



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**Centro Multidisciplinario de estudios en
biotecnología**



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“Análisis de la monofilia de *Aratinga canicularis*, *Amazona albifrons* y
Amazona finschi e importancia para la conservación”**

Tesis que presenta:

BIOL. GABRIELA PADILLA JACOBO

Para obtener el grado de maestra en ciencias biológicas

ASESORA:

DRA. MARÍA GUADALUPE ZAVALA PÁRAMO

Co-ASESOR:

DR. TIBERIO MONTERRUBIO RICO

Morelia Michoacán, México, Abril de 2013.



ÍNDICE.

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. ANTECEDENTES	8
3.1. <i>Aratinga canicularis</i>	8
3.2. <i>Amazona albifrons</i>	10
3.3. <i>Amazona finschi</i>	12
3.4. Marcadores, filogenia y conservación	14
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	20
6. OBJETIVOS	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Muestras biológicas.	22
7.2. Extracción de ADN de muestras de pluma y sangre	24
7.3. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
7.4. Secuenciación	28
7.5. Análisis de las secuencias	29
7.6. Construcción de árboles filogenéticos	29
7.7. Grupos externos	30
7.8. Red de haplotipos.	31

8. RESULTADOS	32
8.1. Extracción de ADN	32
8.2. Amplificaciones y secuenciación	32
8.3. Secuenciación, edición y alineamiento.	34
8.4. Análisis de haplotipos	35
8.5. Construcción de árboles filogenéticos	40
8.6. Árboles filogenéticos y red de haplotipos de <i>A. canicularis</i>	41
8.7. Árboles filogenéticos y red de haplotipos de <i>A. albifrons</i>	45
8.8. Árboles filogenéticos y red de haplotipos de <i>A. finschi</i>	49
9. DISCUSIÓN	53
9.1. <i>Aratinga canicularis</i>	53
9.2. <i>Amazona albifrons</i>	54
9.3. <i>Amazona finschi</i>	55
10. CONCLUSIONES	58
11. LITERATURA CITADA.	60

1. RESUMEN

El concepto actual de subespecie reconoce las diferencias fenotípicas que existen entre las poblaciones naturales y otorga un peso a su distribución geográfica, en base a ello se han propuesto la mayoría de las subespecies en aves, muchas de estas determinaciones son controversiales por lo que se deben realizar revisiones taxonómicas subespecíficas caso por caso donde la inclusión de caracteres moleculares son indispensables. Los primeros análisis de este tipo deben dirigirse a especies bajo alguna categoría de riesgo o en peligro de extinción, ya que en biología de la conservación el concepto de subespecie se ha aplicado con éxito para definir poblaciones prioritarias. En Michoacán habitan tres especies de psitácidos que ocupan los primeros lugares de explotación a nivel nacional con fines de tráfico ilegal, tales son *Aratinga canicularis*, *Amazona albifrons* y *Amazona finschi*, en el presente trabajo se evaluó la monofilia recíproca de cada subespecie basada en caracteres del ADN mitocondrial con ejemplares colectados en campo con la finalidad de encontrar y proponer Unidades Evolutivamente Significativas (ESU) que auxilien en las propuestas de conservación para diferentes poblaciones.

Con secuencias mitocondriales (Citocromo Oxidasa I, NADH Deshidrogenasa 2 y Región Control) y software especializado se contruyeron árboles filogenéticos y redes de haplotipos para cada especie. En la especie *Aratinga canicularis* se observaron tres grupos que corresponden a las subespecies descritas en base a caracteres morfológicos y a su distribución, en base a ello se propone que las tres sean manejadas como ESU's por separado para fines de conservación.

En *Amazona albifrons* se forman dos clados, uno monofilético que corresponde a la subespecie *A. a. nana* y otro parafilético con individuos de la subespecie *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis*, lo que puede ser atribuido a una transición hacia la monofilia, en el área de la conservación con base en estos resultados se propone la subespecie *A. a. nana* como una ESU independiente, mientras que para las subespecies *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis* se deberán iniciar análisis de poblaciones para determinar Unidades de Manejo (MU's).

En *Amazona finschi* se presenta una diversidad genética baja o nula con los marcadores Citocromo Oxidasa I y NADH Deshidrogenasa 2 en los individuos de las dos regiones analizadas, los árboles filogenéticos muestran parafilia en individuos de Michoacán y Sinaloa que puede ser debida un proceso de transición entre la polifilia y monofilia recíproca. Aunque en la red de haplotipos se observa la formación de un grupo integrado por secuencias de individuos Michoacanos y otro donde se incluyen las muestras de Sinaloa en dos ramas divergentes. Tomando en cuenta el riesgo de extinción que enfrentan las poblaciones de *A. finschi* y los resultados obtenidos se propone una ESU en Michoacán y la evaluación posterior como MU's en Sinaloa.

2. INTRODUCCIÓN

Una vez reconocida la variación fenotípica de las poblaciones naturales, los taxónomos sistemáticos se han enfrentado a la tarea ardua de la caracterización de la variación infraespecífica, en el siglo XIX una subespecie era considerada una entidad bien definida y constante de rango inferior a la especie, con base en esto, cualquier población natural considerada no suficientemente distinta para ser catalogada como especie era determinada como una subespecie. El concepto dominante de subespecie en el siglo XX es el de Mayr y Ashlock (1991), quienes la definen como “*un grupo de poblaciones fenotípicamente similares pertenecientes a una especie habitando en una subdivisión geográfica del área de distribución de la especie, y que difiere taxonómicamente de otras poblaciones de la misma especie*”. En las últimas décadas el concepto ha estado involucrado en polémicas por varias razones, algunas de las principales giran alrededor de que no refleja la complejidad de los patrones de variación de las poblaciones naturales y que actualmente no existe un acuerdo en la metodología para designar una nueva especie.

A pesar de ello, algunos defensores del concepto argumentan que no se le debe abandonar, por el contrario proponen redefinirlo y evaluar las subespecies ya nombradas con estándares más rigurosos para confirmar o modificar su estatus. La vía para hacerlo es ampliando las colectas e incluyendo otras herramientas de determinación taxonómica, solo entonces y si el concepto es aplicado correctamente, este puede obtener información importante que contribuya al entendimiento y a la discusión de la variación infraespecífica en áreas como la morfología, la distribución, la etología, conservación, etc. (Wiens, 1982).

Los análisis de la variación en la secuencia de ADN mitocondrial (ADNmt) son de relativa nueva inclusión al problema de la determinación taxonómica subespecífica. Estos revelan datos difíciles de ver con otras técnicas, por ejemplo, permiten determinar si una subespecie está evolucionando independientemente, si intercambian individuos o

si hay un estado intermedio de aislamiento. Con el desarrollo y la aplicación de estas herramientas se ha propuesto que una subespecie puede ser definida bajo el concepto de monofilia recíproca, una idea que toma como herramienta principal a los árboles de genes contruidos con secuencias de ADNmt y que ha demostrado su utilidad en la evaluación de monofilia a nivel subespecífico (Avice, 2000).

En el área de la biología de la conservación el nivel taxonómico de subespecie se ha aplicado con éxito ya que ha permitido 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).

Las aves son el grupo taxonómico mejor estudiado, muchas de sus especies están subdivididas en múltiples subespecies y en promedio existen dos subespecies reconocidas por cada especie de ave. El revisar su estatus con técnicas moleculares representa una tarea difícil que requerirá una inversión de recursos humanos y económicos altos, y para acercarnos a esa meta es necesario fragmentar la labor y se debe comenzar por especies catalogadas bajo algún grado de amenaza o vulnerabilidad.

El grupo de los psitácidos donde se incluyen loros, pericos, guacamayas y afines comprenden unos 84 géneros con 332 especies, por su variedad persisten controversias sin resolver en diferentes niveles taxonómicos. En Michoacán, habitan tres especies que llaman la atención por su condición de vulnerable o en peligro de extinción, *Aratinga canicularis*, *Amazona albifrons* y *Amazona finschi*, de las cuales con base en los caracteres morfológicos y la distribución de sus poblaciones a nivel infraespecífico se han identificado variantes propuestas como subespecies: *A. canicularis* tiene tres subespecies reconocidas, *A. c. canicularis*, *A. c. eburnirostrum* y

A. c. clarae, en la especie *A. albifrons* también se han identificado tres, *A. a. albifrons*, *A. a. nana* y *A. a. saltuensis*, y finalmente en *A. finschi* se han determinado dos subespecies *A. f. finschi* y *A. f. woodi* (Forshaw, 1989). Las últimas revisiones taxonómicas para estas subespecies datan de 1937 cuando Moore propone a *A. c. clarae* y *A. f. woodi* como subespecies (Moore, 1937a; Moore, 1937b). Al reevaluar estas subespecies bajo el concepto de monofilia recíproca se espera que exista una congruencia entre los caracteres morfológicos y los moleculares, con lo que además de realizar un primer acercamiento a su taxonomía molecular se pueden identificar poblaciones con prioridad para su conservación bajo la consideración de unidades evolutivamente significativas (ESU).

3. ANTECEDENTES

Hasta la aparición de las técnicas moleculares, la identificación y determinación de las subespecies estaba basada en caracteres morfológicos y en la distribución geográfica de las poblaciones naturales, algunos taxónomos también incluyen el comportamiento, principalmente el reproductivo, y basándose en estos los sistemáticos determinaron las subdivisiones de las tres especies que nos ocupan:

3.1. *Aratinga canicularis* (Linnaeus, 1758).

Es una especie distribuida desde el sur de de Sonora (México) hasta el noreste de Costa Rica (Howell and Webb, 1995). Es una especie no migratoria, la distribución actual en México de *A. canicularis* abarca desde el sur de Sonora hasta Chiapas por la vertiente del Pacífico (Marín-Togo *et al.*, 2012) (Fig. 1).

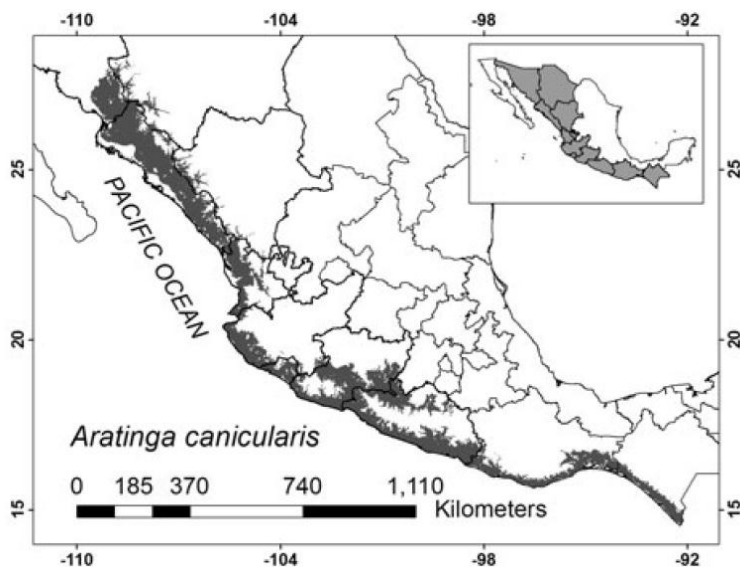


Figura 1. Área de distribución actual de *A. canicularis* en México (Tomado de Marín-Togo *et al.*, 2012). En gris oscuro se muestra la presencia de la especie en diferentes estados de la república.

Aunque es la especie de mayor explotación en nuestro país, a nivel internacional es de preocupación menor (IUCN, 2011) y en la NOM-059 está catalogada como protección especial (Cantú, 2007), posiblemente debido a que su población no se ha visto gravemente mermada ya que tiene un éxito reproductivo alto y es capaz de anidar en termiteros ubicados en áreas modificadas (Sánchez-Martínez and Renton 2009). Sus características sobresalientes son, longitud y masa promedio de 24 cm y 74 g, plumaje verde, una banda de plumas color naranja en la frente y en la corona, y las plumas de la nuca son de color azul-mate. Las subespecies en las que se divide tienen las siguientes características (de a cuerdo a la clasificación de Forshaw, 1989):

1. *A. c. canicularis* (Linnaeus, 1758). Los machos tienen una longitud de ala de 130 a 142 mm, la cola va desde 95 hasta 112 mm, la longitud del pico tomado como culmen expuesto de 17 a 19 mm y el tarso de 13 hasta 15 mm; las hembras tienen una longitud del ala de 129 a 139 mm, la cola de 97 a 103 mm, culmen expuesto de 17 a 19 mm y el tarso mide de 13 a 15 mm. Esta subespecie en nuestro país solo se encuentra en el estado de Chiapas, y desde ahí se distribuye hasta Costa Rica.
2. *A. c. eburnirostrum* (Lesson 1842). Son iguales a *A. c. canicularis*, pero con la banda frontal naranja reducida, el torso inferior verde brillante, menos amarillento y una mancha café a cada lado de la base de la mandíbula inferior. Los machos tienen una longitud del ala de 130 a 140 mm, la cola va desde los 95 a los 106 mm, culmen expuesto de 18 a 20 mm y el tarso mide desde 14 hasta 15 mm; en las hembras el ala mide de 126 a 139 mm, la cola va de 95 a 112 mm, el culmen expuesto de 17 a 19 mm, y el tarso mide de 13 a 15 mm. Habita exclusivamente en Michoacán, Guerrero y Oaxaca.
3. *A. c. clarae* (Moore 1937). Similares a *A. c. eburnirostrum*, solo que la mancha frontal está muy restringida y el azul de la corona se extiende en la frente desde los ojos hasta el lores, la garganta y el pecho son verdosos, menos amarillentos,

las manchas de la mandíbula inferior son de color café oscuro o casi negro. En los machos el ala mide de entre 130 hasta 141 mm, la cola de 102 a 114 mm, culmen expuesto de 18 a 20 mm, y el tarso de 13 a 15 mm; en las hembras el ala mide de 130 a 142 mm, la cola de 100 a 118 mm, el culmen expuesto de 17 a 19 mm y el tarso de 13 a 16 mm. Esta subespecie se encuentra desde el Sur de Sinaloa hasta Michoacán.

3.2. *Amazona albifrons* (Sparman, 1788).

Es un loro que habita la costa del Pacífico desde el Sur de Sonora en México hasta Costa Rica, por el lado del golfo de México se encuentra en el sur de Veracruz, en Tabasco y en la península de Yucatán (Howell and Webb, 1995). En el Pacífico mexicano existe una discontinuidad de su distribución, no se encuentra en los estados de Jalisco y Colima, y recientemente se registró en la cuenca del Bajo Balsas y la costa de Michoacán donde no existían reportes de su presencia, actualmente la especie ha reducido su distribución en Nayarit y Sur de Sinaloa (Marín-Togo *et al.*, 2012) (Fig. 2).

Es una especie residente no migrante con mediana dependencia al hábitat, en la NOM-059, está bajo protección especial y ocupa el segundo sitio de explotación a nivel nacional (Cantú *et al.*, 2007). Algunas de sus características distintivas son, longitud de 26 cm, masa de 191 g, color verde, las plumas de la cabeza, garganta, pecho y el borde del dorso son oscuras, frente y corona blanco, algunas veces con tonos en amarillo, el lores y la región perioftálmica en rojo, la corona y la nuca azul, el álula en rojo, la plumas primarias verdes hacia la base y cada vez más azules hacia las puntas, las secundarias en azul, las plumas de la cola verde con puntas verde amarillento.

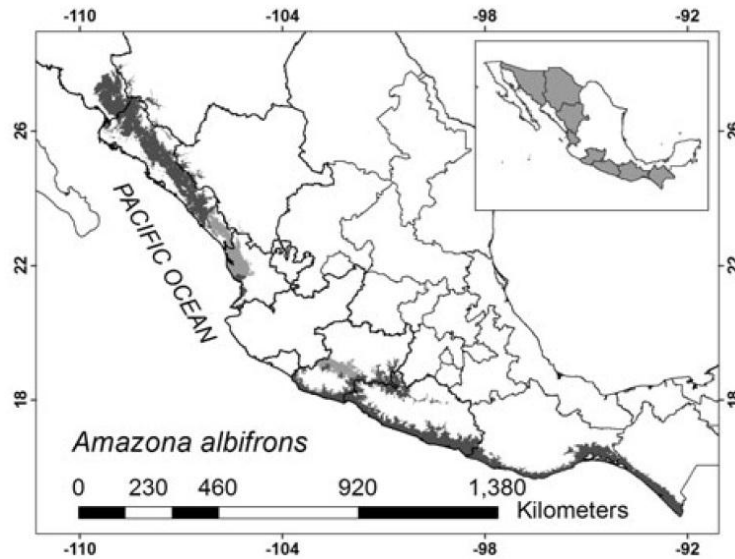


Figura. 2. Área de distribución actual de *Amazona albifrons* (Tomado de Marín-Togo *et al.*, 2012). En gris oscuro muestran la presencia y en gris claro las áreas de ausencia de la especie).

