño de estrategias de conservación eficaces (Godoy, 2009).

Con el respaldo de la información almacenada en las secuencias de ADN, la filogenia molecular ha permitido documentar la diversidad evolutiva dentro de las especies y ha otorgado pistas sobre los procesos históricos de las poblaciones. Estos son fundamentales en el diseño de estrategias de conservación cuya finalidad sea conservar los procesos que garanticen al sistema la capacidad de mantenerse y evolucionar. Un concepto que cumple con este fin es el de Unidad Evolutivamente Significativa (ESU) que se define como *“un grupo de poblaciones históricamente aisladas, que deben ser monofiléticas recíprocas para secuencias de ADNmt y también diferir significativamente para las frecuencias de alelos de loci nucleares”* (Moritz, 1994). Esta idea busca que se reconozca y proteja la herencia evolutiva y que el potencial evolutivo inherente sea mantenido a través de ellas. El concepto de ESU ayuda en la decisión de priorizar unidades intraespecíficas en manejo y conservación y provee un marco filogenético para decidir qué unidad poblacional es más distintiva (Avice, 2000).

Los genomas de ADN mitocondrial (ADNmt), proveen abundante información en cuanto a estudios evolutivos de diferentes taxones y como fuente de marcadores moleculares

en los estudios de conservación de especies en peligro de extinción (Urantowka, 2013). El genoma de ADN mitocondrial se diferencia del genoma nuclear en características como un mayor número de copias, la ausencia de recombinación e intrones, un menor tamaño, organización similar a la del genoma de los procariontes, de herencia materna y diferencias en el código genético (Bejarano, 2001).

Sin embargo, se han realizado pocos estudios que estiman la diversidad genética y estructura en poblaciones de psitácidos en México. Actualmente, solo se cuenta con el estudio de la historia demográfica del periquito atolero (*Eupsittula canicularis*) en México a través de marcadores mitocondriales. Los resultados del estudio mostraron tres grupos genéticos con alta diversidad de haplotipos ($Hd = 0.8$) y baja diversidad nucleotídica ($Pi = 0.00198$) que sugieren un cuello de botella seguido de una rápida expansión (Padilla-Jacobo *et al.*, 2018).

Hasta ahora, se han publicado las secuencias de pocos genomas de especies del género *Ara*; por ejemplo, el de *A. macao* (No. acceso: CM002021) (Seabury *et al.*, 2013), el de *A. glaucogularis* (No. acceso: JQ782215) (Urantowka, 2014), y el de *A. militaris* (16.988 pb) (No. acceso: JX524613) (Urantowka, 2015). Las secuencias de estos genomas, se ha utilizado en estudios de sistemática molecular y diversidad genética dentro del género. Para *A. militaris* existen dos publicaciones donde se analizan algunos aspectos que tocan la diversidad genética de la especie. En uno de estos estudios, Eberhard *et al.* (2015) reportaron el análisis de las relaciones entre algunos individuos de *A. militaris* y de *A. ambiguus*. Los resultados del análisis realizado a través de secuencias de los genes mitocondriales ATPasa6 y ATPasa8, citocromo oxidasa I (COI) y NADH Deshidrogenasa 2 (ND2), mostraron que las dos especies son monofiléticas, es decir con linajes evolutivos distintos. Por otro lado, para *A. militaris* se detectó una estructura genética con dos grupos, uno en el Este y otro Oeste de México.

En un segundo estudio, Rivera Ortiz *et al.* (2017) realizaron análisis genéticos en individuos de *A. militaris* provenientes de algunas localidades de Sinaloa y Nayarit en la Sierra Madre Occidental, de Oaxaca en la Sierra Madre del Sur, y de Querétaro y Tamaulipas en la Sierra Madre Oriental. Su objetivo fue determinar la diversidad genética de la población a través de análisis a través de marcadores moleculares nucleares tipo microsatélite. Los resultados del análisis de los individuos con distribución en la vertiente

del Pacífico mostraron un grupo genético con un coeficiente de endogamia (F_{IS}) en un rango de 0.03 a 0.15, que sugiere un exceso significativo de individuos homocigóticos. Los resultados de los análisis de individuos con distribución en la Sierra Madre Oriental mostraron otro grupo genético diferenciado del grupo de la vertiente del Pacífico con un F_{IS} de 0.08 a 0.12. El análisis de diferenciación genética entre poblaciones confirmó una estructura genética en dos grupos separados por la meseta central mexicana. Aunque los niveles de heterocigocidad de *A. militaris* en México fue menor (0.62) que la encontrada para otra especie de guacamayas del género en América del Sur (*Ararauna* $H_o = 0.88$), esta muestra niveles de heterocigocidad mayores que las de especies de guacamayas endémicas como *Anodorhynchus hyacinthinus* ($H_o = 0.40$) y *Cyanopsitta spixii* ($H_o = 0.50$) que se encuentran amenazadas en Brasil (Presti et al., 2011).

Finalmente, existe el antecedente del análisis de un grupo de individuos de Sinaloa, México, a través del marcador Cytb, en donde se observó una diversidad haplotípica ($H_d = 0.655$) y nucleotídica ($P_i = 0.00539$) moderadas, lo que sugiere una población grande y estable con una historia evolutiva antigua (Grant y Bowen, 1998). Además, se detectó un grupo genético con un haplotipo dominante distribuido en todas las localidades muestreadas (Rodríguez González, 2018).

JUSTIFICACIÓN

Las amenazas que tienen las guacamayas verdes (fragmentación del hábitat y altos niveles de tráfico ilegal) representan una preocupación importante desde el punto de vista de la conservación porque podrían reducir la diversidad genética y como consecuencia producir deriva genética (endogamia) y riesgo de extinción.

Considerando que la extirpación de algunas poblaciones de *A. militaris* de su hábitat natural en diferentes regiones de México pueden haber conducido a la pérdida de diversidad genética comprometiendo la viabilidad y persistencia de la especie, en este estudio se propone el análisis de la diversidad y relaciones genéticas de individuos de *A. militaris* de localidades de la vertiente del Pacífico en México, a través de marcadores de ADN mitocondrial. Los resultados de este tipo de análisis servirán como base para priorizar la conservación y manejo de la especie.

HIPÓTESIS

Las poblaciones de *Ara militaris* de la vertiente del Pacífico Mexicano presentan baja diversidad genética.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la diversidad genética de individuos de *Ara militaris* distribuidos en localidades de la vertiente del Pacífico en México.

Objetivos particulares

- Realizar la tipificación molecular de muestras biológicas de individuos de *A. militaris* a través de marcadores de ADN mitocondrial.
- Establecer métricas de diversidad genética de la población analizada.
- Establecer las relaciones genealógicas de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas y secuencias

Se analizaron muestras biológicas de sangre, tejido y plumas de 17 individuos de *A. militaris* colectadas en localidades de Sinaloa (Cosalá, Badiraguato, Concordia y Escuinapa) y Michoacán (Reserva de Zicuirán-Infiernillo), que pertenecen a la Colección de Muestras Biológicas de Fauna Silvestre del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Las muestras estaban conservadas en viales de 2 ml con 0.5 ml de buffer de conservación y lisis (Tris 100 mM pH 8.0, EDTA 100mM pH 8.0, NaCl 10 mM y SDS 2%) (Dutton, 1996), y almacenadas a 4°C.

El análisis se realizó a través de las secuencias de ADNmt Citocromo b (Cytb), NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) y Región Control (RC). Adicionalmente, en los análisis se incluyeron las secuencias correspondientes reportadas en base de datos de GenBank-NCBI.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras biológicas de sangre o tejido por el método libre de fenol de Fitzsimmons (1997). En microtubos de 1.5 ml se agregaron fragmentos de las muestras del tamaño de un arroz y se incubaron con 150 µl de solución de extracción (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 0.1%) y 5 µl de proteinasa K (20mg/ml), durante 3 horas a 60°C en termomixer, agitándose por inversión cada 20 minutos. Después de la incubación, se agregó 75 µl de acetato de amonio 7.5 M, mezclando por inversión y se almacenó a -70°C por 20 minutos. Posteriormente, los microtubos se centrifugaron a 13,000 rpm y 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el ADN se precipitó con 500 µl de etanol 95% frío y se almacenó a -70°C por 20 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm y 4°C durante 20 minutos, el sobrenadante se eliminó por decantación y el excedente de etanol se eliminó dejando secar las pastillas a temperatura ambiente durante toda la noche. Por último, la pastilla de ADN se resuspendió en 25 µl de agua grado biología molecular y se comprobó la presencia e integridad del ADN mediante

electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Sybr Safe (Invitrogene), en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM pH 8), y se utilizó el buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell 2001). Se aplicó una corriente de 50 voltios durante 60 minutos y se visualizó en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200). Finalmente, las muestras de ADN purificado se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Amplificación de marcadores mitocondriales

Las amplificaciones de fragmentos de Cytb y región control (RC) se realizó mediante el uso del juego de oligonucleótidos CytbarmiD y CytbarmiR para un producto de amplificación de 1100 pb, y RCarmiD y RCarmiR, para un producto de amplificación de 1400 pb, previamente diseñados por Padilla-Jacobo (2016). Para la amplificación de ND2 se utilizó el juego de oligonucleótidos L5215 y HTrpC previamente reportados (Hackett, 1996; Smithsonian TR Inst.), para un producto de amplificación de 1140 pb. Las mezclas de reacción para la amplificación por PCR se prepararon en microtubos de 0.2 ml como sigue: 200 ng de ADN, 10 picomoles de cada oligonucleótido, 2.5 µl buffer para PCR 1X (20mM Tris-HCl ph 8.4, 50mM KCl), 1.5 mM MgCl, 200 µM de cada dNTP, Platinum *Taq* DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogene) en un volumen final de 25 µl completado con H₂O grado biología molecular. Las amplificaciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, alineamiento a 56°C ó 57°C durante 45 seg. y extensión a 72°C durante 2 minutos, y extensión final de 72°C durante 10 minutos, para después conservarse a 4°C (TECHNE TC-412, FTC41H2D).

La presencia y el tamaño esperado de los productos de PCR se revisó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con Sybr Safe (Invitrogene), en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM pH 8), y se utilizó el buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell 2001). Se aplicó una corriente de 50 voltios durante 60 minutos y se visualizó en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200). La concentración de las muestras de ADN se determinó en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se secaron en

ultraconcentrador (DNA-12060-C00, miVac DNA concentrator) a 50°C durante 30 minutos.

Secuenciación y análisis del ADN

La secuenciación se realizó en ambos sentidos de la cadena con el método de dideoxy (Sanger, 1977) a través del servicio comercial Psomagen, USA. Los electroferogramas y sus secuencias se analizaron, se editaron y se alinearon con el programa Bioedit 7.09 (Hall, 1999). Para corroborar la identidad de las secuencias, se compararon con la base de datos internacionales mediante el programa BLAST de NCBI (Zhang *et al.*, 2000). Para la realización de los análisis, se construyó una matriz con las secuencias alineadas mediante el uso del programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

Las métricas de diversidad genética (número de haplotipos, sitios polimórficos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica) se obtuvieron con el programa DnaSP5.10 (Librado y Rozas, 2009) para cada marcador por separado.

Análisis de las relaciones genealógicas

Las relaciones genealógicas se estimaron por medio de redes de haplotipos y árboles genealógicos. Las relaciones entre haplotipos y sus frecuencias se establecieron mediante una red de haplotipos, usando el software Network v 4.0.0.0 (Fluxus Technology, 2017). Los árboles genealógicos se estimaron bajo el criterio de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood -ML-) e inferencia bayesiana (Bayesian Inference -BI-). Para ello se utilizaron los programas RaxML (Stamatakis, 2014) y Mr Bayes v 3.1 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) respectivamente. Las matrices de datos utilizadas para la obtención de redes de haplotipos incluyeron las secuencias obtenidas en el presente estudio y las secuencias reportadas para la especie en el banco de datos (GeneBank-NCBI). Las matrices de datos utilizadas para la obtención de árboles genealógicos incluyeron las secuencias obtenidas en el presente estudio y los haplotipos únicos reportados para la especie en el banco de datos (GeneBank-NCBI).

Para estimar el modelo de evolución molecular que mejor se adecua a la matriz de datos para cada marcador, se utilizó el programa jModeltest v2.1.1 (Posada, 2008). El modelo de evolución molecular fue elegido bajo el criterio de Akaike Information Criterion (AICc)

(Alfaro y Huelsenbeck, 2006). Los soportes de los nodos se estimaron con análisis bootstrap (PB) de 1000 réplicas y con probabilidades posteriores (PP). Los análisis bayesianos se corrieron con 1×10^6 generaciones usando dos Cadenas de Markov de Montecarlo (MCMC) con las opciones predeterminadas en Mr. Bayes v3.2. Los árboles se muestrearon cada 1,000 generaciones, descartando el 10% para obtener un árbol de consenso de mayoría. Los árboles obtenidos fueron revisados con el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012).

RESULTADOS

Extracción de ADN y amplificación de marcadores mitocondriales

Se obtuvo ADN de 17 individuos de *A. militaris* (Fig. 3, Cuadro 1). Con el ADN obtenido, se realizaron los ensayos de amplificación de los marcadores RC, ND2, y Cytb. Se obtuvieron productos de PCR con el tamaño esperado para cada marcador. En la Figura 4 se muestran como ejemplo dos productos de amplificación de RC. En el Cuadro 1 se indica la lista de muestras analizadas y los marcadores obtenidos.

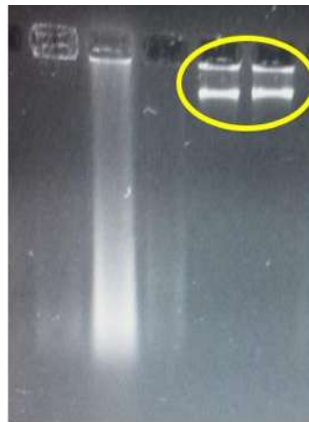


Figura 3. ADN purificado de muestras biológicas de *A. militaris*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, con TAE 1X y teñido con Sybr Safe 1X. Las imágenes muestran la presencia e integridad del ADN de las muestras.

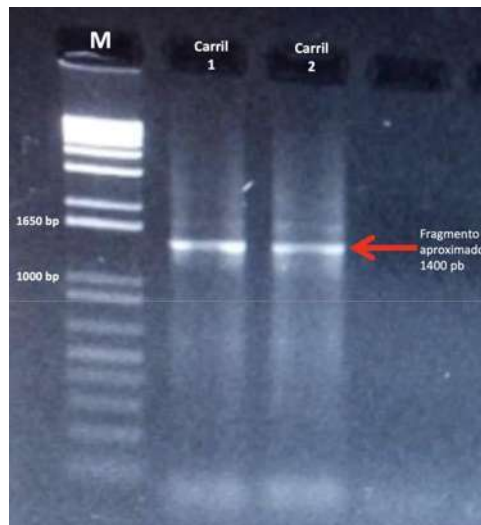


Figura 4. Productos de amplificación del marcador Cytb para *A. militaris*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X teñido con Sybr Safe 1X. En el carril M, marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder; Carriles 1 y 2, productos de amplificación de RC.

Cuadro 1. Lista de las muestras analizadas, localidad de colecta y marcadores obtenidos para cada individuo.

	Muestra	Localidad	ND2	RC	Cytb
1	ARMI-05-02	Concordia Sin.	1060	-	-
2	ARMI-05-03	Sinaloa	1056	-	-
3	ARMI-05-05	Escuinapa, Sin.	1062	-	679
4	ARMI-05-07	Concordia, Sin.	-	909	-
5	ARMI-05-08	Sinaloa	1032	-	-
6	ARMI-05-09	Concordia, Sin.	1043	-	728
7	ARMI-05-10	Concordia, Sin.	1052	-	1251
8	ARMI-05-23	Badiraguato, Sin.	-	1117	528
9	ARMI-05-36	Cosalá, Sin.	1051	1355	1249
10	ARMI-05-37	Sinaloa	749	-	-
11	ARMI-05-38	Sinaloa	1043	-	-
12	ARMI-17-02	Michoacán	970	-	-
13	ARMI-17-04	Michoacán	1061	833	889
14	ARMI-17-05	Michoacán	-	-	607
15	ARMI-18-01	Michoacán	951	-	-
16	ARMI-18-06	Michoacán	-	-	683
17	ARMI-18-07	Chocolate, Mich.	1004	-	549

Métricas de diversidad genética

Para establecer las métricas de diversidad genética se utilizó una matriz con las secuencias obtenidas en este estudio y las reportadas en la base de datos GenBank-NCBI (Cuadro 2). Las localidades de procedencia de los individuos de las secuencias en bases de datos se identificaron a través de las publicaciones de Rivera-Ortíz (2017) (Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Oaxaca, Querétaro y Tamaulipas en México) y Eberhard *et al.* (2015) (La Paz, Bolivia; Querétaro, Chihuahua y Sinaloa, México). Se obtuvieron, el número de haplotipos (H), los sitios polimórficos (S), la diversidad nucleotídica (π) y la diversidad haplotípica (H_d) para cada marcador por separado. Para la población total, con el marcador Cytb, se observaron 12 haplotipos en 46 individuos; para la RC, se detectaron 5 haplotipos en 7 individuos; y para el marcador ND2, se identificaron 9 haplotipos en 19 individuos (Cuadro 3). El marcador Cytb mostró una alta diversidad haplotípica ($H_d = 0.746$) y baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00472$). ND2 mostró alta diversidad haplotípica ($H_d = 0.924$) y alta diversidad nucleotídica ($\pi =$

0.00587). La RC también mostró alta diversidad haplotípica ($H_d = 0.905$) y alta diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00561$). Por otro lado, con respecto a los valores de D-Tajima (D_T), aunque ninguno de ellos fue significativo, todos fueron negativos (Cuadro 3).

Cuadro 2. Lista de secuencias de GenBank-NCBI y de este estudio utilizadas en los análisis.

Especie	Marcadores					
	Cytb No. acceso	Cytb Este estudio	ND2 No. acceso	ND2 Este estudio	RC No. acceso	RC Este estudio
<i>Ara militaris</i>	KT957246	ARMI-05-05	JX524613	ARMI-05-02	NC_027839	ARMI-05-07
	KT957252	ARMI-05-09	KP411048	ARMI-05-03	KM090851	ARMI-05-23
	KT957257	ARMI-05-10	KP411047	ARMI-05-05	JX524613	ARMI-05-36
	KT957269	ARMI-05-23	KP411046	ARMI-05-08		ARMI-17-04
	KT957275	ARMI-05-36	KP411045	ARMI-05-09		
	KT957271	ARMI-17-04	KP411044	ARMI-05-10		
	KT957268	ARMI-17-05	NC_027839	ARMI-05-36		
	KT957262	ARMI-18-06		ARMI-05-38		
	KT957264	ARMI-18-07		ARMI-17-02		
	KT957266			ARMI-17-04		
	KT957272			ARMI-18-01		
	KT957263			ARMI-18-07		
	KT957273					
	KT957267					
	KT957274					
	KT957270					
	KT957265					
	KT957249					
	KT957250					
	KT957253					
	KT957254					
	KT957258					
	KT957255					
	KT957256					
	KT957260					
	KT957261					
KT957247						
KT957248						
KT957251						
KT957259						
KT957241						
KT957243						
KT957242						
KT957244						
KT957245						
<i>Ara macao</i>	MK642237		EU327601		NC_045076	

Cuadro 3. Índices de diversidad genética obtenidos para individuos de la especie *A. militaris* con los marcadores Cytb, ND2, y RC.

Marcador	n	pb	S	H	Hd	Pi	D Tajima's
Cytb	46	402	15	12	0.746	0.00472	-1.38100 (ns, P>0.1)
ND2	19	940	9	9	0.924	0.00587	-0.47694 (ns, P>0.1)
RC	7	628	5	5	0.905	0.00561	-1.16366 (ns, P>0.10)

pb: pares de bases de cada secuencia. S: sitios polimórficos. H: Número de Haplotipos. Hd: Diversidad haplotípica. Pi: Diversidad nucleotídica.