Las subespecies en las que se divide según la clasificación de Forshaw (1989) tienen las siguientes características:

1. *A. a. albifrons* (Sparman 1788). Esta subespecie habita en México desde Michoacán, centro y occidente del país hasta Chiapas. Las medidas de los machos son las siguientes: ala de 178 a 190 mm, cola de 82 a 101 mm, culmen expuesto de 25 a 28 mm y el tarso de 19 a 22 mm; y las medidas de las hembras son ala de 170 a 178 mm, la cola de 81 a 95 mm, culmen expuesto de 23 a 25 mm y el tarso mide de 18 a 21 mm.
2. *A. a. saltuensis* (Nelson 1899). Similares a *A. a. albifrons* pero su plumaje en general es más verde particularmente en la espalda, los costados y el cuello, la corona azul se extiende hasta la nuca. Los machos tienen alas que miden desde 175 hasta 190 mm, la cola de 81 a 96 mm, culmen expuesto de 24 a 27 mm y el tarso va desde 19 hasta 22 mm; en las hembras el ala mide de 176 a 185 mm, la cola de 87 a 95 mm, culmen expuesto de 23 a 25 mm y el tarso es de 20 a 21

mm. Su distribución se limita al norte de México en los estados de Sinaloa, occidente de Durango y sur de Sonora.

3. *A. a. nana* (Miller 1905). Similares a *A. a. albifrons* pero de menor tamaño, en los machos el ala mide de 164 a 172 mm, la cola de 73 a 86 mm, culmen expuesto de 25 a 27 mm y el tarso va desde los 19 hasta los 21 mm; en las hembras el ala mide de 155 a 175 mm, la cola de 73 a 91 mm, el culmen expuesto de 23 a 25 mm y el tarso mide de entre 18 hasta los 21 mm. En México está distribuido desde el sur-oriente de Veracruz península de Yucatán y nor-occidente de Chiapas.

3.3. *Amazona finschi* (Sclater, 1864)

Amazona finschi es endémica de México, la distribución histórica la ubicaba a lo largo de la vertiente del Pacífico desde el sur de Sonora y suroeste de Chihuahua hasta Oaxaca (Forshaw 1989, Howell and Webb 1995). Algunos reportes recientes indican que la especie mantiene una distribución continua desde el Sur de Sonora hasta Michoacán y Guerrero, y que ha sido prácticamente extirpada de zonas costeras de baja elevación en Nayarit y Guerrero, aunque en este último estado permanecen en zonas montañosas y en los límites con Michoacán particularmente en la cuenca de Balsas. También ha sido eliminada de casi toda la costa oaxaqueña (Marín-Togo *et al.*, 2012) (Fig. 3), existen reportes que mencionan a los estados de Jalisco, Michoacán y Sinaloa como los que cuentan con una mayor abundancia y área de distribución de la especie (Renton and Iñigo-Elías, 2003). Este loro presenta un bajo éxito de nidación, altas fluctuaciones en productividad reproductiva, con requerimientos específicos de hábitat y realiza grandes movimientos estacionales (Renton 1998, 2001, 2002, Renton and Salinas-Melgoza 1999, Salinas-Melgoza 1999). Por todo lo anterior, se encuentra en la lista roja bajo la categoría de vulnerable (IUCN, 2011), en CITES está en el

apéndice I y en la NOM-059 en peligro de extinción y ocupa el cuarto lugar en explotación ilegal en México (Cantú, 2007).

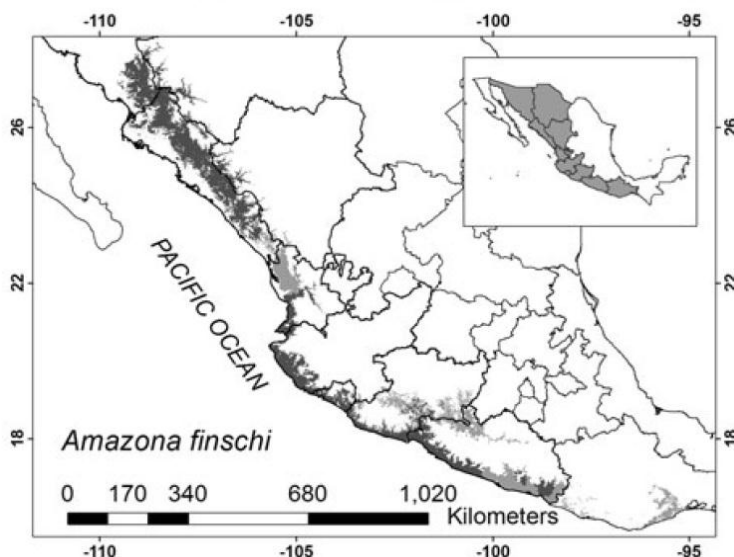


Figura 3. Zonas de distribución geográfica actual de *A. finschi* en México (Tomado de Marín-Togo *et al.*, 2012) Las áreas en gris oscuro indican la presencia de la especie y las áreas en gris claro son de ausencia.

Esta ave tiene un tamaño de unos 33 cm y su masa de 292 g, con plumaje verde brillante, frente marrón o roja, corona, nuca y cuello lila, mejillas y coberteras de los canales auditivos verde amarillento, primarias azul-violeta, especulum en rojo, secundarias verde-azules alrededor de las puntas, cola verde con puntas amarillentas. Las subespecies en las que se divide tienen las siguientes características:

1. *A. f. finschi* (Sclater, 1864). En los machos el ala mide de 191 a 208 mm, la cola de 100 a 120 mm, culmen expuesto de 29 a 30 mm y el tarso de 21 a 23 mm; en las hembras el ala mide de 185 a 202 mm, la cola de 108 a 124 mm, el culmen expuesto desde 27 hasta 30 mm y el tarso de 21 a 23 mm. Habita desde el Sur de Sinaloa y Durango hasta el Sur de Oaxaca (Friedmann *et al.*, 1950).

-
2. *A. f. woodi* (Moore, 1937). Similares a *A. f. finschi*, pero el plumaje verde menos amarillo, el marrón de la corona y frente restringido y pálido. Su talla es ligeramente mayor que la de *A. f. finschi*, los machos tienen una longitud del ala de 198 a 215 mm, la cola va de 109 a 124 mm, culmen expuesto de 29 a 32 mm y el tarso mide de 21 a 24 mm; en las hembras el ala mide de 193 a 208 mm, la cola de 104 a 124 mm, el culmen expuesto de 27 a 31 mm y el tarso de 22 a 23 mm. Sureste de Sonora y Suroeste de Chihuahua, centro-este de Sinaloa.

3.4. Marcadores, Filogenia y conservación.

Actualmente la secuenciación de ADN es la técnica más utilizada en análisis taxonómicos de subespecies ya que permite observar la variación de caracteres presentes en el ADN nuclear y mitocondrial (ADNmt). Para distinguir el rango de subespecie a partir de caracteres moleculares se han hecho varias propuestas, bajo el concepto filogenético de especie se busca formar grupos monofiléticamente recíprocos, que son un grupo de secuencias que comparten una secuencia común ancestral no encontrada en individuos de cualquier otra especie (Avice, 2000). El ADNmt ofrece una prueba molecular sensible del proceso evolutivo intraespecífico, su principal ventaja como marcador es que tiene una tasa de evolución mayor que la del ADN nuclear, por lo que se han encontrado diferencias entre poblaciones que no son posibles de detectar con otros métodos (Ball and Avice, 1992). En las revisiones taxonómicas de psitácidos se han utilizado típicamente marcadores mitocondriales como las secuencias de la región control (RC), NADH Deshidrogenasa 2 y 6 (ND2, ND6), ATP sintasa proteínas 8 y 6 (ATP8, ATP6), Citocromo oxidasa I (COI), Citocromo b (*cytb*), los genes de ARN ribosomal 12S y 16S y algunas secuencias nucleares aunque en menor proporción.

En el campo de la biología de la conservación, las subespecies son de considerable utilidad en el establecimiento de las estrategias de conservación (Avice and Nelson, 1988; Solórzano *et al.*, 2004; Zink, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Zink *et al.*,

2005; Phillimore and Owens, 2006). 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 garantizan que el sistema tenga la capacidad de mantenerse y evolucionar. Un concepto que cumple con este fin, es el de Unidades Evolutivamente Significativas (ESU) propuesto por Moritz (1994), quien propone que una ESU se puede definir 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 la herencia evolutiva sea reconocida y protegida 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).

A pesar de la importancia del concepto en el auxilio de la designación de poblaciones propuestas para conservación, en la actual legislación mexicana no es considerado para establecer áreas naturales protegidas o para designar subespecies bajo alguna categoría de riesgo, la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) tiene 6 categorías de injerencia federal en el establecimiento de un área protegida, de estas solo la categoría de Santuarios considera establecerlos en base a la riqueza de flora y/o fauna o por la presencia de especies o subespecies o hábitats de distribución restringida.

Existen varios trabajos publicados donde ha sido posible identificar una subespecie como ESU en aves, donde el uso de diferentes marcadores moleculares ha permitido determinar diferentes grados de diferenciación entre poblaciones, lo cual es básico en la determinación y propuesta de una ESU. Por otro lado, se ha reafirmado la idea de Ball y Avice (1992), de que las aves exhiben una amplia variedad de historias demográficas y filogenéticas, por lo cual la genética de poblaciones y la significancia

evolutiva de las subespecies debe ser reevaluado caso por caso. En un marco en el que los resultados abarcan diferentes escenarios mencionamos los siguientes ejemplos:

Wu, *et al.* (2012) encontraron en *Garrulax chinensis* (Timaliidae) monofilia en la subespecie isleña *G. c. monachus* y lo proponen como ESU mientras otras 2 subespecies continentales *G. c. chinensis* y *G. c. lochmius* son parafiléticas.

Hackett (1996) realizó un análisis molecular en dos subespecies de *Ramphocelus passerinii* (*R. p. passerinii* y *R. p. costaricensis*) y propone tratarlas como especies separadas con base en el grado de diferenciación genética entre ellas, en la ausencia de evidencia de hibridación y en el apoyo de datos morfológicos.

En un estudio de la subespecie *Falcipecten canadensis isleibi* se demuestra que existe independencia demográfica y genética en sus poblaciones con respecto a poblaciones de *F. c. canadensis* y *F. c. franklinii* que requiere atención especial en el manejo para mantener ese linaje evolutivo (Barry and Tallmon, 2010).

Draheim *et al.* (2010) al analizar la estructura genética entre tres subespecies de *Sternula antillarum* (*S. a. browni*, *S. a. athalassos* y *S. a. antillarum*) encuentran poca evidencia de estructura genética y poca subdivisión poblacional entre ellas, por lo que sugieren una reevaluación de las subespecies de *S. antillarum* y eliminar las denominaciones de subespecie.

En el grupo de los psitácidos existen pocos trabajos bajo este tipo de análisis, la mayoría se enfocan en estudios de áreas como la filogenética y biogeografía en diferentes niveles taxonómicos (Tavares 2004; Astuti *et al.*, 2006; Ribas 2005, 2009; Tavares *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008; Mayr, 2010; Kirchman, 2012). Sin embargo, se pueden citar algunos trabajos donde se realizan análisis moleculares con un sentido de conservación, como el publicado por Faria *et al.* (2008) donde realizan un análisis de variación genética y conservación en tres poblaciones de *Anodorhynchus hyacinthinus*.

Ellos encuentran dos grupos diferenciados genéticamente y destacan la aplicación de sus análisis en el campo de la biología de la conservación cuando logran la asignación de individuos de sustracción desconocida a su población de origen.

Otro estudio con mayor cercanía al tema que nos ocupa es el realizado por Rusello *et al.* (2010), quienes con un análisis filogenético de 5 subespecies controversiales en *A. leucocephala* demostraron que se forman 3 grupos monofiléticos, uno de ellos integrado por las subespecies *A. l. leucocephala* y *A. l. palmrum* y el subclado monofilético *A. l. hesterna*, por otro lado, en el clado de la subespecie *A. l. bahamensis* encuentran suficiente diferenciación genética como para proponerlos como grupos separados que merecen conservación.

Destaca también el estudio publicado por Rusello y Amato (2004) donde se incluyen las 3 subespecies de *Amazona albifrons*, donde se realizaron análisis filogenéticos con marcadores mitocondriales (COI, 12S y 16S) y nucleares (b-fibrin7, RP40 y TROP) a nivel de Género. Incluyendo un ejemplar por subespecie de *A. albifrons*, encuentran monofilia para la especie pero aclaran que se requiere de estudios adicionales y la ampliación de la muestra a nivel subespecífico para la designación de unidades de conservación.

Un trabajo que destaca por la similitud que tiene con el presente estudio es el realizado por Wenner *et al.*, (2012), ellos revisaron secuencias nucleares y mitocondriales de las 5 subespecies de *Amazona farinosa*, donde encontraron amplias diferencias entre las subespecies distribuidas en Centroamérica y Sudamérica. Mediante análisis filogenéticos demostraron que existen dos clados monofiléticos, uno donde se agrupan las subespecies centroamericanas y otro con las sudamericanas. Las distancias genéticas medias de las secuencias de *cytb* fueron de 3.5-5.4% entre estos dos clados, y con base en estos datos sugieren que las amazonas centroamericanas (subespecies *A. f. guatemalae* y *A. f. virenticeps*) y sudamericanas (*A. f. farinosa*, *A. f. inorata* y *a. f. chapmani*) se deben considerar como especies filogenéticamente

distintas, lo que soporta fuertemente su idea de que deben ser consideradas como unidades de conservación separadas.

4. JUSTIFICACIÓN

Aratinga canicularis, *Amazona albifrons* y *Amazona finschi* son especies con poblaciones vulnerables en sus hábitat naturales por esta razón son necesarios los análisis que auxiliien en el establecimiento de estrategias de conservación, en este campo de la biología la taxonomía molecular juega un papel determinante ya que permite identificar diferencias entre subespecies imposibles de detectar con métodos tradicionales.

5. HIPÓTESIS

Se plantean las siguientes hipótesis por separado de acuerdo a las especies en cuestión:

Las subespecies *Aratinga canicularis canicularis*, *Aratinga canicularis clarae* y *Aratinga canicularis eburnirostrum* forman tres clados monofiléticos.

Las subespecies *Amazona albifrons albifrons*, *Amazona albifrons nana* y *Amazona albifrons saltuensis* son monofiléticas recíprocas.

Amazona finschi finschi y *Amazona finschi woodi* conforman dos clados monofiléticos.

6. OBJETIVOS

General

- Analizar la filogenia a nivel subespecífico de *Aratinga canicularis*, *Amazona albifrons* y *Amazona finschi*.

Específicos

- Realizar un análisis de haplotipos a nivel subespecífico para cada especie.
- Determinar si existen monofilias recíprocas en *Aratinga canicularis*, *Amazona albifrons* y *Amazona finschi*, con el uso de secuencias de ADN mitocondrial.
- Identificar unidades evolutivamente significativas para cada especie basadas en monofilia recíproca.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Muestras biológicas.

Se contó con muestras de ejemplares depositadas en 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) y provienen de dos proyectos de colaboración (Ecología y situación actual de las especies prioritarias de psitácidos de la vertiente del Pacífico mexicano a cargo de Dr. T. Monterrubio Rico y Diagnóstico y propuestas sobre el potencial de manejo sustentable de la fauna silvestre en el bajo Balsas Michoacán a cargo del Dr. Alejandro Pérez Arteaga). Adicionalmente, se contó con muestras de *A. a. nana* provenientes de una donación del santuario de aves Xaman Ha en Quintana Roo a cargo del Biol. Javier González Vázquez. Los individuos muestreados se asignaron a una de las subespecies con base en los datos morfométricos, la localidad de captura y distribuciones publicadas para las subespecies (Forshaw, 1989).