Adicionalmente, se realizó un análisis de los índices de diversidad genética del grupo de individuos de la vertiente del Pacífico, incluyendo únicamente las secuencias de los individuos pertenecientes a los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán y Oaxaca. En el cuadro 4 se puede observar que la diversidad haplotípica fue alta para los tres marcadores (Cytb = 0.694, ND2 = 0.895, RC = 0.867), mientras que la diversidad nucleotídica fue baja (Cytb = 0.00387, ND2 = 0.00330, RC = 0.00244).

Cuadro 4. Índices de diversidad genética obtenidos para los individuos de la vertiente del Pacífico.

Marcador	n	pb	S	H	Hd	Pi	D Tajima's
Cytb	40	402	11	9	0.694	0.00387	-1.21120 (ns P>0.10)
ND2	15	952	9	7	0.895	0.00330	0.50796 (ns, P>0.10)
RC	6	628	4	4	0.867	0.00244	-0.67613 (ns, P>0.10)

Relaciones genealógicas

Marcador Cytb

La red de haplotipos para el marcador Cytb se construyó con una matriz de 46 secuencias de 402 pb, 9 de este estudio y 37 reportadas en GenBank-NCBI (Cuadro 1). La topología de la red mostró una separación entre los haplotipos por uno o dos pasos mutacionales (Fig. 5). Se observaron dos haplotipos dominantes por su alta frecuencia, H2 (n = 20) y H11 (n = 12). A partir del haplotipo H2 se derivan 5 haplotipos periféricos constituyendo un haplogrupo que se denominó HGI. A partir del haplotipo H11 se derivan 3 haplotipos periféricos constituyendo un haplogrupo denominado HGII. El haplotipo dominante H2, se encontró ampliamente distribuido en ejemplares procedentes de Oaxaca, Michoacán,

Jalisco, Nayarit, y Sinaloa. Los haplotipos H7, H12 y H8 corresponden a individuos con distribución en Oaxaca, Michoacán y Nayarit, respectivamente. Los individuos con los haplotipos H5 y H4 derivados de H2 mostraron una distribución en Tamaulipas y Querétaro. Finalmente, los haplotipos H1 y H3 correspondieron a individuos de Bolivia (Fig. 5).

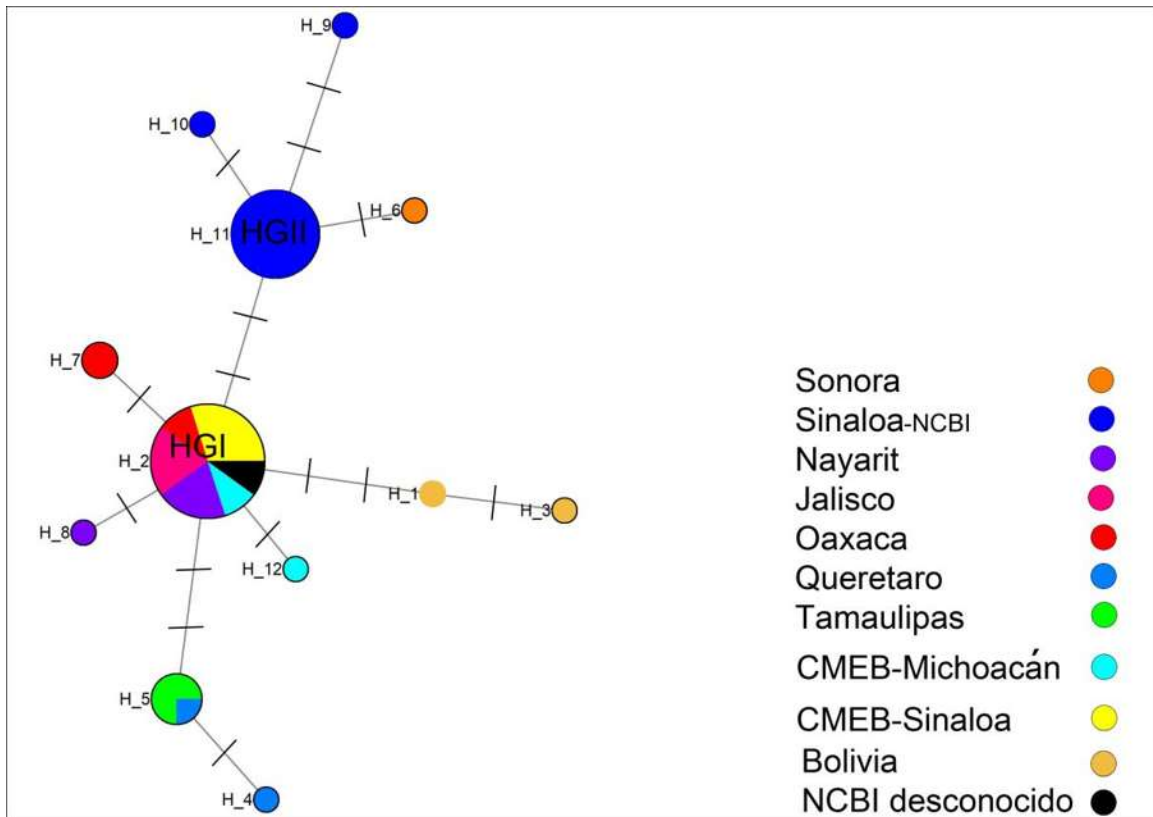


Figura 5. Red de haplotipos Median-joining. Muestra las relaciones entre 12 haplotipos de Cytb, en 46 individuos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; la longitud de las líneas no es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales representan las mutaciones entre los haplotipos. HGI, y HGII corresponden a los haplogrupos I y II, respectivamente.

Los árboles genealógicos bajo IB y ML se construyeron con el análisis de 402 caracteres de todas las secuencias obtenidas en el presente estudio y los haplotipos únicos reportados para la especie en banco de datos (GeneBank-NCBI). Adicionalmente, se incluyó una secuencia de *A. macao* como grupo externo. Como se puede observar en la figura 6, la topología del árbol de IB muestra una politomía suave en donde se encuentran las secuencias de individuos de Sinaloa, Nayarit, Michoacán y Oaxaca. Adicionalmente,

se observan tres clados, C1, C2 y C3. El clado C1 incluyó individuos de Querétaro y Tamaulipas. El clado C2 está conformado por individuos provenientes de Sonora y Sinaloa. Mientras que en el clado C3 se incluyeron individuos provenientes de Bolivia (Fig. 6).

En el árbol de ML se presentó la misma topología observada en al árbol de IB, con una politomía suave y tres clados. De igual manera la politomía incluyó individuos de Sinaloa, Nayarit, Michoacán y Oaxaca. El clado C1 incluye individuos de Querétaro y Tamaulipas, el clado C2 incluyó individuos de Sonora y Sinaloa, y el clado C3 integró los individuos de Bolivia (Figs. 6 y 7).

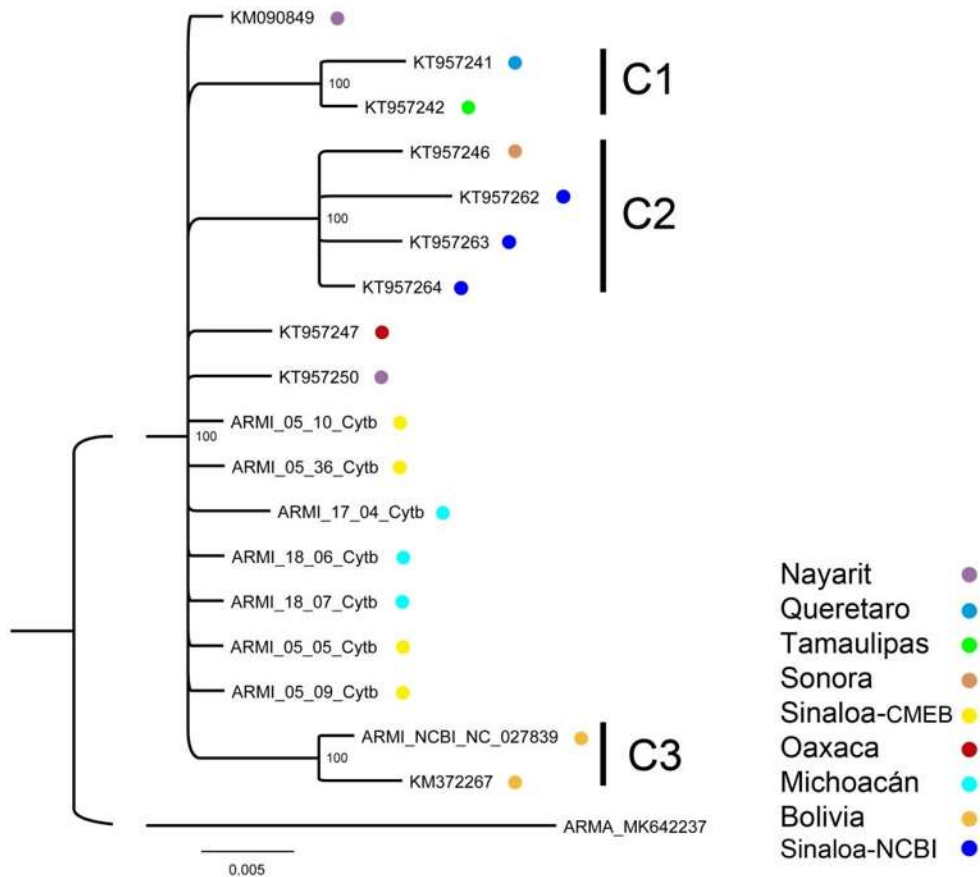


Figura 6. Árbol consenso construido bajo IB, que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *A. militaris*. Las estimaciones fueron realizadas con 402 caracteres de 12 haplotipos del marcador Cytb, en 46 individuos. Los valores sobre las ramas representan los valores de las probabilidades posteriores (PP). (*) Valor inferior a PP = 0.5.