Las localidades de colecta y número de individuos analizados por subespecie se reportan en la tabla 1 y en la figura 4. A todos los individuos se les asignó una clave de identificación para su registro en catálogo (Tabla 2).

Tabla 1. Número de muestras (N) consideradas por subespecie y localidad.

Subespecie	N	Localidad	Subespecie	N	Localidad
<i>A. c. eburnirostrum</i>	5	Palos Marías y Agua Cola (Michoacán)	<i>A. a. nana</i>	4	Playa del Carmen (Quintana Roo)
<i>A. c. clarae</i>	4	Badiraguato, Imala y Cosalá (Sinaloa)	<i>A. f. finschi</i>	4	Palos Marías, Los Pozos, San Juan de Alima y San Telmo (Michoacán)
<i>A. a. albifrons</i>	3	Lázaro Cárdenas y Los Pozos (Michoacán)	<i>A. f. woodi</i>	4	Imala, y Cosalá (Sinaloa)
<i>A. a. saltuensis</i>	4	Mocorito y Cosalá (Sinaloa)			

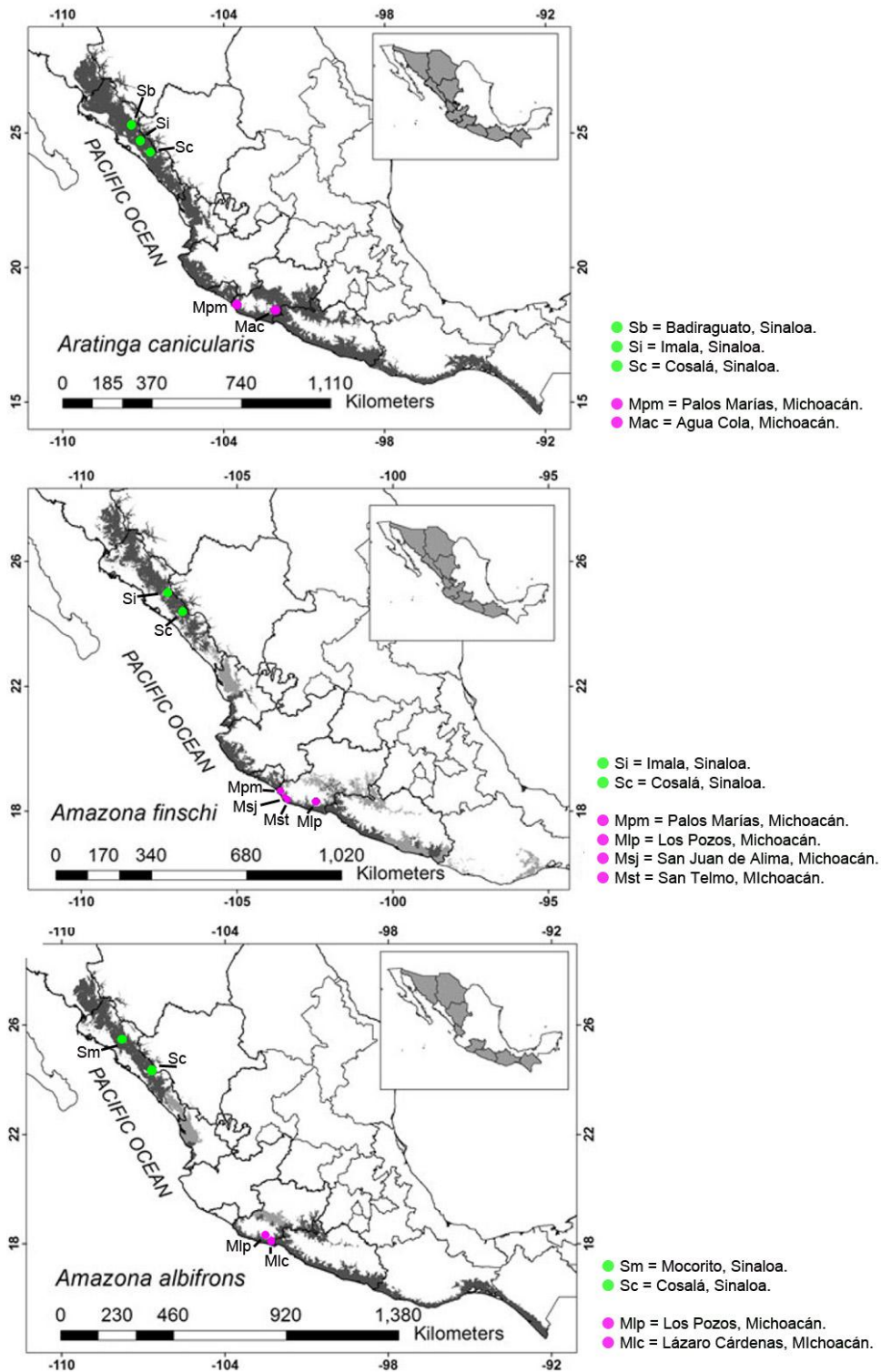


Figura 4. Mapas donde se muestran los sitios de colecta de las muestras (Tomados de Marín-Togo *et al.*, 2012). Las muestras de diferentes localidades de Sinaloa se indican con círculos verdes y las muestras provenientes de Michoacán se indican con círculos en rosa.

Tabla 2. Claves de identificación de los individuos analizados en este estudio.

Especie	Clave	Subespecie/ Municipio de colecta, Estado/ No. muestra.
<i>A. canicularis</i>	AceMac10	<i>A. c. eburnirostrum</i> . Agua Cola, Michoacán. Muestra 10.
	AceMpm53	<i>A. c. eburnirostrum</i> . Palos Marías, Michoacán. Muestra 53.
	AceMpm58	<i>A. c. eburnirostrum</i> . Palos Marías, Michoacán. Muestra 58.
	AceMpm60	<i>A. c. eburnirostrum</i> . Palos Marías, Michoacán. Muestra 60.
	AceMpm62	<i>A. c. eburnirostrum</i> . Palos Marías, Michoacán. Muestra 62.
	AccSb14	<i>A. c. clarae</i> . Badiraguato, Sinaloa. Muestra 14.
	AccSi27	<i>A. c. clarae</i> . Imala, Sinaloa. Muestra 27.
	AccSc48	<i>A. c. clarae</i> . Cosalá, Sinaloa. Muestra 48.
	AccSc49	<i>A. c. clarae</i> . Cosalá, Sinaloa. Muestra 49.
<i>A. albifrons</i>	AanQpc1	<i>A. a. nana</i> . Playa del Carmen, Quintana Roo. Muestra 1.
	AanQpc2	<i>A. a. nana</i> . Playa del Carmen, Quintana Roo. Muestra 2.
	AanQpc3	<i>A. a. nana</i> . Playa del Carmen, Quintana Roo. Muestra 3.
	AanQpc4	<i>A. a. nana</i> . Playa del Carmen, Quintana Roo. Muestra 4.
	AasSm11	<i>A. a. saltuensis</i> . Mocorito, Sinaloa. Muestra 11.
	AasSm13	<i>A. a. saltuensis</i> . Mocorito, Sinaloa. Muestra 13.
	AasSc30	<i>A. a. saltuensis</i> . Cosalá, Sinaloa. Muestra 30.
	AasSc42	<i>A. a. saltuensis</i> . Cosalá, Sinaloa. Muestra 42.
	AaaMlp15	<i>A. a. albifrons</i> . Los pozos, Michoacán. Muestra 15.
	AaaMlc89	<i>A. a. albifrons</i> . Lázaro Cárdenas, Michoacán. Muestra 89.
	AaaMlc90	<i>A. a. albifrons</i> . Lázaro Cárdenas, Michoacán. Muestra 90.
<i>A. finschi</i>	AfwSi32	<i>A. f. woodi</i> . Imala, Sinaloa. Muestra 32.
	AfwSi33	<i>A. f. woodi</i> . Imala, Sinaloa. Muestra 33.
	AfwSc39	<i>A. f. woodi</i> . Cosalá, Sinaloa. Muestra 39.
	AfwSc40	<i>A. f. woodi</i> . Cosalá, Sinaloa. Muestra 40.
	AffMlp14	<i>A. f. finschi</i> . Los pozos, Michoacán. Muestra 14.
	AffMsj23	<i>A. f. finschi</i> . San Juan de Alima, Michoacán. Muestra 23.
	AffMpm50	<i>A. f. finschi</i> . Palos Marías, Michoacán. Muestra 50.
	AffMst88	<i>A. f. finschi</i> . San Telmo, Michoacán. Muestra 88.

7.2. Extracción de ADN de muestras de pluma y sangre.

La extracción de ADN se realizó a partir de pluma y sangre por el método libre de fenol de Fitz-Simmons (1997). En microtubos de 1.5 ml se colocaron 30 µl de sangre ó una fracción del cañón de la pluma de 4 por 2 mm, se incubaron con 400 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%) y 10 µl de proteinasa K (10mg/ml) (Sigma), por un periodo de 3 horas en caso de sangre y de 4 a 6 horas para pluma a 60°C en un termomixer (Eppendorf), se agitaron por inversión ocasionalmente.

Finalizado el tiempo de incubación, se adicionaron 170 μ l de acetato de amonio 7.5 M mezclando por inversión y se congeló a -70°C durante 20 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 25 minutos en una microcentrífuga (Sorvall). El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y se mezcló con 800 μ l de isopropanol frío (-20°C), se almacenó a -70°C toda la noche. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 25 minutos, se eliminó el sobrenadante y se enjuagó con etanol al 70% frío (-20°C). Se eliminó el exceso de etanol, se secó la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 ml agua destilada desionizada estéril ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dde}}$). Se almacenó a 4°C .

La presencia e integridad del ADN se revisó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001) teñido con Syber Safe 1X (Invitrogene), se aplicó una corriente de 80 voltios durante 30 minutos y se visualizó en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 200).

7.3. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la especie *A. canicularis* se realizó la amplificación de tres secuencias por PCR: RC, COI y ND2. Los oligonucleótidos RC_{arcaD} (5'-CATAAACTGTGGGCTGGTC-3') y RC_{arcaR} (5'-GGCTTGATAGAACGGAGAGTAAAA-3') que amplifican un fragmento aproximado de 560 pb de la RC de *A. canicularis* fueron diseñados en este trabajo mediante el programa DNASTAR Lasergene LG10VC (Kumar and Blaxter, 2010) con base en una secuencia de la RC reportada en GenBank para *A. pertinax* (No. de acceso EU621597.1) (Tabla 3), la reacción de amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C durante 40 segundos, 56°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto, y extensión final de 72°C durante 3 min (GeneAmp PCR System 2700/Applied Biosystems). La amplificación de un fragmento de 590 pb de COI se realizó con los oligos $\text{COI}_{\text{arcaD}}$ (5'-CTACCACGCGGGCAAAAA-3') y $\text{COI}_{\text{arcaR}}$ (5'-CCCAATGGAGGATAAAGTGTT-3')

diseñados de la misma manera que para la RC pero con base en una secuencia de COI reportada en GenBank para *A. canicularis* (No. de acceso HQ629753.1) y otras especies del género (Tabla 3), las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C durante 40 segundos, 55°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 minuto, y extensión final de 72°C durante 3 min (GeneAmp PCR System 2700/Applied Biosystems). Finalmente para la especie se realizó la amplificación del gen ND2 de aproximadamente 1140 pb con los oligonucleótidos L5215 (5'-TATCGGGCCCATACCCCGAATA-3') (Hacket, 1996) y HTrpC (5'-CGGACTTTAGCA GAACTAAGAG-3') (Smithsonian TR Inst.) (Tabla 3) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a una temperatura de 94°C durante 40 segundos, alineamiento a 56°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos, y una extensión final de 72°C durante 5 minutos.

Para la especie *A. albifrons* se realizaron las amplificaciones de los marcadores COI y ND2 y en *A. finschi* los marcadores RC, COI y ND2. La amplificación de un fragmento de 650 pares de bases (pb) de la secuencia del gen de la Citocromo Oxidasa I (COI) de las muestras de *A. albifrons* y de *A. finschi* se realizó con los oligonucleótidos reportados por Palumbi *et al.*, (2002): COIF-L (5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3') y COIa-H (5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3') (Tabla 3), las reacciones de amplificación se prepararon en microtubos de 0.2 ml como sigue: 200 ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1.5 mM, 200 μM de cada dNTP, Platinum *Taq* DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogene) y H₂O_{dde} hasta un volumen final de 25 μl. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a una temperatura de 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 65°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final de 72°C durante 3 minutos (GeneAmp PCR System 2700/Applied Biosystems).

La amplificación del gen ND2 de *A. albifrons* y *A. finschi* se realizó con los oligonucleótidos reportados en este trabajo para *A. canicularis* (Tabla 3), bajo las mismas condiciones.

La amplificación de un fragmento de aproximadamente 570 pb de la RC de *A. finschi* se realizó con los oligonucleótidos LGlu (5'-GCCCTGAAAARCCATCGTTG-3') y CR522Rb (5'-TGGCCCTGACYTAGGAACCAG-3') reportados por Eberhard *et al.*, 2001 (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio para amplificar diferentes regiones del ADN mitocondrial de *A. canicularis*, *A. albifrons* y *A. finschi*.

Marcador/ Especie	Secuencia de los oligonucleótidos	Fuente
RC <i>A. canicularis</i>	RC _{arcaD} (5'-CATAAACTGTGGGCTGGTC-3') RC _{arcaR} (5'-GGCTTGATAGAACGGAGAGTAAAA-3')	Diseñados en este trabajo.
COI <i>A. canicularis</i>	COI _{arcaD} (5'-CTACCACGCGGGCAAAA-3') COI _{arcaR} (5'-CCCAATGGAGGATAAAGTGTT-3')	Diseñados en este trabajo.
RC <i>A. finschi</i>	LGlu (5'-GCCCTGAAAARCCATCGTTG-3') CR522Rb (5'-TGGCCCTGACYTAGGAACCAG-3')	Eberhard <i>et al.</i> , 2001.
COI <i>A. finschi</i> y <i>A. albifrons</i>	COIF-L (5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3') COIa-H (5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3')	Palumbi <i>et al.</i> , 2002.
ND2 <i>A. canicularis</i> , <i>A. albifrons</i> y <i>A. finschi</i>	L5215 (5'-TATCGGGCCCATAACCCCGAATA-3') HTrpC (5'-CGGACTTTAGCAGAACTAAGAG-3')	Hacket, 1996 y Smithsonian TR Inst.

La reacción de amplificación de la RC de *A. finschi* se realizó por PCR exponencial que consta de dos fases, la reacción de la fase 1 se preparó en un microtubo de 0.2 ml incluyendo: 200 ng de ADN, 10 picomol del oligonucleótido LGlu, buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1.5 mM, 200 μM de cada dNTP, Platinum Taq DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogene) en un volumen final de 25 μl completado con H₂O_{dde}. Las condiciones de la fase 1 fueron las siguientes: 94°C durante 3 minutos,

seguido de 25 ciclos iniciando con una desnaturalización a una temperatura de 95°C durante 40 segundos, alineamiento a 55°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, se incluyó una extensión final a 72°C durante 3 minutos, concluido el tiempo la reacción se mantuvo a 65°C y se adicionó la reacción de la fase 2 que incluye los siguientes reactivos: 10 pmol de cada oligonucleótido (LGlu y CR522Rb), buffer para PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ 1.5 mM, 200 μM de cada dNTP, Platinum *Taq* DNA polimerasa 1.5 U (Invitrogene) y H₂O_{dde} para completar un volumen final de 25μl. Las condiciones de la fase 2 fueron las siguientes: 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a una temperatura de 95°C durante 40 segundos, alineamiento a 56°C durante 40 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final de 72°C durante 5 minutos (GeneAmp PCR System 2700/Applied Biosystems).

Los productos de amplificación se revisaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8), buffer de carga tipo III 6X (Bromofenol 0.25%, xilencianol FF 0.25% y glicerol 30%) (Sambrook y Rusell, 2001), teñido con Sybr Safe 1X (Invitrogene), y el marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogene). Se aplicó una corriente de 80 voltios durante 30 minutos y se visualizó en un fotodocumentador (Kodak Gel Logic 2000).

7.4. Secuenciación.

La secuenciación del ADN se realizó en ambas cadenas por el método de dideoxy (Sanger *et al.*, 1977), mediante el sistema comercial DNA Sequencing (BigDye v3.1 Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction Applied Biosystems) y de manera automatizada en un AbiPrism 310 (Applied Biosystems).

7.5. Análisis de secuencias.

Los electroferogramas y sus secuencias se analizaron, se editaron y se alinearon con el programa Bioedit 7.09 (Hall, 1999), y se compararon con las bases de datos internacionales mediante el programa BLAST de NCBI (Zhang, *et al.*, 2000).

Para la obtención del número de haplotipos por especie y sitios polimórficos de las secuencias se utilizó el programa DnaSP5.10 (Librado and Rozas, 2009).

7.6. Construcción de árboles filogenéticos.

Con los alineamientos obtenidos se construyeron árboles filogenéticos para cada región por separado y para datos combinados con las regiones disponibles, los árboles están basados en distancias genéticas y en caracteres bajo los modelos de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood -ML-), Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony -MP-) y bayesianos mediante el uso de programas como MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) y Mr Bayes v3.1 (Ronquis and Huelsenbeck, 2003), los soportes de los nodos se estimaron con análisis bootstrap.

Para la reconstrucción de filogenias usando algoritmos de ML, se utilizó el modelo de evolución molecular elegido bajo el criterio de información de Akaike (AIC) (Alfaro y Hulsenbeck, 2006) y para la inferencia filogenética bayesiana se utilizó el modelo de evolución molecular determinado por el mejor criterio de información bayesiana (BIC), ambos con el programa ModelTest v.3.7 (Posada, 2008). 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 v3.1, los árboles fueron muestreados cada 1,000 generaciones, descartando el 10% para obtener un árbol de consenso de mayoría.

7.7. Grupos externos.

La elección de los grupos externos para cada especie se realizó basada en una construcción previa de árboles filogenéticos realizada para este trabajo (árboles no mostrados), en ellos se incluyeron todas las secuencias reportadas en GenBank para cada especie del genero y marcador, lo que permitió visualizar y elegir la especie hermana.

Grupos externos de *Aratinga canicularis*.

Los alineamientos con las secuencias de COI de *A. canicularis* incluyeron como grupo externo secuencias de la especie *Aratinga pertinax* (No. de acceso: JQ174079.1) además de la única reportada para *A. canicularis* con este marcador en banco de datos (No. de acceso: HQ629753.1). En el alineamiento de secuencias de ND2 se incluyeron la secuencia reportada en GenBank para la especie (No. de acceso: HQ629718.1) y como grupo externo la secuencia de *A. pertinax* (No. de acceso: EU327600.1). Para la secuencia de RC se consideró la de *A. pertinax* (No. de acceso: NC015197.1) como grupo externo, no existen secuencias reportadas de la RC en el banco de datos para esta especie. En la concatenación de las secuencias también se tomó como grupo externo *A. pertinax*.

Grupos externos de *Amazona albifrons*.

Las secuencias de COI de *A. albifrons* para la construcción de árboles filogenéticos consideraron las tres subespecies reportadas en GenBank (Números de acceso: AY301427.1, AY301428.1 y AY301429.1), una reportada para la especie (No. de acceso: HQ629750.1) y como grupo externo se eligió *Amazona festiva* (No. de acceso: GU826171.1). En los alineamientos de ND2 se incluyó la única secuencia reportada para la especie en banco de datos (No. de acceso: HQ629715.1) y como grupo externo *A. festiva* (No. de acceso: HQ270478.1). En los alineamientos de las secuencias concatenadas se tomaron estas mismas secuencias como grupo externo.

Grupos externos de *Amazona finschi*.

En los alineamientos de COI para *A. finschi* se incluyó la secuencia reportada para la especie (No. de acceso: AY301445.1) y como grupo externo la secuencia de *Amazona autumnalis* (No. de acceso: AY301434.1). Los alineamientos de las secuencias de ND2 incluyeron una secuencia de *A. autumnalis* (No. acceso AY194446.1) como grupo externo. En los alineamientos de la RC se incluyó también la secuencia de *A. autumnalis* (No. acceso AF338284.1). La especie no tiene reportes de secuencias ND2 y RC en banco de datos. Para los alineamientos concatenados se tomó como grupo externo las secuencias anteriormente mencionadas de *A. autumnalis*.

7.8. Red de haplotipos

Las relaciones entre los haplotipos se establecieron basadas en las secuencias concatenadas de los marcadores COI, ND2 y RC en el caso de *A. canicularis* y *A. finschi*, y para *A. albifrons* las secuencias concatenadas incluyeron los marcadores COI y ND2. La construcción de redes se realizó mediante el método Median-joining con el software NETWORK v4.6.0.0, al construir las redes el método combina el algoritmo de Kruskal para encontrar árboles de expansión mínima favoreciendo conexiones cortas y el algoritmo heurístico de máxima parsimonia de Farris (MP), el cual agrega secuencialmente vectores (Bandelt *et al.*, 1999).

8. RESULTADOS

8.1. Extracción de ADN.

Se obtuvo el ADN en buena concentración e integridad de 9 muestras de *A. canicularis*, 11 de *A. albifrons* y 8 de *A. finschi*.

8.2. Amplificaciones y secuenciación.

A partir de las 9 muestras de ADN de *A. canicularis* y con los diferentes pares de oligonucleótidos (Tabla 3) se obtuvieron las amplificaciones de los fragmentos de la RC (560 pb), de COI (650 pb) y del gen ND2 (1100 pb) (Fig. 5).

A partir de las 11 muestras de ADN de *A. albifrons* se amplificaron fragmentos de 650 bp del gen COI y 1100 pb del gen ND2 (Fig. 6).

Con las 8 muestras de *A. finschi* y los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 3) se obtuvieron los fragmentos esperados de 650 pb del gen COI, 570 pb de la RC y 1100 pb del gen ND2 (Fig. 7).

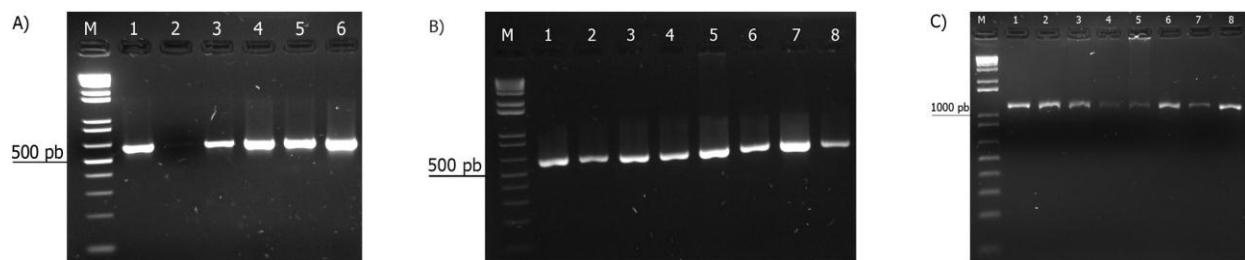


Figura 5. Amplificación de marcadores mitocondriales RC, COI y ND2 de *A. canicularis*. A), B) y C) Geles de agarosa al 1%, en TAE 1X teñido con Sybr Safe 1X. En el carril M, marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder; A) Amplificaciones *A. canicularis* RC, carriles 1-3 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. c. clarae*; carriles 4-6 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. c. eburnirostrum*. B) Amplificaciones COI de *A. canicularis*, carriles 1-4 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. c. clarae*; carriles 5-8 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. c. eburnirostrum*. C) Amplificaciones ND2 *A. canicularis*, carriles 1-4 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. c. clarae*; carriles 5-8 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. c. eburnirostrum*.

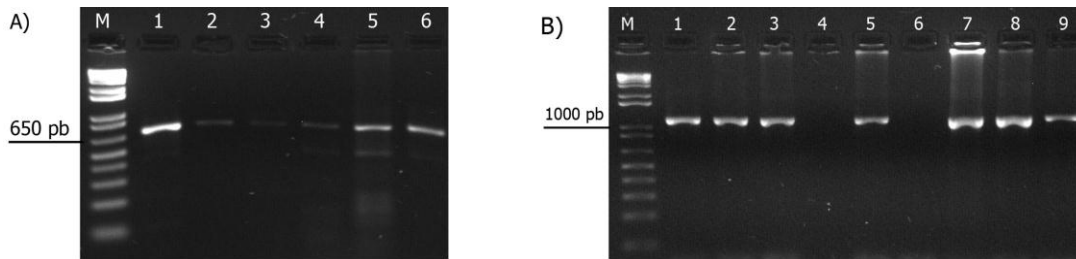


Figura 6. Amplificación de marcadores mitocondriales COI y ND2 de *A. albifrons*. A) y B) Geles de agarosa al 1%, en TAE 1X teñido con Sybr Safe 1X. En el carril M, marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder; A) Amplificaciones de COI de *A. albifrons*, carriles 1-2 muestras de 2 individuos de la subespecie *A. a. albifrons*; carriles 3-4 muestras de 2 individuos de la subespecie *A. a. saltuensis*; 5-6 muestras de 2 individuos de la subespecie *A. a. nana*. B) Amplificaciones ND2 *A. albifrons*, carriles 1-3 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. a. albifrons*; carriles 4-6 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. a. saltuensis*; 7-9 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. a. nana*.

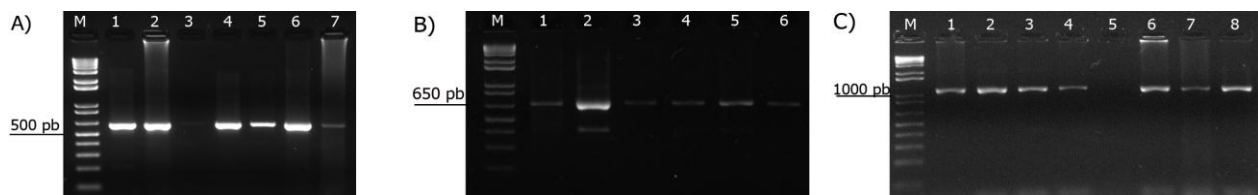


Figura 7. Amplificación de marcadores mitocondriales RC, COI y ND2 de *A. finschi*. A), B) y C) Geles de agarosa al 1%, en TAE 1X teñido con Sybr Safe 1X. En el carril M, marcador de tamaño molecular 1Kb Plus DNA Ladder; A) Amplificaciones de la RC de *A. finschi*, carriles 1-4 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. f. finschi*; carriles 5-7 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. f. woodi*. B) Amplificaciones de COI de *A. finschi*, carriles 1-3 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. f. finschi*; carriles 4-6 muestras de 3 individuos de la subespecie *A. f. woodi*. C) Amplificaciones ND2 *A. finschi*, carriles 1-4 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. f. finschi*; carriles 5-8 muestras de 4 individuos de la subespecie *A. f. woodi*.

8.3. Secuenciación, edición y alineamiento.

Aunque algunas de las muestras de las *Amazonas* analizadas presentaron fragmentos duplicados del marcador COI de aproximadamente 450 pb, estos no interfirieron para la secuenciación por su concentración baja.

Secuencias de *A. canicularis*.

Aun cuando a partir de los fragmentos de RC de *A. canicularis* se amplificaron secuencias de 560 a 580 pb, para el análisis de número de haplotipos y sitios polimórficos, los alineamientos y la construcción de árboles filogenéticos se incluyeron 549 pb de las secuencias de este trabajo y de las reportadas en banco de datos.

En las amplificaciones de COI de *A. canicularis* se obtuvieron secuencias de 570 a 590 pb, y para el análisis de número de haplotipos y sitios polimórficos se utilizaron 552 pb. Sin embargo, después de los alineamientos con las secuencias reportadas en GenBank se consideró una región de 541 pb en la construcción de árboles filogenéticos.

A partir de la amplificación del gen ND2 se obtuvieron secuencias de 1055 a 1100 pb, y para el análisis de número de haplotipos y sitios polimórficos se utilizaron 1050 pb. Para los alineamientos y para la construcción de árboles filogenéticos se incluyeron 1019 pb de secuencias reportadas en GenBank.

Secuencias de *A. albifrons*.

En las secuencias de COI de *A. albifrons* se obtuvieron fragmentos de 655 a 684 pb, y en la obtención de número de haplotipos y sitios polimórficos se tomaron en cuenta alineamientos de 652 pb. Como resultado del alineamiento con las secuencias de las tres subespecies, más las especies consideradas como grupos externos se analizó un fragmento de 506 pb en la construcción de árboles filogenéticos.

Las secuencias del gen ND2 de *A. albifrons* mostraron tamaños de 1058 a 1068 pb. En el alineamiento para obtener número de haplotipos y sitios polimórficos se utilizaron 1031 pb. Al incluir datos de secuencias del GenBank los alineamientos se realizaron con 1029 pb.

Secuencias de *A. finschi*.

El análisis de las secuencias de la RC de *A. finschi* mostró fragmentos de entre 593 y 616 pb, y para la obtención de número de haplotipos y sitios polimórficos se utilizaron 590 bp. Para los alineamientos y construcción de árboles filogenéticos se incluyeron 569 pb de secuencias reportadas en banco de datos.

Las secuencias de COI de *A. finschi* obtenidas fueron de 655 a 684 pb, y en la obtención de número de haplotipos y sitios polimórficos se utilizaron 612 bp. Los alineamientos y construcción de árboles filogenéticos incluyeron 531 pb de las secuencias en GenBank.

Las secuencias del gen ND2 de *A. finschi* mostraron tamaños desde las 1070 a 1116 pb. En el alineamiento para obtener el número de haplotipos y sitios polimórficos se utilizaron 1067 pb. Para los alineamientos y construcción de árboles filogenéticos se incluyeron 1038 pb de secuencias de GenBank.

8.4. Análisis de haplotipos

Análisis de haplotipos de *Aratinga canicularis*

Los análisis realizados con las 9 secuencias de 549 pb correspondientes al fragmento de la RC de *A. canicularis* revelaron la presencia de 8 haplotipos (1_{acRC} - 8_{acRC}) con 21 sitios polimórficos, diversidad haplotípica Hd=0.9722, diversidad nucleotídica Pi=0.01417, todos los cambios nucleotídicos son transiciones, los

haplotipos 1_{acRC} a 4_{acRC} se encontraron en 5 individuos del estado de Michoacán y los haplotipos 5_{acRC} a 8_{acRC} se encontraron en 4 individuos del estado de Sinaloa (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de haplotipos y sitios variables encontrados en el fragmento de 549 pb de la RC de *A. canicularis*.

Haplotipos RC	Posición																						
	Individuo/ frecuencia	21	89	91	92	99	104	105	113	130	139	150	154	177	187	193	283	287	353	361	378	382	
A. <i>canicularis</i>																							
1 _{acRC}	AceMac10 / (1)	G	T	C	C	C	C	C	G	G	A	T	A	A	T	T	T	C	C	A	G	C	
2 _{acRC}	AceMpm53 / (1)	A	•	T	T	T	T	•	A	•	•	•	•	G	•	•	•	•	•	G	•	T	
3 _{acRC}	AceMpm58 AceMpm62 / (2)	A	C	•	T	•	•	•	A	A	•	•	•	•	•	•	•	•	T	G	•	T	
4 _{acRC}	AceMpm60 / (1)	A	•	•	T	•	T	•	A	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	G	•	•	
5 _{acRC}	AccSb14 / (1)	•	•	•	T	•	T	T	•	A	•	•	•	•	•	•	•	T	T	G	A	•	
6 _{acRC}	AccSi 27 / (1)	•	•	•	T	•	T	T	A	A	•	•	•	•	C	C	•	T	T	G	A	•	
7 _{acRC}	AccSc 48 / (1)	•	•	•	T	•	•	T	•	A	•	C	G	•	•	•	•	•	T	G	A	•	
8 _{acRC}	AccSc 49 / (1)	•	•	•	T	•	T	T	•	A	G	•	•	•	C	•	•	T	T	G	A	•	

1_{acRC}-8_{acRC} corresponden a haplotipos de la RC identificados en 9 individuos de *A. canicularis*, 1_{acRC}-4_{acRC} haplotipos encontrados en 5 individuos pertenecientes al estado de Michoacán, 5_{acRC}-8_{acRC} haplotipos encontrados en 4 individuos del estado de Sinaloa.