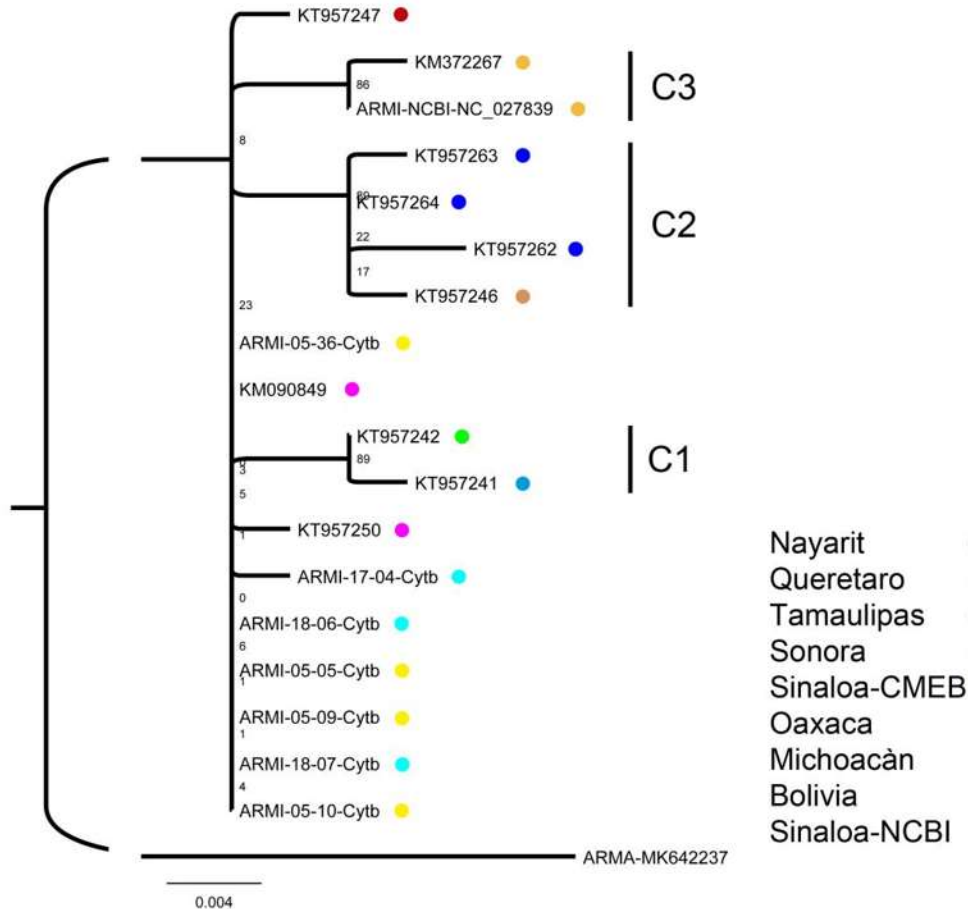


Figura 7. Árbol consenso construido bajo ML, que muestra las relaciones genealógicas entre haplotipos de *A. militaris*. Las estimaciones fueron realizadas con 402 caracteres de 12 haplotipos del marcador Cytb, en 46 individuos. Los valores sobre las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 réplicas.

Marcador ND2

La red de haplotipos para el marcador ND2 se construyó con una matriz de 19 secuencias de 940 pb, de las cuales 12 corresponden a las obtenidas en el presente estudio y 7 están reportadas en bases de datos. En el centro de la red destaca la predicción de los haplotipos hipotéticos mv1 y mv2 que conectan a los haplotipos identificados en el análisis (Fig. 8). Los haplotipos H5, H7, H8 y H9 derivan del haplotipo hipotético ancestral mv1, y cada uno está diferenciado y separado por un solo paso mutacional. Los haplotipos H5, H7 y H9 están compartidos por individuos de Michoacán y Sinaloa (dos individuos para cada haplotipo), y el haplotipo H8 se encuentra exclusivamente en dos individuos de Michoacán. A partir del haplotipo H5 se deriva el haplotipo H6 que mostró la mayor frecuencia con cuatro individuos procedentes de Sinaloa. A partir del haplotipo

H7 se deriva el haplotipo H4 compartido por un individuo de Sinaloa y otro de Chihuahua. Adicionalmente, a partir del haplotipo H4 se deriva el haplotipo H3 identificado en un individuo de Sinaloa. Por otro lado, los haplotipos H1 y H2 derivan del haplotipo hipotético mv2. El haplotipo H1 se identificó en dos individuos de Bolivia y está separado de mv2 por diez pasos mutacionales. En la relación entre mv2 y el haplotipo H2 localizado en dos individuos de Querétaro, se pudieron observar tres mutaciones (Fig. 8).

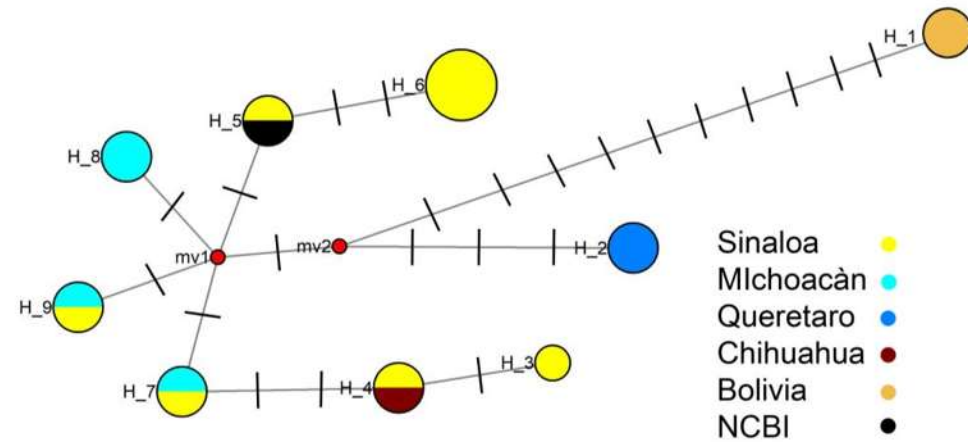


Figura 8. Red de haplotipos Median-joining. Muestra las relaciones entre 9 haplotipos de ND2 en 19 individuos de *A. militaris*. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; la longitud de líneas no es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales representan las mutaciones entre los haplotipos.

Los árboles genealógicos bajo IB y ML se construyeron con 19 secuencias de 940 caracteres y una secuencia de *A. macao* como grupo externo. En el árbol de IB, la topología muestra dos clados principales C1 y C2 (Fig. 9). En el clado C1 se agrupan secuencias de individuos de Sinaloa y la secuencia de un individuo reportado en bases de datos, de procedencia desconocida. En el clado C2 se observan cinco subclados, el subclado 1 (SC1) se encuentra conformado por individuos de Querétaro. En el subclado 2 (SC2) se encuentran individuos de Michoacán, Sinaloa y Chihuahua. El subclado 3 (SC3) lo forman individuos de Michoacán, mientras que en el subclado 4 (SC4) se encuentran individuos de Michoacán y Sinaloa. Finalmente, en el subclado 5 (SC5) se encuentran los individuos de Bolivia (Fig. 9).

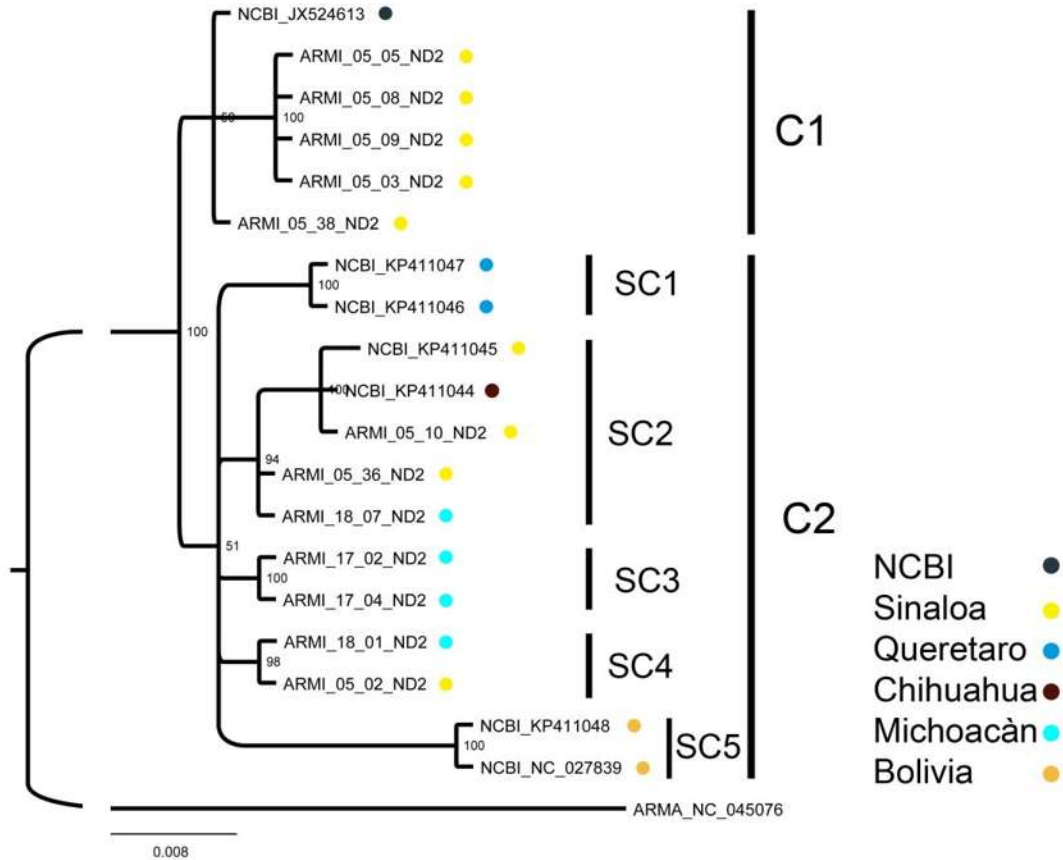


Figura 9. Árbol consenso construido bajo IB, que muestra las relaciones genealógicas entre haplotipos de *A. militaris*. Las estimaciones fueron realizadas con 940 caracteres de 9 haplotipos del marcador ND2, en 20 individuos. Los valores sobre las ramas representan los valores de las probabilidades posteriores (PP). (*) Valor inferior a PP = 0.5.

En la topología del árbol construido bajo ML un individuo de Sinaloa y un individuo de la base de datos GeneBank-NCBI de origen desconocido son basales con un valor de soporte bajo (PB = 27) (Fig. 10). Adicionalmente, el árbol muestra dos clados, C1 y C2. El clado C1 incluyó individuos de Sinaloa y el clado C2 incluyó cuatro subclados, donde se repite la misma relación observada en los análisis de IB entre los individuos que integran a los subclados SC1, SC2, SC3 y SC4 (Fig.10).

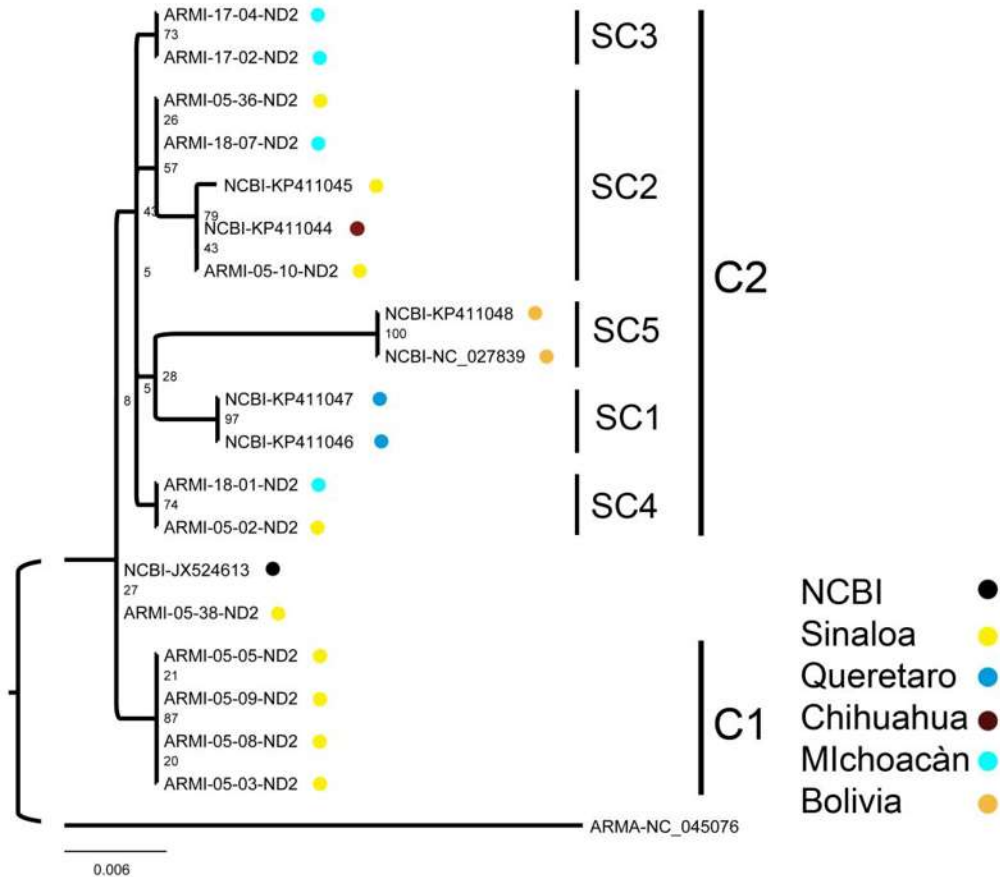


Figura 10. Árbol consenso construido bajo ML, que muestra las relaciones genealógicas entre haplotipos de *A. militaris*. Las estimaciones fueron realizadas con 940 caracteres de 9 haplotipos del marcador ND2, en 20 individuos. Los valores sobre las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 réplicas.

Marcador RC

La red de haplotipos para el marcador RC se construyó con una matriz de siete secuencias de 628 pb, de las cuales cuatro corresponden a individuos de este estudio y tres de bases de datos. La topología de la red mostró un haplotipo hipotético (mv1) a partir del cual derivan los haplotipos H2, H4 y H5. El haplotipo H2 de individuos de Bolivia se separa del haplotipo hipotético mv1 por siete pasos mutacionales. Los haplotipos H4 y H5 detectados en individuos de Sinaloa y Michoacán derivan de mv1 por un solo paso mutacional. A partir del haplotipo H4 de Sinaloa, derivan con un paso mutacional el haplotipo H1 detectado en dos individuos de origen desconocido y H3 de un individuo de Sinaloa (Fig. 11).

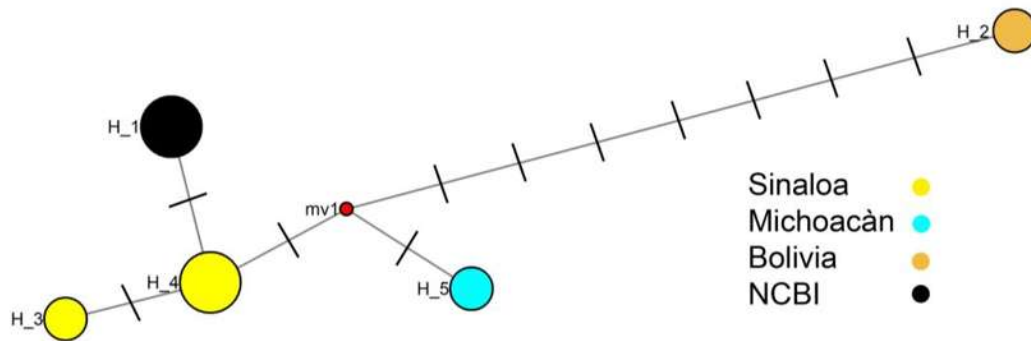


Figura 11. Red de haplotipos Median-joining. Muestra las relaciones entre cinco haplotipos de RC, en siete individuos. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos; la longitud de líneas no es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales representan las mutaciones entre los haplotipos.

Los árboles genealógicos bajo IB y ML se construyeron con una matriz de siete secuencias de 628 caracteres, de las cuales cuatro son de este estudio, y tres de bases de datos. También se incluyó una secuencia de *A. macao* como grupo externo. La topología del árbol bajo IB muestra al individuo de Bolivia basal al resto de secuencias. Además, se puede observar un clado (C1) en el cual se agrupan los individuos de Sinaloa y Michoacán. También, se observa la presencia de un subclado (SC1) donde se incluyeron individuos de la base de datos de origen desconocido (Fig. 12).

El árbol construido bajo ML, también muestra una topología donde el individuo de Bolivia es basal al resto de secuencias. Enseguida, se separa el individuo ARMI-17-04-RC de Michoacán. Además, se observa un clado (C1) en el que se agrupan los individuos de Sinaloa y los de bases de datos de origen desconocido (Fig.13).

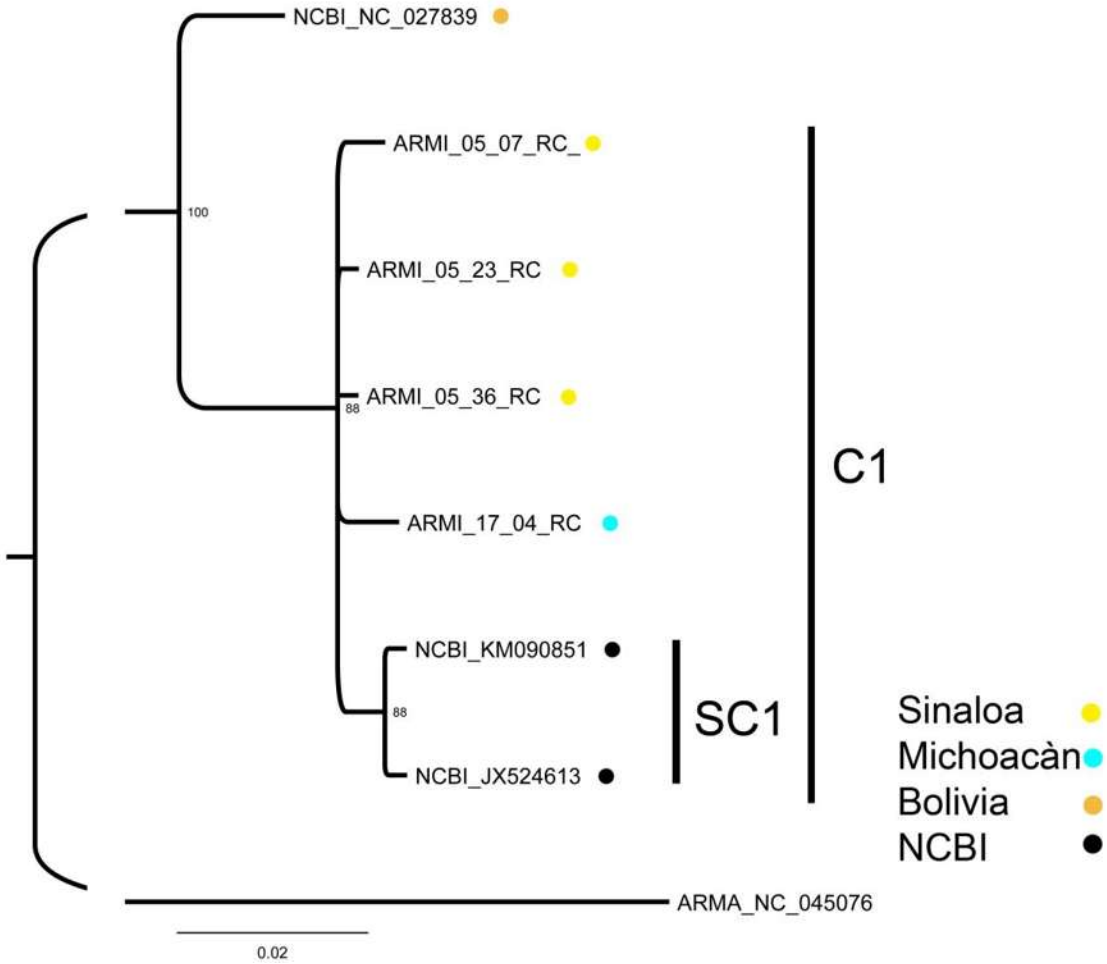


Figura 12. Árbol consenso construido bajo IB, que muestra las relaciones genealógicas entre haplotipos de *A. militaris*. Las estimaciones fueron realizadas con 628 caracteres de cinco haplotipos del marcador RC, en siete individuos. Los valores sobre las ramas representan los valores de las probabilidades posteriores (PP). (*) Valor inferior a PP = 0.5.