En las 9 secuencias del gen COI de 552 pb se observaron 7 haplotipos (1_{acCOI} - 7_{acCOI}) con 8 sitios polimórficos, Hd=0.9444, diversidad nucleotídica Pi=0.00443, todas las mutaciones son transiciones, los haplotipos 1_{acCOI} a 4_{acCOI} se encontraron exclusivamente en los 5 individuos del estado de Michoacán y los haplotipos 5_{acCOI} a 7_{acCOI} se encontraron en 4 individuos del estado de Sinaloa (Tabla 5).

Las 9 secuencias de 1054 pb del gen ND2 mostraron 5 haplotipos (1_{acND2} - 5_{acND2}) con 9 sitios polimórficos, Hd=0.722, diversidad nucleotídica Pi=0.00253, todos los cambios nucleotídicos son transiciones, el haplotipo 1_{acND2} se encontró en 5 individuos del estado de Michoacán y los haplotipos 2_{acND2} al 5_{acND2} se encontraron en 4 individuos del estado de Sinaloa (Tabla 5).

Tabla 5. Relación de haplotipos y sus sitios variables en *A. canicularis*. A) Fragmento de 552pb de la secuencia de COI. B) Fragmento de 1054 pb de la secuencia de ND2.

A)		Posición								
Haplotipos COI	Individuo/frecuencia	23	85	124	166	202	226	487	499	
1 _{acCOI}	AceMac10 / (1)	T	T	C	C	T	C	A	A	
2 _{acCOI}	AceMpm53 / (1)	•	•	•	•	•	•	•	G	
3 _{acCOI}	AceMpm58 AceMpm62 / (2)	•	C	•	•	•	•	G	•	
4 _{acCOI}	AceMpm60 / (1)	•	•	T	•	•	•	•	•	
5 _{acCOI}	AccSb14 / (1)	C	•	•	T	•	•	•	•	
6 _{acCOI}	AccSi27 AccSc49 / (2)	•	•	•	T	•	•	•	•	
7 _{acCOI}	AccSc48 / (1)	•	•	•	T	C	T	•	•	

B)		Posición								
Haplotipos ND2	Individuo/frecuencia	182	260	407	425	491	723	795	872	965
1 _{acND2}	AcMac10 AcMpm53 AcMpm58 AcMpm60 AcMpm62 / (5)	G	A	A	C	C	G	A	T	A
2 _{acND2}	AccSb14 / (1)	A	•	•	•	•	•	G	•	G
3 _{acND2}	AccSi27 / (1)	A	•	G	•	•	•	•	C	G
4 _{acND2}	AccSc48 / (1)	A	•	•	•	•	A	•	•	G
5 _{acND2}	AccSc49 / (1)	A	G	•	T	T	•	•	•	G

1_{acCOI}-7_{acCOI} corresponden a haplotipos de COI identificados en 9 individuos de *A. canicularis*, 1_{acCOI}-4_{acCOI} haplotipos encontrados en 5 individuos pertenecientes al estado de Michoacán, 5_{acCOI}-7_{acCOI} haplotipos encontrados en 4 individuos del estado de Sinaloa. 1_{acND2}-5_{acND2} corresponden a haplotipos del gen ND2 identificados en 9 individuos de *A. canicularis*, 1_{acND2} haplotipos encontrados en 5 individuos pertenecientes al estado de Michoacán, 2_{acRC}-5_{acRC} haplotipos encontrados en 4 individuos del estado de Sinaloa.

Análisis de haplotipos *A. albifrons*.

Las 11 secuencias de COI de *A. albifrons* con 652 pb mostraron 6 sitios polimórficos y 6 haplotipos (1_{aaCOI} - 6_{aaCOI}) (Hd=0.891, Pi=0.00312), todas las mutaciones observadas son transiciones. El haplotipo 1_{aaCOI} se encontró en 3 individuos de Sinaloa, el haplotipo 2_{aaCOI} está en 2 individuos de Sinaloa y uno de Michoacán, el haplotipo 3_{aaCOI} en 2 individuos de Michoacán y los haplotipos 4_{aaCOI} a 6_{aaCOI} están en individuos de Quintana Roo (Tabla 6).

En la secuencia del gen ND2 de *A. albifrons* se encontraron 8 haplotipos (1_{aaND2} - 8_{aaND2}) (Hd=0.9455, Pi=0.00374) con 12 sitios variables. Los haplotipos 1_{aaND2} y 2_{aaND2} se encontraron en 3 individuos de Michoacán, los haplotipos 3_{aaND2}, 4_{aaND2}, y 5_{aaND2} se

localizaron en 4 individuos de Sinaloa, y los haplotipos del 6_{aaND2} a 8_{aaND2} se encontraron en los 4 individuos del estado de Quintana Roo (Tabla 6).

Tabla 6. Relación de haplotipos y sitios variables de *A. albifrons*. A) Para el fragmento de 591pb de la secuencia del gen COI. B) Fragmento de 1031pb de la secuencia del gen ND2.

A)		Posición						
Haplotipos COI	Individuo/frecuencia	145	160	409	475	532	541	
1 _{aaCOI}	AaaMlp15; AasSc30; AasSc42 / (3)	A	T	A	T	C	G	
2 _{aaCOI}	AaaMlc89; AaaMlc90 / (2)	•	•	•	•	•	A	
3 _{aaCOI}	AasSm11; AasSm13 / (2)	•	•	•	C	•	•	
4 _{aaCOI}	AanQpc1; AanQpc3 / (2)	•	•	G	•	T	•	
5 _{aaCOI}	AanQpc2 / (1)	G	•	G	•	T	•	
6 _{aaCOI}	AanQpc4 / (1)	•	C	G	•	T	•	

B)		Posición											
Haplotipos ND2	Individuo/frecuencia	253	286	295	349	373	548	568	609	661	706	853	968
1 _{aaND2}	AaaMlp15 / (1)	G	C	C	A	G	C	T	C	C	G	G	A
2 _{aaND2}	AaaMlc89; AaaMlc90 / (2)	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•
3 _{aaND2}	AasSm11; AasSm13 / (2)	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	A	•
4 _{aaND2}	AasSc30 / (1)	•	•	•	•	•	•	C	•	•	A	•	•
5 _{aaND2}	AasSc42 / (1)	A	•	•	•	•	•	C	•	T	•	A	•
6 _{aaND2}	AanQpc1; AanQpc3 / (2)	A	•	T	G	•	•	C	T	•	•	A	•
7 _{aaND2}	AanQpc2 / (1)	A	T	T	G	A	•	C	T	•	•	A	C
8 _{aaND2}	AanQpc4 / (1)	A	•	T	G	•	T	C	T	•	•	A	•

1_{aaCOI}-6_{aaCOI} corresponden a haplotipos COI identificados en 11 individuos de *A. albifrons*, 1_{aaCOI} se encuentra en un individuo de Michoacán y dos de Sinaloa; el haplotipo 2_{aaCOI} se encuentra en individuos de Michoacán; 3_{aaCOI} en individuos de Sinaloa; los haplotipos del 4_{aaCOI}-6_{aaCOI} encontrados en 4 individuos del estado de Quintana-Roo.

1_{aaND2}-8_{aaND2} corresponden a haplotipos del gen ND2 identificados en 11 individuos de *A. albifrons*, los haplotipos 1_{aaND2} y 2_{aaND2} se encontraron en organismos de Michoacán; los haplotipos 3_{aaND2}-5_{aaND2} se encontraron en individuos de Sinaloa; los individuos del estado de Quintana Roo mostraron los haplotipos 6_{aaND2}-8_{aaND2}.

Análisis de haplotipos de *Amazona finschi*.

En las secuencias del fragmento de la RC de los 8 individuos de *A. finschi* se analizaron 591 pb, se encontraron 8 haplotipos (1_{afRC} a 8_{afRC}) (diversidad haplotípica Hd=1, diversidad nucleotídica Pi=0.01082), con 18 sitios variables. Los haplotipos 1_{afRC}

a 4_{afRC} se encontraron en individuos de Michoacán y los haplotipos 5_{afRC} a 8_{afRC} en individuos de Sinaloa (Tabla 7).

Los análisis realizados con las secuencias de la especie *A. finschi* revelaron que en un total de 8 secuencias de 612 pb de COI, existe solo un sitio polimórfico en la posición 192 (una transición, C por T en el individuo con clave AfwSi32) y por lo tanto 2 haplotipos (1_{afCOI} y 2_{afCOI}) (Hd=0.25, Pi=0.00041). El haplotipo 1_{afCOI} se encuentra en 7 individuos de Michoacán y Sinaloa y el haplotipo 2_{afCOI} en un individuo de la localidad de Imala Sinaloa.

En las secuencias del gen de ND2 se encontró un único haplotipo (Hd=0.0, Pi=0.0).

Tabla 7. Relación de haplotipos para *A. finschi* encontrados en un fragmento de 591 pb de la secuencia de RC.

Haplotipos RC	Posición																		
	Individuo/frecuencia	140	195	217	230	239	263	264	265	269	289	338	339	355	358	360	365	385	394
1 _{afRC}	AffMlp14 / (1)	C	C	A	A	T	C	C	T	T	T	T	T	C	C	T	C	A	A
2 _{afRC}	AffMsj23 / (1)	•	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
3 _{afRC}	AffMpm50 / (1)	•	•	G	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•
4 _{afRC}	AffMst88 / (1)	•	•	G	•	•	•	•	•	•	C	•	•	T	•	•	•	•	•
5 _{afRC}	AfwSi32 / (1)	•	•	G	•	•	T	•	•	C	C	C	C	•	T	C	T	G	•
6 _{afRC}	AfwSi33 / (1)	T	T	G	•	•	•	T	C	•	C	C	•	•	•	•	T	•	G
7 _{afRC}	AfwSc39 / (1)	•	•	G	G	C	•	•	•	•	C	•	C	•	T	C	T	•	•
8 _{afRC}	AfwSc40 / (1)	•	•	G	•	•	T	•	•	•	C	•	C	•	T	C	T	G	•

1_{afRC}-8_{afRC} corresponden a haplotipos de la RC identificados en 8 individuos de *A. finschi*, 1_{afRC}-4_{afRC} haplotipos encontrados en 4 individuos pertenecientes al estado de Michoacán, 5_{afRC}-8_{afRC} haplotipos encontrados en 4 individuos del estado de Sinaloa.

8.5. Construcción de árboles filogenéticos.

Para cada especie se construyeron árboles filogenéticos independientes con cada marcador, usando algoritmos de parsimonia y verosimilitud. Adicionalmente se construyeron árboles con las secuencias concatenadas bajo los criterios de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y bayesianos.

Los modelos de evolución molecular para todos los análisis de máxima verosimilitud se eligieron bajo el criterio de información de Akaike corregido (AICc) (Alfaro and Hulsenbeck, 2006) y los análisis bayesianos se eligieron bajo el criterio de información bayesiana (BIC) (Schwarz, 1978), ambos calculados con ModelTest v.3.7 (Tabla 8).

Tabla 8. Modelos de evolución molecular elegidos para los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos para cada marcador y especie: A) *A. canicularis*, B) *A. albifrons*; C) *A. finschi*. Los criterios tomados en cuenta para su elección son AICc (criterio de información de Akaike corregido) (Alfaro and Hulsenbeck, 2006) y BIC (Criterio de Información Bayesiana) (Schwarz, 1978).

A) Marcador / <i>A. canicularis</i>	Mejor modelo Modeltest v3.7
RC	TrN+I (AICc)
COI	TrN+I (AICc)
ND2	TrN (AICc)
Secuencia concatenada	HKY+I (AICc); TIM+I (BIC)

B) Marcador/ <i>A. albifrons</i>	Mejor modelo Modeltest v3.7
COI	HKY (AICc)
ND2	TrN+I(AICc)
Secuencia concatenada	HKY+G (AICc) HKY+I (BIC)

C) Marcador/ <i>A. finschi</i>	Mejor modelo Modeltest v3.7
RC	TrN+G (AICc)
COI	HKY (AICc)
ND2	TrN+I (AICc)
Secuencia concatenada	TrN+I(AICc) K80+I (BIC)

RC=Region Control; COI=Citocromo Oxidasa I; ND2=NADH Deshidrogenasa 2; HKY=Hasegawa-Kishino-Yano (1985); HKY+G=Hasegawa-Kishino-Yano (1985) + Distribución gamma; HKY+I=Hasegawa-Kishino-Yano (1985)+sitios invariables; K80+I=Kimura 80 (Kimura, 1980)+sitios invariables; TIM+I= Modelo Transitional + Sitios invariables (Tavaré, 1986); TrN=Tamura-Nei (1993); TrN+G=Tamura-Nei (1993)+distribución Gamma; TrN+I=Tamura-Nei (1993)+sitios invariables.

8.6. Árboles filogenéticos y red de haplotipos de *A. canicularis*.

Los árboles de MP y ML con cada marcador se muestran en la Figura 8. Bajo el criterio de MP en cada árbol (RC, COI y ND2) se formaron tres clados monofiléticos reiteradamente: ACC, ACE y ACCa, estos corresponden a las tres subespecies analizadas: *A. c. clarae* (ACC), *A. c. eburnirostrum* (ACE) y *A. c. canicularis* (ACCa). En los árboles de ML se puede observar el mismo patrón, la excepción es el construido para el marcador COI que agrupa *A. c. canicularis* con *A. c. clarae*, aunque hay que mencionar que salvo algunas excepciones los valores bootstrap que soportan las ramas brindan poca certeza en todas las filogenias construidas.

Con las secuencias concatenadas (2109 pb) en el árbol de MP se observan también tres clados monofiléticos ACC, ACE y AcNCBI (secuencia del banco de datos), ésta última se ubica como basal ancestral de individuos de las dos subespecies *A. c. eburnirostrum* y *A. c. clarae*; en el clado ACC se encuentran secuencias pertenecientes a los 4 individuos de la subespecie *A. c. clarae* del estado de Sinaloa. En el clado ACE se agrupan los 5 individuos de la subespecie *A. c. eburnirostrum* de Michoacán (Figura 9A). El árbol de ML es muy parecido al de MP, coinciden en la ubicación basal de la secuencia del banco de datos y en la formación de dos clados y sus integrantes (ACE y ACC) aunque en ninguno de los dos árboles se obtuvieron valores bootstrap ampliamente confiables salvo para ACC (Figuras 9A y 9B). En el árbol bayesiano la secuencia del banco de datos también se ubica como ancestral para los clados ACC y ACE, en este árbol los valores de confiabilidad son aceptables, el clado ACE con 82 y ACC con 95% de confiabilidad (Figura 9C).