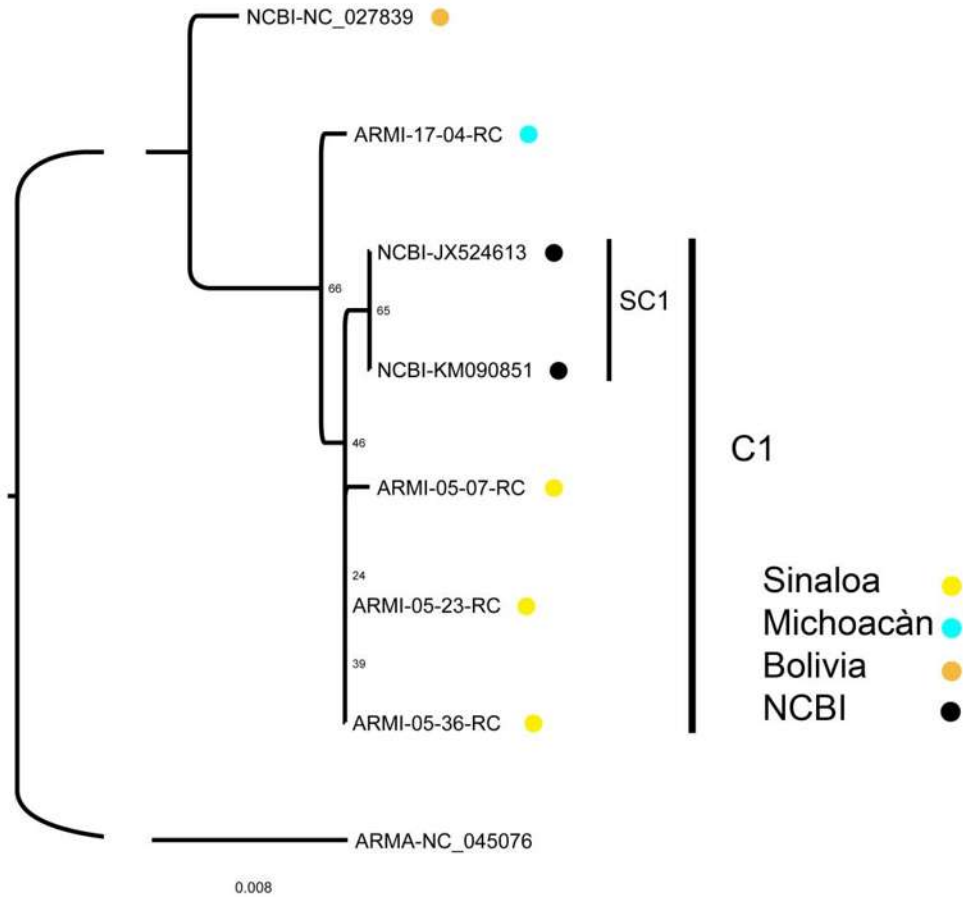


Figura 13. Árbol consenso construido bajo ML, que muestra las relaciones genealógicas entre haplotipos de *A. militaris*. Las estimaciones fueron realizadas con 628 caracteres de cinco haplotipos del marcador RC, en siete individuos. Los valores sobre las ramas representan los valores Bootstrap de 1000 réplicas.

DISCUSIÓN

Diversidad genética

Existe un amplio reconocimiento de la utilidad de la información genética, y cuando es evaluada a nivel intraespecífico se puede conocer la variación genética, flujo de genes, subdivisión de la población e historia evolutiva de los organismos. Los programas de conservación de especies requieren de la evaluación de niveles de diversidad intraespecíficos, que ayuden en la decisión de priorizar poblaciones para su conservación desde un punto de vista filogenético. En el caso de *A. militaris*, solo existen los antecedentes de los trabajos de Eberhard *et al.* (2015), Rivera Ortiz *et al.* (2016) y Rodríguez-González (2018) donde se reportan datos genéticos sobre la especie.

En el presente estudio, se realizó el análisis de la diversidad genética y relaciones genealógicas de un grupo de individuos de *A. militaris* pertenecientes a diferentes localidades de México, a través del análisis con marcadores de ADN mitocondrial.

Los resultados del estudio de la diversidad genética de los individuos analizados mostraron una diversidad haplotípica alta con el análisis de las secuencias de ADN de Cytb ($H_d = 0.746$), ND2 ($H_d = 0.924$) y RC ($H_d = 0.905$). Por otro lado, los resultados de la diversidad nucleotídica fueron diferentes entre los tres marcadores, destacando particularmente la de Cytb ($\pi = 0.00472$) que fue baja, mientras que las detectadas en ND2 ($\pi = 0.00587$) y RC ($\pi = 0.00561$) fueron moderadas (Grant y Bowen, 1998). Los resultados obtenidos con Cytb sugieren un cuello de botella seguido de una expansión rápida, donde el crecimiento promueve la retención de mutaciones nuevas (Grant y Bowen, 1998). Adicionalmente, aunque los resultados D_T no fueron significativos, al ser negativos sugieren un exceso de haplotipos raros ó crecimiento poblacional a partir de un tamaño efectivo de la población pequeño (Hedrick, 2011); lo cual, en particular para este marcador ($D_T = -1.38100$), coincide con el cuello de botella y posterior expansión sugeridos. En cambio, los resultados de ND2 y RC sugieren una población grande y estable con historia evolutiva antigua (Grant y Bowen, 1998). Sin embargo, en este caso, los valores de D_T también sugieren un crecimiento poblacional, y no necesariamente apoyan estabilidad poblacional. Aunado a ello, el tamaño de muestra no es proporcional

al analizado para el caso del marcador Cytb, por lo que estos resultados deben ser tomados con precaución.

Por otro lado, el análisis del grupo de individuos de la vertiente del Pacífico mostró alta diversidad haplotípica (Cytb Hd = 0.694, ND2 Hd = 0.895 y RC Hd = 0.867) y baja diversidad nucleotídica (Cytb pi = 0.00387, ND2 pi = 0.00330 y RC = 0.00244) para los tres marcadores. Por lo anterior, similar a lo detectado en el total de la población analizada a través de Cytb, los resultados sugieren que la población de *A. militaris* de la vertiente del Pacífico pasó por un cuello de botella seguido de una expansión rápida, donde el crecimiento promueve la retención de mutaciones nuevas (Grant y Bowen, 1998). De acuerdo con estos resultados, ya que las poblaciones de *A. militaris* de la vertiente del Pacífico presentan alta diversidad haplotípica, se rechaza la hipótesis planteada en este estudio.

De acuerdo con los resultados de Rivera-Ortíz *et al.* (2016), el análisis de diversidad genética de *A. militaris* a través de microsatélites, mostró un valor moderado de heterocigosidad ($H_o = 0.5885$) para la población total analizada. Debido a los coeficientes de endogamia encontrados ($F_{is} = 0.03, 0.15$ y 0.11), los autores proponen un cuello de botella en las poblaciones de Sonora, Sinaloa y Nayarit. Sin embargo, ellos mismos señalan que el tamaño de las poblaciones analizadas afecta a los resultados, por lo cual no pudieron concluir la existencia de un cuello de botella en poblaciones de *A. militaris*.

Por otro lado, el análisis de la diversidad genética a través de microsatélites de la guacamaya lapa verde (*Ara ambiguus*) distribuida en el caribe de Costa Rica, sugieren que la especie paso por un cuello de botella ($H_o = 0.548$), sin embargo, similar a lo encontrado para *A. militaris* no se encontraron evidencias de endogamia ($F_{is} = 0.058$) (Ramírez-Molina, 2018).

Los resultados obtenidos para *A. militaris* fueron similares a los encontrados en el periquito frente naranja (*Eupsitula canicularis*), el psitácido que sufre el mayor saqueo en México (Padilla-Jacobo *et al.*, 2018). Para *E. canicularis*, los análisis a través de Cytb muestran que la diversidad haplotípica es alta (Hd = 0.878) mientras que la diversidad nucleotídica es baja (pi = 0.00206), sugiriendo un cuello de botella seguido de una expansión rápida, donde el crecimiento promueve la retención de mutaciones nuevas (Grant y Bowen, 1998; Padilla-Jacobo *et al.*, 2016). Lo anterior sugiere que estas dos

especies de psitácidos comparten historias evolutivas similares en su distribución de la vertiente del Pacífico.

Relaciones genealógicas

Como resultado del análisis de la red de haplotipos a través de Cytb, destaca el haplotipo H2 compartido entre individuos de Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa, que se encuentra relacionado con los haplotipos de Bolivia (Fig. 5), y en la topología de los árboles genealógicos es basal, sugiriendo que es ancestral al resto de los haplotipos detectados en México. En la red, H2 es dominante dentro del haplogrupo (HGI) con tres haplotipos periféricos, H7, H12, H8, cada uno exclusivo de Oaxaca, Michoacán y Nayarit, respectivamente, son un grupo genético que se observan como una politomía suave en los árboles genealógicos (Figs. 6 y 7). A partir de H2 se deriva el haplotipo H11, dominante dentro de un segundo haplogrupo (HGII) (Fig. 5), que corresponde al grupo genético del clado C2 en los árboles genealógicos (Figs. 6 y 7), exclusivo de Sinaloa y Sonora. Por otro lado, los haplotipos H5 y H4 derivados de H2, y que corresponden al clado C1 en los árboles genealógicos (Figs. 6 y 7), se localizan exclusivamente en Querétaro y Tamaulipas. Destaca que el haplotipo H5 es compartido por individuos de Querétaro y Tamaulipas, es decir, que esta línea materna está distribuida en estos dos estados.

En cuanto a los otros marcadores analizados, a pesar de que en la red de haplotipos con ND2 solo se incluyeron individuos de Michoacán, Querétaro, Sinaloa, Chihuahua y Bolivia, similar a lo observado con Cytb, se detectó la presencia de haplotipos compartidos por individuos de Michoacán y Sinaloa (H7 y H9), un haplotipo compartido por Sinaloa y Chihuahua (H4), un haplotipo exclusivo de Michoacán (H8), uno exclusivo para Querétaro (H2) y tres exclusivos de Sinaloa (H3, H5 y H6) (Fig. 7).

La topología de los árboles (Figs. 9 y 10) corroboró la presencia de un clado (C2) con haplotipos que se distribuyen entre Querétaro, Michoacán, Sinaloa y Chihuahua, y otro clado (C1) con haplotipos exclusivos de Sinaloa, sugiriendo de nuevo la presencia de un grupo genético en el norte de la vertiente del Pacífico, otro grupo entre el centro y sur de la vertiente del Pacífico mexicano y otro grupo genético en la Sierra Oriental. Sin embargo, ya que en los árboles no se resolvió la posición del haplotipo de Bolivia como

basal en congruencia con el origen neotropical de la especie, esto refleja una falta de datos para obtener una mejor resolución.

Respecto a los resultados con el marcador RC, la red de haplotipos mostró dos haplotipos exclusivos de Sinaloa (H3 y H4) y uno exclusivo de Michoacán (H5) (Fig. 11). También, la relación del haplotipo de NCBI (con origen desconocido) como derivado del haplotipo H4 exclusivo de Sinaloa, sugiere su distribución en esta región. Adicionalmente, en congruencia con el origen neotropical de la especie, en los árboles genealógicos el haplotipo de Bolivia es basal para resto de los haplotipos. En contraste, en el árbol ML el haplotipo H5 de Michoacán es ancestral a los haplotipos de Sinaloa (Fig. 13), mientras que en el árbol de IB todos los haplotipos de México se agruparon en un clado (C1) con una politomía suave (Fig. 12), sugiriendo falta de datos para una mejor resolución. A pesar de no contar con los marcadores de individuos distribuidos en diferentes regiones como en el caso de Cytb y de la inclusión únicamente de una secuencia para Michoacán, similar a Cytb y ND2, se pudo observar haplotipos exclusivos para Sinaloa y Michoacán, corroborando la presencia de un grupo genético exclusivo en el norte de la vertiente del Pacífico (Fig. 14).

Estos resultados contrastan con lo reportado por Rodríguez-González (2018), quien describe la presencia de un solo grupo genético en Sinaloa. Sin embargo, el estudio solo incluyó secuencias de Cytb de individuos de Sinaloa, de manera que no se identificó al haplotipo compartido con individuos de otras localidades de la distribución en la vertiente del Pacífico. En general, los resultados sugieren la presencia de cuatro grupos genéticos en la población analizada. Para México se pudieron identificar dos grupos en la vertiente del Pacífico y otro grupo en la vertiente del Golfo, y para Sudamérica, un grupo en Bolivia, al menos hasta que se reúnan más datos para su distribución al Sur del continente (Fig. 14). En el estudio de Rivera-Ortiz *et al.* (2017) a través de análisis con microsatélites se proponen dos grupos genéticos, uno en la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre del Sur, y otro grupo en la Sierra Madre Oriental. Existen reportes en algunas especies de aves en donde se mencionan patrones similares, es decir, los datos mitocondriales y nucleares no necesariamente reflejan la misma historia. Los autores de esos análisis lo atribuyen a fenómenos como el flujo de genes mediado por los machos. Es decir, se propone que las hembras son altamente filopátricas (otorgando estructura para el

ADNmt), en contraste con los machos que regulan el flujo de genes (lo cual se observaría como un grupo sin estructura) (*Phylloscopus collybita*, Helbig *et al.*, 2001; *Somateria mollissima*, Tiedemann *et al.*, 2004; *Amazona auropalliata*, Wright *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que a nivel de región las guacamayas operan como un gran conjunto de metapoblaciones (Hanski *et al.*, 1996). En cada región hay pocas poblaciones con alta abundancia y muchas poblaciones satélite pequeñas cercanas (≤ 40) que probablemente están en contacto para el intercambio de pareja. Esta estructura geográfica de la población hace que un sistema complejo sea viable, siempre que las “poblaciones de origen” no disminuyan (Monterrubio-Rico *et al.*, 2021). En términos de genética de poblaciones, en *A. militaris* el flujo genético dentro del grupo de la vertiente del Pacífico detectado a través de microsatélites por Rivera-Ortíz *et al.* (2016), sugiere el movimiento de los individuos para el intercambio de pareja. Mientras que, en la misma población de la vertiente del Pacífico, la presencia de los dos grupos genéticos detectados en este estudio a través de marcadores mitocondriales, que son de herencia materna, sugiere el retorno de los individuos (hembras filopátricas) a las “poblaciones origen”.



Figura 14. Mapa que muestra la relación entre haplotipos utilizando el marcador Cytb y ubicados en el espacio geográfico. Los círculos en color azul rey representan el haplogrupo II de la red de haplotipos, mientras que, los círculos en color amarillo representan el haplotipo H2, los colores morado, rosa, azul y rojo corresponden a haplotipos únicos para cada región. Los círculos en verde y azul claro representan el grupo genético de la vertiente del golfo.

Otra posibilidad para explicar las diferencias entre los resultados con microsatélites y con ADNmt, es atribuirlo a una reciente especiación (como lo reportado para *Larus sp.*, Liebers *et al.*, 2001). En este ejemplo, debido a que ambos marcadores tienen diferentes tiempos de coalescencia, no se espera recuperar exactamente la misma división de los linajes, en estos casos, uno de los dos marcadores no resulta suficiente para detectar las mismas divisiones propuestas (Zink & Barrowclough, 2008). Adicionalmente, para tratar de resolver estas inconsistencias, se ha propuesto incrementar el número de loci utilizados en los análisis del ADNnu (Zink & Barrowclough, 2008), asumiendo que los datos de los microsatélites son poco informativos para este análisis en particular.

Por otro lado, en algunas especies de psitácidos americanos, se han realizado propuestas de conservación de diferentes poblaciones basadas en el reconocimiento de la formación de clados monofiléticos. Por ejemplo, dentro de las especies: *Amazona leucocephala* (Rusello *et al.*, 2010), y *Amazona farinosa* (Wenner *et al.*, 2012), se han observado grupos monofiléticos que fueron designados como ESUs. Cabe recordar que la intención de designar ESUs es otorgar el reconocimiento a la historia evolutiva de los grupos monofiléticos y conservarlos (Moritz, 1994). Dado que en este estudio se identificaron tres grupos genéticos en nuestro país, se propone que estos sean considerados como unidades de conservación por separado, ya que forman grupos monofiléticos, indicando que estos clados históricamente han estado bajo procesos evolutivos únicos y que actualmente representan poblaciones en divergencia.

Propuestas de conservación

Se debe destacar la necesidad de este tipo de trabajos en especies bajo alguna categoría de riesgo. Para *A. militaris*, el análisis de diversidad y relaciones genealógicas de la especie a lo largo de su distribución en México permitió definir la existencia de tres Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), una exclusiva en el norte del Pacífico, otra desde el sur hasta el norte de la vertiente del Pacífico y la tercera en la Sierra Madre Oriental. Estas poblaciones tienen cierta independencia evolutiva y pueden ser usadas para el aumento de la diversidad genética y contribuir en la conservación de la especie. En particular, se ha reportado que las poblaciones del Pacífico Norte se encuentran en una situación más crítica, ya que, a pesar de presentar la mayor abundancia respecto al

resto de la distribución de la especie, solo el 3.2% de las guacamayas están protegidas. Nuestros resultados y los reportados por Monterrubio-Rico *et al.* (2021) indican que se requiere el establecimiento de nuevas áreas de protección para las regiones del Pacífico central y norte donde se encuentran las ESUs con una diversidad genética, cuya conservación es clave para la viabilidad de la especie, además de su posible uso en la planeación de estrategias de reproducción en cautiverio, liberaciones para reintroducción y enriquecimiento genético de poblaciones.

CONCLUSIONES

Los individuos de *A. militaris* analizados mostraron una diversidad haplotípica alta para los tres marcadores considerados en el presente estudio.

Con el marcador Cytb se detectó una diversidad nucleotídica baja, y valores de D_T negativos, lo cual sugiere que la población pasó por un cuello de botella seguido de una expansión rápida.

Sin embargo, con los marcadores ND2 y RC, se observó una diversidad nucleotídica moderada, sugiriendo una población grande y estable con historia evolutiva antigua, aunque en este caso, los datos de D_T , no apoyan contundentemente la estabilidad poblacional por lo cual los resultados deberán ser corroborados en posteriores análisis.

Para los individuos de la vertiente del Pacífico se detectó una diversidad haplotípica alta, y una diversidad nucleotídica baja con los tres marcadores analizados, lo que sugiere que la población de la vertiente del Pacífico pasó por un cuello de botella seguido de una expansión rápida.

En general, se detectaron cuatro grupos genéticos para *A. militaris*. En México se encontraron dos grupos en la vertiente del Pacífico y uno en la vertiente del Golfo, y en Bolivia se identificó un cuarto grupo genético.

Se propone que los tres grupos genéticos de México se consideren tres ESUs, cuyas características deben ser consideradas en la planeación de estrategias de protección, reproducción en cautiverio, liberaciones para reintroducción y enriquecimiento genético de poblaciones en riesgo.