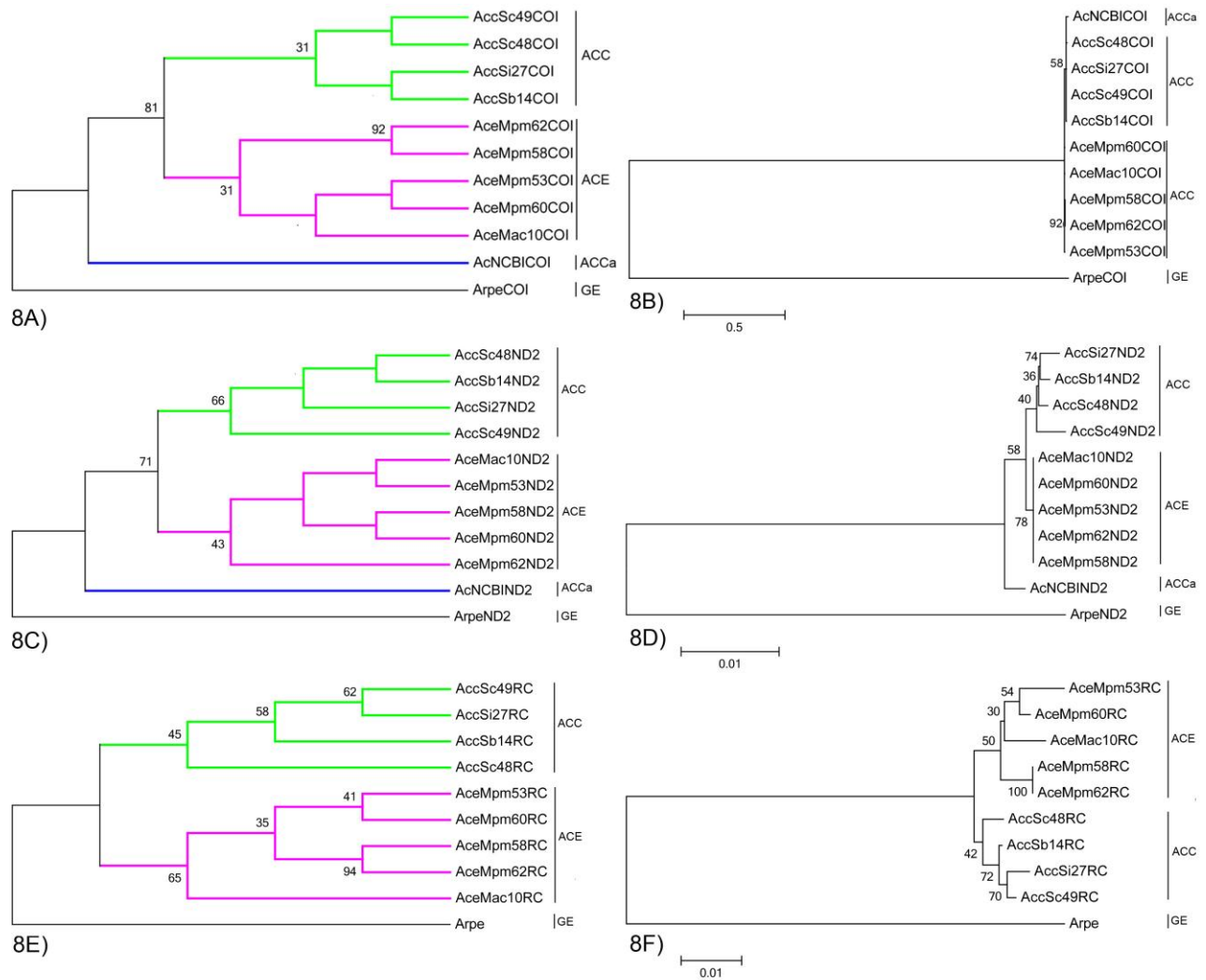


Figura 8. Árboles filogenéticos de *Aratinga canicularis*. 8A) Árbol de Máxima Parsimonia con el marcador COI. 8B) Árbol de Máxima Verosimilitud con el marcador COI. 8C) Árbol de Máxima Parsimonia con el marcador ND2. 8D) Árbol de Máxima Verosimilitud con el marcador ND2. 8E) Árbol de Máxima Parsimonia con el marcador RC. 8F) Árbol de Máxima Verosimilitud con el marcador RC. ACC: *Aratinga canicularis clarae*; ACE: *Aratinga canicularis eburnirostrum*; ACCa: *Aratinga canicularis canicularis*; GE: Grupo externo (Arpe=*Aratinga pertinax*).

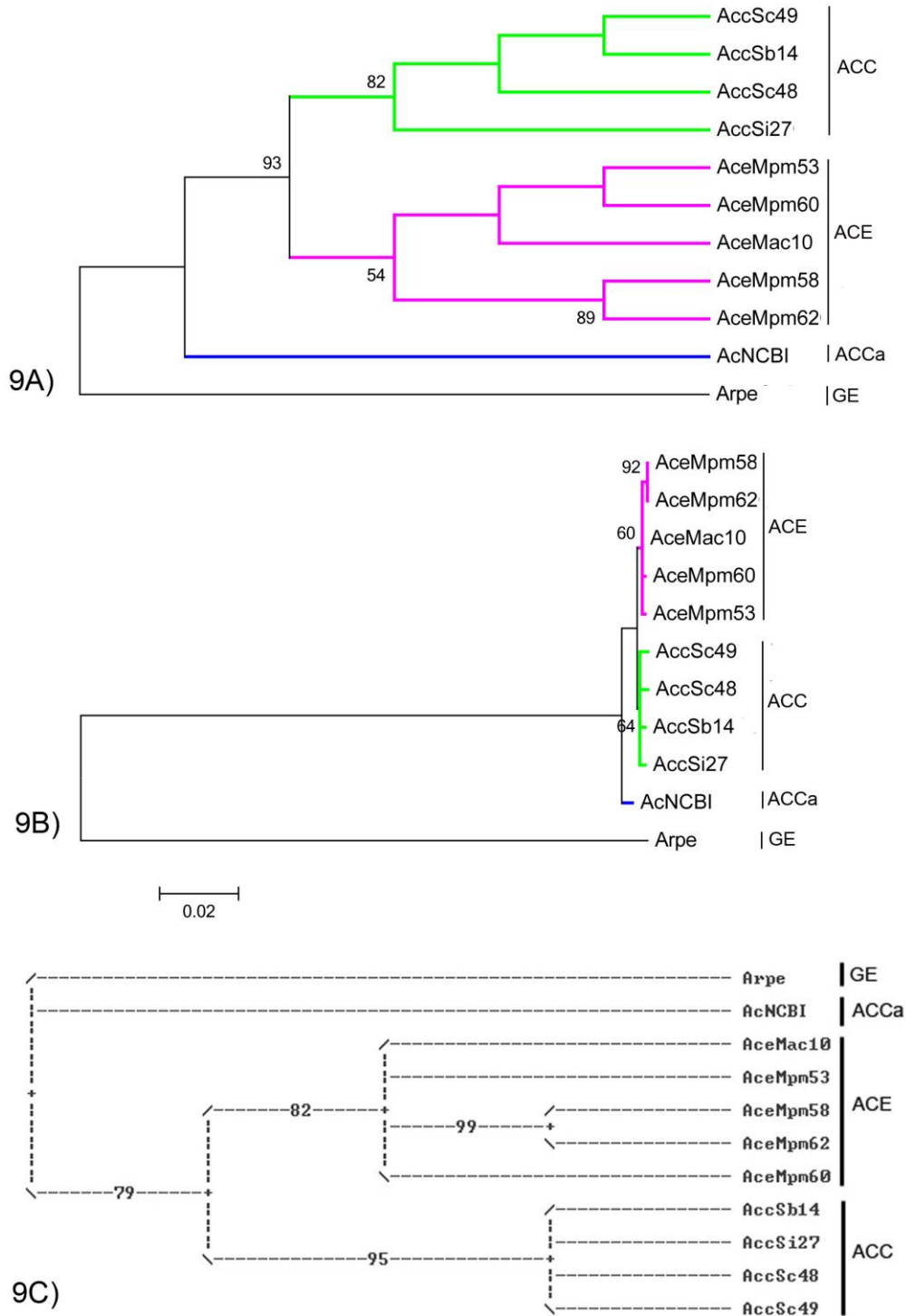


Figura 9. Relaciones filogenéticas entre subespecies de *A. canicularis* con las secuencias concatenadas (2109 pb). 9A) Árbol de Máxima Parsimonia. 9B) Árbol de Máxima Verosimilitud. 9C) Árbol bayesiano. ACC: *Aratinga canicularis clarae*; ACE: *Aratinga canicularis eburnirostrum*; ACCa: *Aratinga canicularis canicularis*; GE: Grupo externo (Arpe=*Aratinga pertinax*).

Red de haplotipos *Aratinga canicularis*.

La red de haplotipos se construyó con base en las secuencias concatenadas, en ella se puede observar la formación de tres grupos que concuerdan con la distribución geográfica de los individuos a los que pertenecen las secuencias, esta formación se presenta en todos los árboles filogenéticos construidos. No se presentan haplotipos compartidos entre individuos de las diferentes subespecies. El número de mutaciones que separa los grupos de la subespecies *A. c. clarae* y *A. c. eburnirostrum* es modesto mientras que entre el ancestro hipotético de estas dos subespecies (mv2) y la secuencia del banco de datos de NCBI asumida como *A. c. canicularis* se observan 10 mutaciones que las separan (Figura 10).

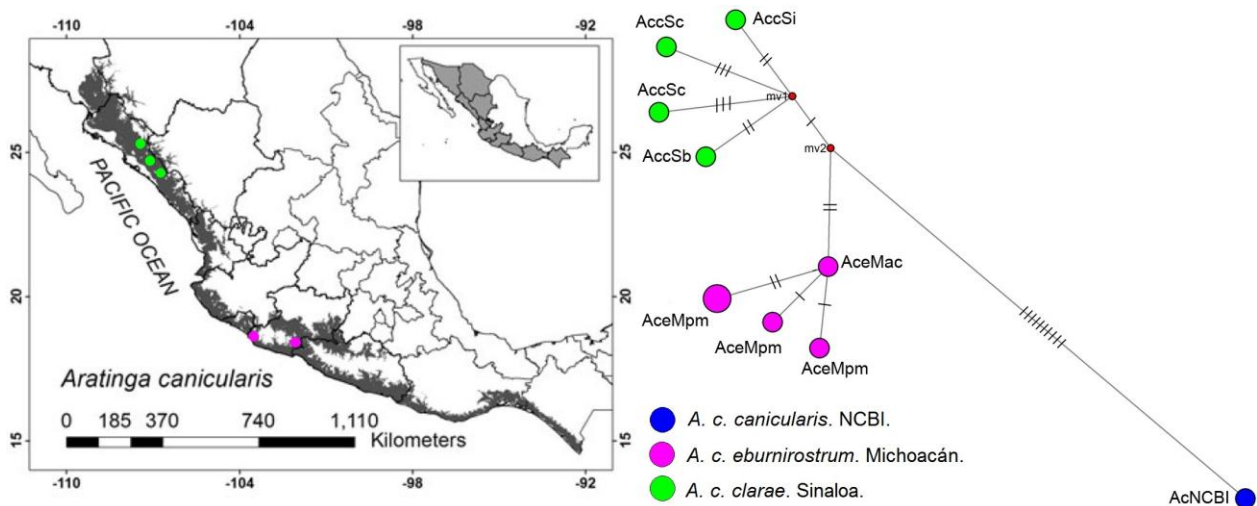
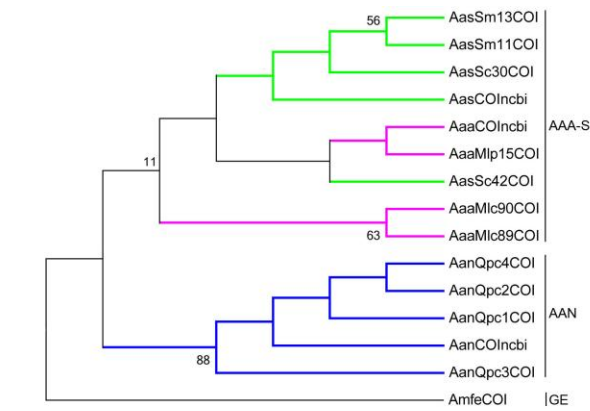


Figura 10. Red de haplotipos median-joining que muestra las relaciones entre subespecies de *Aratinga canicularis*, está basada en 2109 pb de las secuencias concatenadas de los marcadores COI, ND2 y RC. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos compartiendo el haplotipo, las líneas transversales de las ramas representan el número de mutaciones entre haplotipos; los círculos mv1-mv2 representan haplotipos hipotéticos no encontrados (posibles haplotipos ancestrales).

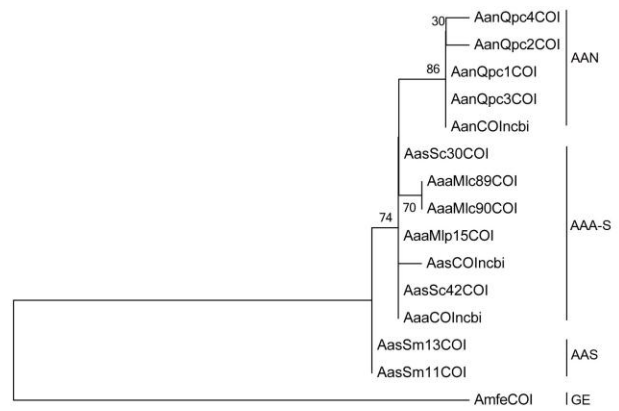
8.7. Árboles filogenéticos y red de haplotipos de *A. albifrons*.

El filograma de MP con el marcador COI agrupa en un clado (AAN) bien soportado las secuencias de los individuos *A. a. nana* donde aparecen la secuencia del banco de datos identificada para esta subespecie y las provenientes de muestras del estado de Quintana Roo. En el clado AAA-S (poco soportado por valores bootstrap) aparecen parafiléticas las secuencias de *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis*, aunque en este se pueden identificar tres subclados: AAS con secuencias de *A. a. saltuensis* (incluye la del banco de datos), el subclado AAA-S parafilético compuesto por la secuencia del banco de datos reportada para la subespecie *A. a. albifrons*, una secuencia de *A. a. albifrons* (Michoacán) y una de *A. a. saltuensis* (Sinaloa) y finalmente el subclado AAA conformado por dos secuencias de *A. a. albifrons* (Michoacán). En ML se mantiene bien soportado el clado AAN, se forma el clado AAS con 2 secuencias de *A. a. saltuensis* (Sinaloa) y parafilético el clado AAA-S con secuencias de *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis* (Figura 11). Con el marcador ND2 en MP y ML se confirma la monofilia del clado AAN, y parafilia de AAA-S (Figura 11).

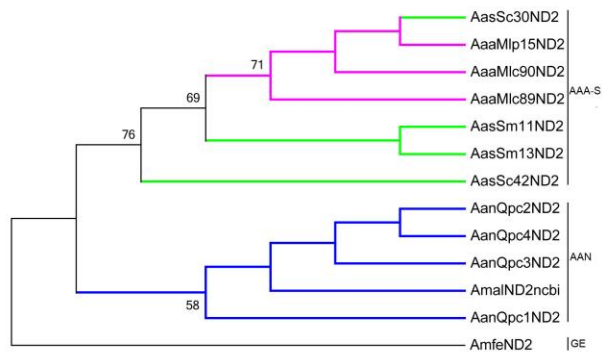
Con las secuencias concatenadas que incluyeron 1535 pb se aprecia nuevamente la formación de dos clados, uno monofilético integrado por miembros de la subespecie *A. a. nana* (Quintana-Roo) (AAN) bien soportado en los tres tipos de análisis (valores bootstrap de 80 en MP y 77 en ML, valor de credibilidad de 94 en bayesianos). El clado parafilético AAA-S está integrado por secuencias de individuos de las subespecies *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis*, aunque los valores bootstrap en esta rama no son contundentes la topología se presenta en los árboles construidos con los tres métodos (60 en MP, 61 en ML, y el valor de credibilidad en bayesianos es de 60). Algunos datos extra por destacar, son que en los tres tipos de análisis la secuencia del individuo AasSc42 (Cosalá, Sinaloa) se presenta como OTU basal del clado AAA-S, donde también se puede observar que la muestra AasSc30 está muy cercana o incluso integrada al subclado compuesto por individuos Michoacanos y que la secuencia con clave de identificación AmalNCBI es OTU basal de AAN (Figura 12).



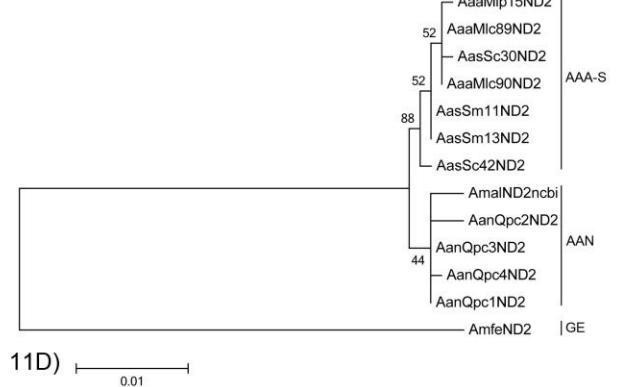
11A)



11B) 0.005



11C)



11D) 0.01

Figura 11. Relaciones filogenéticas de *Amazona albifrons*. 11A) árbol de Máxima Parsimonia con el marcador COI. 11B) árbol de Máxima verosimilitud con el marcador COI. 11C) árbol de Máxima Parsimonia con el marcador ND2. 11D) árbol de Máxima verosimilitud con el marcador ND2. AAA-S: *Amazona albifrons albifrons*-*Amazona albifrons saltuensis*; AAN: *Amazona albifrons nana*; GE: Grupo externo (Amfe= *Amazona festiva*).