LITERATURA CITADA

- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography*. Boston, MA: Harvard University Press. Pp.464.
- American Ornithologists' Union (AOU). (1998). *Check-list birds of North American birds* (7th ed.). Lawrence, Kansas: AOU Press. 829 pp.
- Aranguen-Méndez J. A. y Jordana J. (2001). Utilización de Marcadores de ADN (Microsatélites) en Poblaciones de Animales Domésticos en Peligro de Extinción. Universidad Autónoma de Venezuela.
- Bejarano, E. E. (2001): Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Birdlife International. (2013). *BirdLife's online world bird data- base: The site for bird conservation*. Cambridge, England: BirdLife International.
- BirdLife International. (2016). *Ara militaris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22685548A93079238>.
- BirdLife International. (2018). Hoja informativa de la especie: *Ara militaris*. <http://www.birdlife.org> el 03/09/2018.
- Cantú, J. C., Sánchez, M. A., Grosselet, M. y Silva, J. (2007). Tráfico ilegal de pericos en México: una evaluación detallada. México, D. F., Defenders of Wildlife y Teyeliz. pp. 75.
- Caparroz, R. C., Miyaki, Y., y Baker, A. J. (2003). Characterization of microsatellite loci in Blueand-Gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes*, 3, 441–443.
- Cites. (1998). Apendices I, II and III to the Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. U.S. Fish y Wildlife Service. Departament of the Interior. U.S.A. 22 pp.
- Collar, N. J., Gonzaga, L. P., Krabbe, N., Madroño Nieto, A., Naranjo, L. G., Parker III, T. A., y Wege, D. C. (1992). *Threatened birds of the Americas*. The ICBP/IUCN Red Data Book. Third ed., part 2. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 1,150.

- Collar, N.J. (1997). Family Psittacidae (Parrots). In: Del Hoyo, J., Elliot, A.E., y Sargatal, J., (Eds). Handbook of the Birds of the World, Spain Lynx Edici3ns, Barcelona. (Vol. 4, pp. 280–477).
- Collar, N., Boesman, P., y Sharpe, C.J., (2017). Military Macaw (*Ara militaris*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D. A., y de Juana, E., (eds). Handbook of the birds of the world alive. Barcelona. Lynx Edicions. <https://www.hbw.com/node/54618> Consultado: 12 de diciembre de 2017.
- Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 34, 487–515.
- Fogell, D. J., Martin, R. O., Groombridge, J. J. (2016). Beak and feather disease virus in wild and captive parrots: an analysis of geographic and taxonomic distribution and methodological trends. doi: 10.1007/s00705-016-2871-2.
- Forshaw, J. M. (1989). *Parrots of the World*. Lansdowne Editions. Melbourne, Australia.
- García-Feria, L. M. (2009). Un enfoque filogeogr3fico para la conservaci3n de poblaciones de *Ara macao cyanoptera* [A phylogeographic approach for the conservation of the populations of *Ara macao cyanoptera*] (Doctoral Thesis). Instituto de Ecolog3a, A. C, Xalapa, M3xico.
- Grant, W. S. y Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89:415-426.
- Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 263, 1249D1254.
- Griffiths, R., Double M. C., Orr K., Dawson, J. G. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular ecology* 7, 1071-1075.
- Godoy, J. (2009). La Gen3tica, los Marcadores Moleculares y la Conservaci3n de Especies. *Ecosistemas*, 18:23-33.
- Hackett, J. S. (1996). Molecular Phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (aves). *Molecular phylogenetics and evolution*, 5 (2): 368-382.
- Hanski, I., Moilanen, A. y Gyllenberg, M. (1996). Minimum viable metapopulation size. *Am. Nat.* 147: 527-541.

- Hedrick, P. W. (2011). *Genetics of populations*. Jones y Bartlett Learning, Sudbury, Massachusetts, USA. 553 pp.
- Helbig, A. J., Salomon, M., Bensch, S., Seibold, I. (2001). Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. *Journal of Evolutionary Biology*. 14: 277–287.
- Howell, N. G. & Webb, S. (1995). *A guide to the birds of Mexico and northern central America*. Oxford university press. New York, USA. 851 pp.
- Ibañez, L. M., Girini, J. M., Palacio, F. X. & Montalti, D. (2014). Nidificación y alimentación de psitácidos introducidos en el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. División Zoología Vertebrados, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
- Iñigo-Elías, E. (1999). La Guacamaya verde y escarlata en México. *Biodiversitas*, (5) 25 pp.
- Juniper, T. & Parr, M. (1998). *Parrots. A guide to parrots of the world*. London, UK.: Yale University Press.
- Liebers, D., Helbig, A. J., de Knijff, P. (2001) Genetic differentiation and phylogeography of gulls in the *Larus cachinnans–fuscus* group (Aves: Charadriiformes). *Molecular Ecology*. 10: 2447–2462.
- Loo, J. (2011). *Principios Aplicados de Genética para la Conservación de la Diversidad Biológica. Manual de Genética de la conservación*. ISBN: 978-607-715-007-7. Primera Edición
- 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.
- Monterrubio-Rico, T. C., Renton K., y Carreón, G., (2005). Ficha técnica de *Ara militaris*. En: Escalante, P. (compilador). "Fichas sobre las especies de Aves incluidas en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-ECOL-2000. Parte 2". Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-Conabio. Proyecto W042. México. D.F.

- Monterrubio-Rico, T. C., Villaseñor-Gómez, L. E., Marín-Togo, M. C., López-Córdova, E. A., Fabian-Turja, B. y Sorani-Dalbón, V. (2007). Distribución histórica y actual del loro cabeza amarilla (*Amazona oratrix*) en la costa central del pacífico mexicano, ventajas y limitaciones en el uso de GARP en especies bajo fuerte presión de tráfico. *Ornitología Neotropical*, 18, 263–276.
- Monterrubio-Rico, T. C., de Labra-Hernández, M. C., Ortega-Rodríguez, J. M., Cancino-Murillo, R. y Villaseñor-Gómez, F. (2011). Distribución actual y potencial de la guacamaya verde en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1311–1319.
- Monterrubio-Rico, T. C., Charre-Medellín, J. F., Rubio-Rocha, Y., Bonilla-Ruz, C., Cinta-Magallón, C., Cancino-Murillo, R., Sahagún-Sánchez F. J., Duran-Fernández, A., Lowry, J. S. y Corrales-Saucedo, J. M. (2021). Assessing spatial dispersion, abundance, and conservation perspectives of Military Macaw *Ara militaris* populations in Mexico. *Bird Conservation International*, 1-19.
- Moritz, C. (1994). Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 9:373-375.
- Navarro-Sigüenza, A. G., Rebón-Gallardo, M. F., Gordillo-Martínez, A., Peterson, A. T., Berlanga-García, H., y Luis A. Sánchez-González, L. A. (2014). Biodiversidad de aves en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Volumen 85. Páginas 476-495.
- Padilla-jacobo, G., Monterrubio-Rico, T. C., Cano-Camacho, H., Zavala-Páramo, M. G. (2018). Demographic history of the orange-fronted parakeet (*Eupsittula Canicularis*) in México. *Ornitología neotropical*, 29:323-336.
- Phillimore, A. B., y Owens, I. P. F. (2006). Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proc. R. Soc. B*. 372, 1049-1053.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casa, A., Sortibrán, A. C., Castillo, A., Cerritos. R., Chassin-Noria, O., Colunga-GaríaMarín, P., Delgado, P., Díaz-Jaimes, P., Eguiarte, L. E., Escalante, A. E. y B. Espinoza. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital*

- natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. pp 437-494. doi: 10.13140/RG.2.1.4778.4485.
- Presti, F. T., Oliveira-Marques, A. R., Caparroz, R., Biondo, C., y Miyaki, C. Y. (2011). Comparative analysis of microsatellite variability in five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): Application for conservation. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 348–352.
- Rivera-Ortiz, F. A., Solórzano, S., Arizmendi, M., Dávila-Aranda, P., y Oyama, K. (2017). Genetic Diversity and Structure of the Military Macaw (*Ara militaris*) in Mexico: Implications for Conservation. *Tropical Conservation Science*, Volume 10: 1–12.
- Rodríguez-González, A. (2018). Análisis de la diversidad genética de individuos de *Ara militaris* en el estado de Sinaloa México. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán de Ocampo.
- Roldán-Clará, B., Toledo, V. M., y Espejel, I. (2017). The use of birds as pets in Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 13:35. DOI: 10.1186/s13002-017-0161-z
- Russello, M. A., Stahala, C., Lalonde, D., Schmidt, K. L., y Amato, G. (2010). Cryptic diversity and conservation units in the Bahama parrot. *Conserv Genet*. 11:1809-1821.
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-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. México, D. F.: Diario Oficial de la Federación., 30 de diciembre de 2010.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22(22). 4673-4680.
- Tiedemann, R., Paulus, K. B., Scheer M., Von Kistowski, K. G., Skírnisson, K., Bloch, D., y Dam, M. (2004) Mitochondrial DNA and microsatellite variation in the eider duck (*Somateria mollissima*) indicate stepwise postglacial colonization of Europe and limited current long-distance dispersal. *Molecular Ecology*. 13: 1481–1494.

- Urantowka A. D. (2015). Complete mitochondrial genome of Military Macaw (*Ara militaris*): its comparison with mitogenomes of two other *Ara* species, Mitochondrial DNA. The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis. ISSN: 1940-1736.
- Urantowka, A. D. (2013). Department of Genetics, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 7 Kozuchowska Street, Wrocław, 51-631, Poland. Species.
- Wenner, T. J., Russello, M. A., y Wright. T. F. (2012). Cryptic species in a Neotropical parrot: genetic variation within the *Amazona farinosa* species complex and its conservation implications. *Conserv Genet.* 13:1427–1432.
- Wright, T. F., Rodriguez, A. M., y Fleischer, R. C. (2005) Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. *Molecular Ecology.* 13: 1197–1205.
- Zink, R. M. (2004). The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *The Condor.* 102:881-886.
- Zink, R. M., y Barrowclough, G. F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol.* 17: 2107–2121.