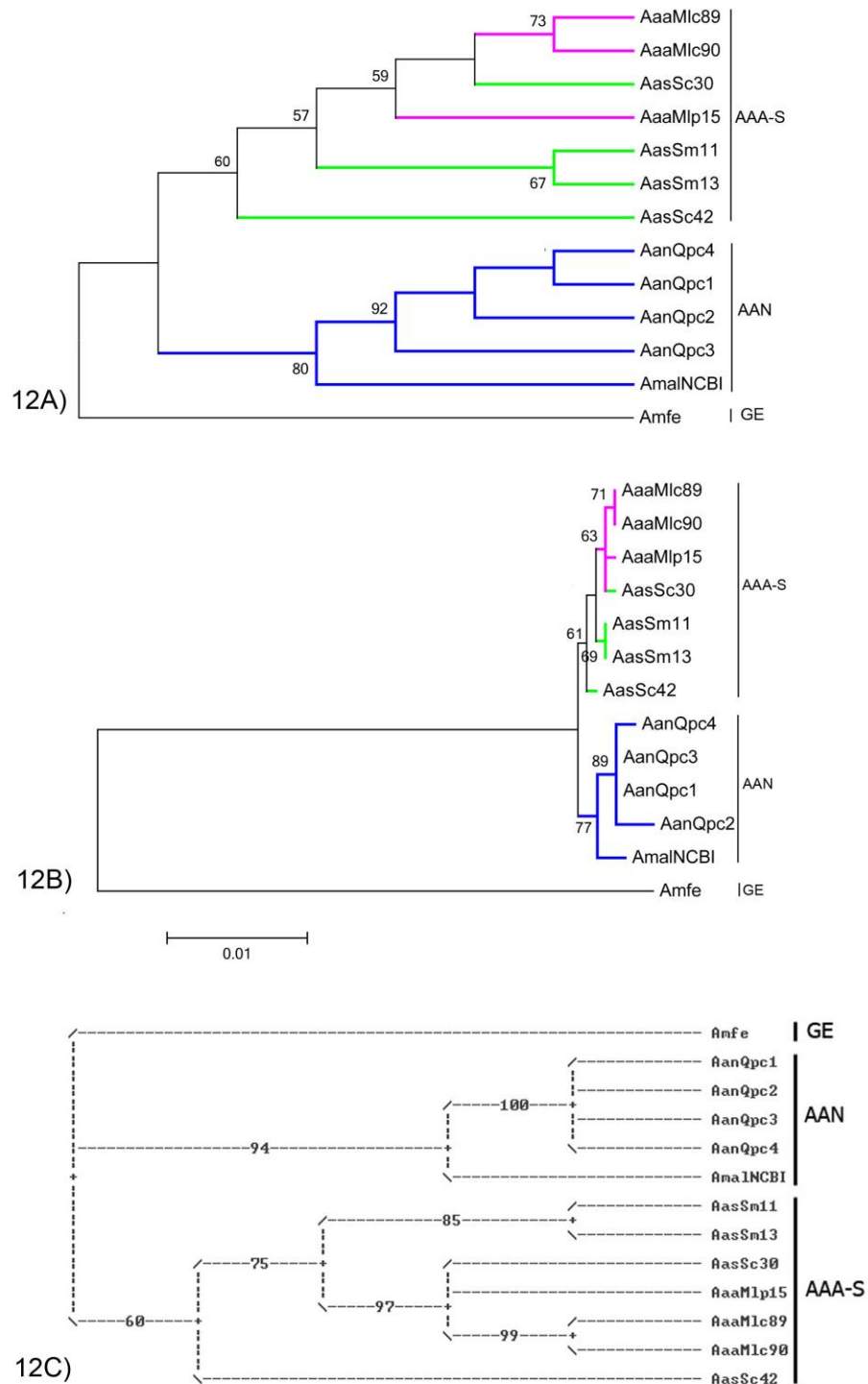


Figura 12. Relaciones filogenéticas entre subespecies de *Amazona albifrons* con las secuencias concatenadas (1535 pb). 12A) Árbol de Máxima Parsimonia. 12B) Árbol de Máxima Verosimilitud. 12C) Árbol bayesiano. AAN: *Amazona albifrons nana*; AAA-S: *Amazona albifrons albifrons*-*Amazona albifrons saltuensis*; GE: Grupo externo (Amfe= *Amazona festiva*).

Red de haplotipos *Amazona albifrons*.

Al igual que en los árboles filogenéticos, en la red de haplotipos se pueden distinguir solo dos grupos con una separación somera basada en pocas mutaciones entre ellos, los ancestros hipotéticos mv3 y mv4 que dividen las subespecies *A. a. nana* de Quintana Roo y las subespecies *A. a. saltuensis* y *A. a. albifrons* de Sinaloa y Michoacán están separadas por tres mutaciones. Existe una cercanía mayor entre haplotipos de individuos de las subespecies *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis* (4 mutaciones), que entre individuos de la subespecie *A. a. nana* de Quintana Roo y del banco de datos NCBI (5 mutaciones). Con base en la construcción de la red con las secuencias concatenadas, no se comparten haplotipos entre individuos de diferentes regiones, aunque si se comparten entre individuos de la misma región (Figura 13).

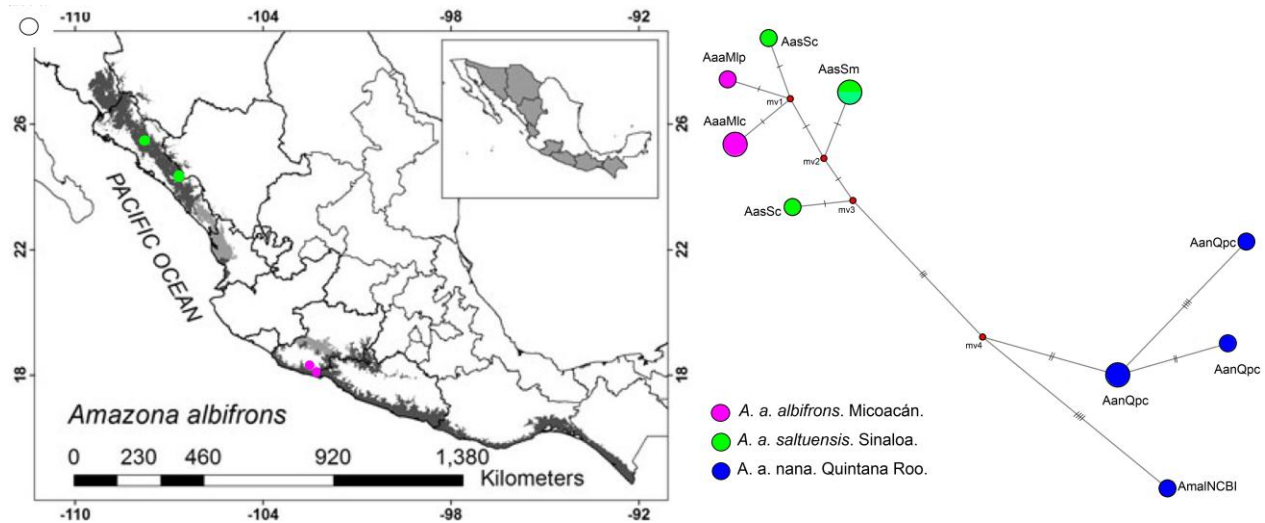


Figura 13. Red de haplotipos median-joining que muestra las relaciones entre subespecies de *Amazona albifrons*, está basada en 1535 pb de las secuencias concatenadas de los marcadores COI y ND2. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos compartiendo el haplotipo, las líneas transversales entre las ramas representan el número de mutaciones entre haplotipos; los círculos mv1-mv4 representan haplotipos hipotéticos no encontrados (posibles haplotipos ancestrales).

8.8. Árboles filogenéticos y red de haplotipos de *A. finschi*.

No fue posible construir los árboles de MP con COI y ND2, debido a la carencia de sitios parsimoniosamente informativos en ambas secuencias, en ML para estas dos regiones los árboles presentan politomías, formándose un solo clado (AF) donde se agrupan secuencias de los 4 individuos de Michoacán, 4 de Sinaloa y la secuencia del banco de datos para el caso del marcador COI. Las secuencias de la RC en MP y ML forman dos clados: el AFW monofilético integrado por 2 individuos del estado de Sinaloa (soportado con un valor bootstrap de 80 y 78 respectivamente) y AFF-W polifilético conformado por individuos de Michoacán y Sinaloa (valor bootstrap de 57 y 54) (Fig. 14).

Con las secuencias concatenadas (2159 pb) en los árboles de MP y bayesiano se forman dos clados, el clado parafilético AFF-W integrado con secuencias de los 4 ejemplares de Michoacán y 2 de Sinaloa, y el clado monofilético AFW que agrupa dos ejemplares del estado de Sinaloa (AfwSi32 y AfwSc40), aunque en MP los valores bootstrap que soportan el clado AFF-W no son confiables, en el árbol bayesiano los valores de credibilidad si lo son, 84 para este clado al igual que para el grupo AFW (Figura 15A y 15C). En el árbol de ML se forman dos clados, AFW con las 2 secuencias de los individuos del estado de Sinaloa (bootstrap de 82) y el clado AFF-W con individuos de Michoacán y Sinaloa, hay que señalar que la formación de este último subgrupo debe tomarse con cautela ya que está soportada por valores bootstrap de 55 en MP y 54 en ML (Figura 15B).

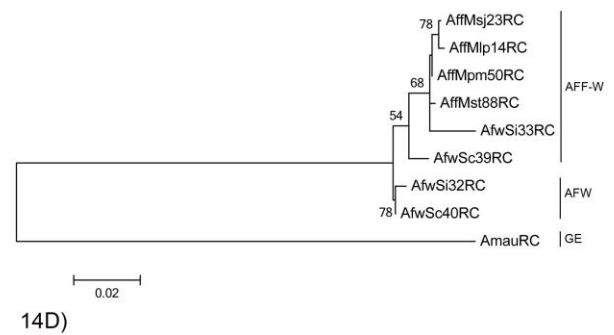
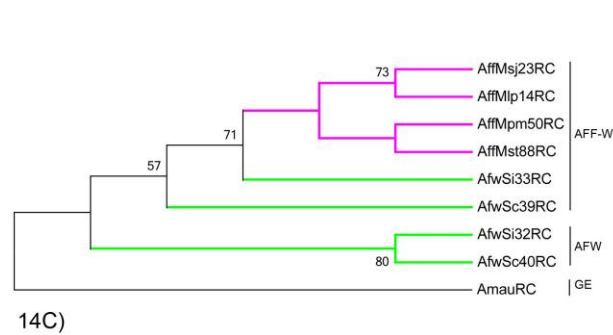
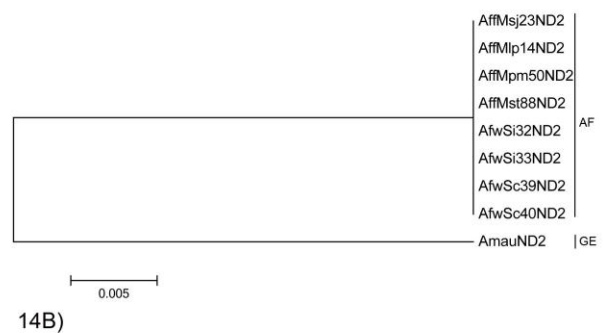
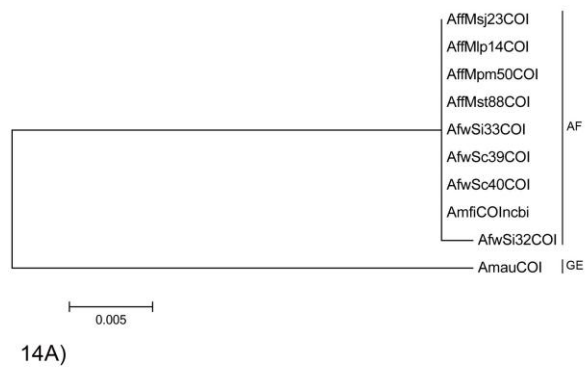


Figura 14. Árboles filogenéticos de *Amazona finschi*. 14A) Muestran el árbol de Máxima verosimilitud con el marcador COI. 14B) Muestran el árbol de Máxima verosimilitud con el marcador ND2. 14C) Árbol de Máxima Parsimonia con el marcador RC. 14D) árbol de Máxima verosimilitud con el marcador RC. AFF-W: *Amazona finschi finschi*-*Amazona finschi woodi*; AFW: *Amazona finschi woodi*; GE: Grupo externo (Amou=*Amazona autumnalis*).

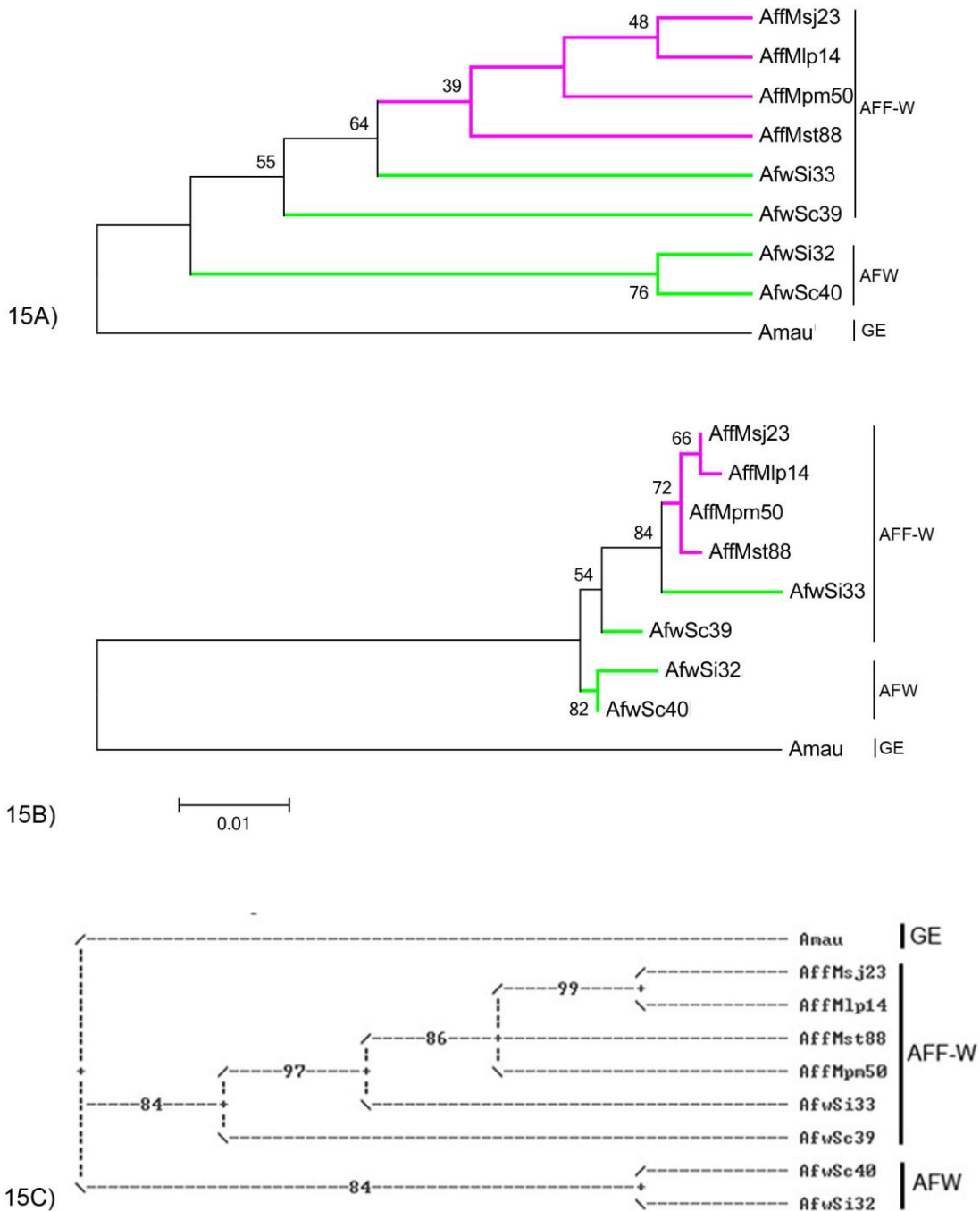


Figura 15. Relaciones filogenéticas entre subespecies de *Amazona finschi* con 2159 pb de las secuencias concatenadas. 14A) Árbol de Máxima Parsimonia. 14B) Árbol de Máxima Verosimilitud. 14C) Árbol bayesiano. AFW: *Amazona finschi woody*, AFF-W: *Amazona finschi finschi* y *Amazona finschi woody*, GE: Grupo externo (Amou= *Amazona autumnalis*).

Red de haplotipos *Amazona finschi*.

Se pueden observar tres grupos en *A. finschi*, dos en Sinaloa y uno en Michoacán. El grupo integrado por secuencias de individuos michoacanos presentan pocas mutaciones entre sus haplotipos, mientras que al parecer en Sinaloa existen dos líneas maternas divergentes, una de ellas separada de los representantes michoacanos (haplotipo hipotético -mv2-) por 6 mutaciones y la otra bajo estas mismas condiciones separada por tres mutaciones entre haplotipos hipotéticos (mv1 y mv2). No se detectaron haplotipos compartidos entre individuos de las diferentes regiones geográficas (Figura 16).

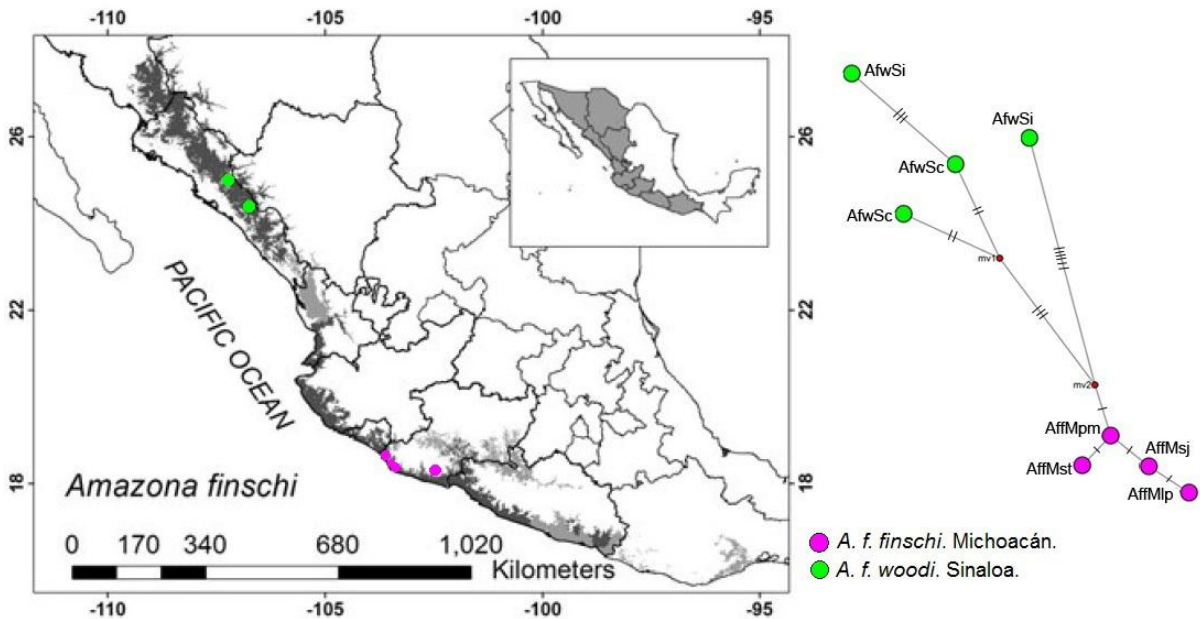


Figura 16. Red de haplotipos median-joining, muestra las relaciones entre subespecies de *Amazona finschi*, está basada en 2159 pb de las secuencias concatenadas de los marcadores COI, ND2 y RC. Las líneas transversales entre las ramas representan el número de mutaciones entre haplotipos; los círculos mv1 y mv2 representan haplotipos hipotéticos no encontrados (posibles haplotipos ancestrales).

9. DISCUSIÓN.

En este estudio se analizaron las relaciones filogenéticas subespecíficas de *Aratinga canicularis*, *Amazona finschi* y *Amazona albifrons*, se utilizaron secuencias de ADN mitocondrial (COI, ND2 y RC) obtenidas de muestras biológicas de ejemplares de campo (que corresponden a las subespecies descritas con en base en caracteres morfológicos y en la distribución de sus poblaciones en México según Forshaw, [1989]). El principal objetivo del análisis fue conocer si las subespecies formaban clados monofiléticos que correspondieran a la designación taxonómica subespecífica, para identificar ESU y con ello se contribuya al establecimiento de poblaciones prioritarias en la conservación de las especies. Los resultados muestran tres escenarios distintos:

9.1. *Aratinga canicularis*.

En las topologías de todos los árboles filogenéticos construidos bajo distintos criterios (MP, ML y bayesianos) y con diferentes marcadores (individualmente o concatenadas) se forman tres clados monofiléticos que corresponden a las tres subespecies analizadas: *A. c. canicularis*, *A. c. eburnirostrum* y *A. c. clarae* (Figuras 8 y 9), de igual manera en la red de haplotipos se puede ver que hay una estructura geográfica entre las subespecies que concuerda con la vida no migratoria de la especie (Figura 10), esta coincidencia entre la distribución geográfica de las subespecies y los polimorfismos en las secuencias de ADN se ha observado en distintas especies de aves (*Pipilo erythrophthalmus*, *Geothlypis trichas* -Ball and Avise 1992-; *Pharomachrus mocinno* - Solórzano *et al.*, 2004-; *Strix occidentalis* -Funk *et al.*, 2008-). Existen reportes de la presencia simpátrica de *A. c. eburnirostrum* y *A. c. clarae* en Michoacán (Forshaw, 1989), sin embargo, con las muestras analizadas de las localidades de Palos Mariás y Agua Cola (Michoacán) no hay evidencia de la presencia de *A. c. clarae* ya que no existen haplotipos compartidos entre estas y las muestras de localidades en Sinaloa, aunque se debe aclarar que el tamaño de la muestra no es suficiente para

tener un grado de certeza mayor de esta afirmación. Para futuros trabajos que busquen determinar si existen poblaciones simpátricas en Michoacán o si existe un grado de hibridación entre *A. c. clarae* y *A. c. eburnirostrum* se propone la ampliación de colecta en distintas poblaciones del estado y de los estados vecinos además de la aplicación de otros marcadores que permitan ampliar el número de caracteres por analizar.

Aratinga canicularis es la especie que sufre mayor explotación por su demanda en el comercio ilegal a nivel nacional (Cantú *et al.*, 2007) debido a esto es urgente analizar la estructura filogenética de la especie a lo largo de toda su distribución con la finalidad de descubrir si es que existen nuevas ESU's; en los árboles construidos se forman tres grupos monofiléticos que evidentemente representan poblaciones en divergencia, por esta razón se deben considerar tres ESU's distintas que corresponden a las tres subespecies (*A. c. canicularis*, *A. c. eburnirostrum* y *A. c. clarae*). Aunque la propuesta está basada en pocos ejemplares por subespecie y se consideran solo caracteres de ADNmt este es un principio para estudios filogeográficos posteriores que obligadamente deberán incrementar el número de muestra, los sitios de colecta y la cantidad de caracteres por analizar con la finalidad de apoyar o refutar los resultados reportados en el presente estudio.

9.2. *Amazona albifrons*.

Tanto los árboles filogenéticos como la red de haplotipos de las subespecies de *A. albifrons* muestran la formación de dos grupos, uno monofilético que corresponde a la subespecie *A. a. nana* con muestras de ejemplares del estado de Quintana Roo y otro parafilético integrado por muestras de las subespecies *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis* del estado de Michoacán y Sinaloa, este patrón coincide con el encontrado en otras especies de aves como *Garrulax chinensis* (Wu, *et al.*, 2012), *Amazona ochrocephala* (Eberhard and Bermingham, 2004) y *Amazona leucocephala* (Rusello *et al.*, 2010). La formación de esta topología en los árboles se puede atribuir a una transición desde la

polifilia hacia la monofilia en lugar de hibridación o flujo de genes, que no está sustentado porque existe una discontinuidad en la distribución de la población en el Pacífico (no hay registros de su presencia en los estados de Jalisco y Colima) y además no es una especie migratoria. En aves no es raro que en ocasiones se presenten incongruencias entre los patrones de coloración y los datos genéticos, esto quizá sea debido a la selección divergente que puede conducir a la aparición de diferencias morfológicas importantes sin que se presente una diferencia genética considerable (Dryskell, 2003; Rivas and Miyaky, 2004; Wilson *et al.*, 2011).

Con la información obtenida de los árboles filogenéticos y de la red de haplotipos en *A. albifrons* se puede establecer claramente una ESU en Quintana Roo que representa individuos de la subespecie *A. a. nana* (Figuras 12 y 13). En el caso de las subespecies *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis* no es posible determinar la separación de ESU's acordes a la determinación subespecífica porque forman un clado parafilético en los árboles construidos además de que existe una cercanía considerable entre ellas representada en la red de haplotipos (Figuras 12 y 13). Es posible que con el uso de otros marcadores mitocondriales (excepto RC que no se logró amplificar con éxito por ser una secuencia duplicada, Eberhard, *et al.*, 2001) y nucleares se encuentren diferencias que logren separar estas dos poblaciones y se logren identificar ESU's o bien plantear estrategias para la identificación de MU's.

9.3. *Amazona finschi*.

Los árboles filogenéticos basados en COI y ND2 de *Amazona finschi* forman politomías debido a que estos marcadores muestran baja o nula diversidad haplotípica (COI $Hd=0.25$ y ND2 $Hd=0$), a pesar de que los individuos provienen de localidades distantes en Michoacán y Sinaloa. Estos resultados son comparables con otros marcadores en especies cuyas poblaciones están amenazadas o en peligro de extinción como es el caso de *Vultur gryphus* (Hendrickson *et al.*, 2003), *Strix*

occidentalis (Barrowclough *et al.*, 2006) o *Pyrrhocorax pyrrhocorax* (Wenzel *et al.*, 2012). Existen reportes donde se observa una diversidad genética baja en aves (se ha observado esta tendencia donde individuos separados por una distancia geográfica considerable no tienen grandes diferencias genéticas entre subespecies -Zink *et al.*, 2000; Draheim *et al.* 2010-). Los resultados obtenidos aquí se deberán corroborar incrementando el número de muestras que abarquen los extremos de la distribución y localidades intermedias, además del uso de marcadores de ADN mitocondrial y nuclear. Si con ello se establecen con certeza las mismas condiciones reportadas, entonces se pueden mencionar algunas causas que estén originando este patrón genético. Con la información de este estudio es difícil determinar el proceso biológico que origina lo observado, puede ser un cuello de botella, un efecto fundador o que las características de la historia de vida de la especie causen que se retenga poca variabilidad genética (Frankham *et al.*, 2002). Para responder cuál es el origen de esta baja diversidad genética se deberán plantear otras estrategias y metodologías que involucren datos ecológicos, moleculares, etológicos, etc.

Con el marcador molecular RC se obtuvieron árboles que forman dos clados, uno de ellos monofilético con individuos de Sinaloa y otro parafilético integrado por individuos de Michoacán y Sinaloa, aunque en este último se puede observar la formación de un subclado donde se agrupan las secuencias de individuos Michoacanos (Figuras 14 y 15). La red de haplotipos de *A. finschi* muestra que en las localidades de Sinaloa particularmente en el municipio de Imala se encuentran dos líneas maternas divergentes separadas por 6 y 5 mutaciones de su ancestro hipotético lo que es considerable si se toma como referencia que en el grupo de individuos de Michoacán se presentan 1 o 2 mutaciones entre ellos (Figura 16).

De acuerdo con la información encontrada en *A. finschi* se propone una ESU's en la región michoacana apoyada por la formación de un subclado monofilético en los árboles filogenéticos y por la red de haplotipos (donde se muestran pocas mutaciones entre los individuos Michoacanos con respecto a los de Sinaloa). Este análisis que

revela una línea evolutiva significativa de *A. finschi* en Michoacán apoya el argumento de que la Cuenca del Balsas (Michoacán-Guerrero) es importante en el mantenimiento de la especie (Marín-Togo *et al.*, 2012). En Sinaloa se debe tener atención especial en las poblaciones de los municipios de Imala y Cosalá, ya que de acuerdo con los resultados de la red de haplotipos se encuentran dos líneas maternas divergentes (con 5 y 6 mutaciones desde el haplotipo hipotético que las conecta -mv2 en la figura 16-), si no es posible como en este caso identificar una ESU por monofilia recíproca, se puede proponer la alternativa de utilizar otros marcadores nucleares que permitan identificar Unidades de Manejo (MU, Moritz, 1994). En particular, *A. finschi* por ser endémica para México, por estar en peligro de extinción y porque su presencia se ha reducido en un 51.5% de su distribución original (Marín-Togo *et al.*, 2012), debe tener una cantidad mayor de análisis genéticos orientados a diferentes áreas como conservación, genética de poblaciones, filogeografía, etcétera, que complementen la información que se tiene de ella.

10. CONCLUSIONES

En la especie *Aratinga canicularis* se formaron tres clados monofiléticos que corresponden a las tres subespecies descritas en base a caracteres morfológicos y a su distribución: *A. c. canicularis*, *A. c. eburnirostrum* y *A. c. clarae*, tanto en los árboles filogenéticos como en la red de haplotipos se presenta una correspondencia geográfica con los agrupamientos genéticos formados. A pesar de que no se presenta una divergencia genética profunda y a que se deben tomar en cuenta otros factores para determinar una ESU, con base en la información presentada en este estudio se propone que las tres subespecies sean manejadas como ESU's por separado para fines de conservación.

La topología de los árboles filogenéticos y la red de haplotipos de *Amazona albifrons* coinciden en la formación de dos clados o grupos, en el caso de los árboles se observa un clado monofilético que corresponde a la subespecie *A. a. nana* y otro parafilético con individuos de la subespecie *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis*, lo que puede ser atribuido a una transición hacia la monofilia. La incongruencia entre los caracteres morfológicos en los que fue basada la determinación subespecífica y los caracteres moleculares presentados aquí puede ser debida a selección divergente. En el área de la conservación, con base en estos resultados se propone la subespecie *A. a. nana* como una ESU independiente mientras que para las subespecies *A. a. albifrons* y *A. a. saltuensis* se deberá iniciar un análisis de poblaciones para determinar MU's.

En *Amazona finschi* se presenta una diversidad genética baja o nula con los marcadores del ADNmt COI y ND2 en los individuos de las dos regiones analizadas, con los datos obtenidos en este estudio es difícil determinar el proceso biológico que origina el patrón que se observa, para averiguarlo se necesitarán plantear otras estrategias. Los árboles filogenéticos muestran parafilia en individuos de Michoacán y Sinaloa que puede ser debida a que las poblaciones a las que pertenecen se encuentran en un proceso de transición entre la polifilia y monofilia recíproca. En la red de haplotipos se observa la formación de un grupo integrado por secuencias de

individuos Michoacanos y otro donde se incluyen las muestras de Sinaloa en dos ramas divergentes. Tomando en cuenta el riesgo de extinción que enfrentan las poblaciones de *A. finschi* y los resultados obtenidos se propone una ESU en Michoacán y la evaluación posterior como MU's en Sinaloa.

11. LITERATURA CITADA.

- Alfaro, M. E. y Huelsenbeck, J. P. 2006. Comparative Performance of Bayesian and AIC-Based Measures of Phylogenetic Model Uncertainty. *Systematic Biology* 55 (1): 89-96.
- Astuti, D., N. Azuma, H. Suzuki and S. Higashi. 2006. Phylogenetic Relationships Within Parrots (Psittacidae) Inferred from Mitochondrial Cytochrome-b Gene Sequences. *Zoological Science* 23(2):191-198.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography*. Boston, MA: Harvard University Press.
- Avise, J. C. and W. S. Nelson. 1988. Molecular genetic relationships of the extinct dusty seaside sparrow. *Science*. 243:646-648.
- Bandelt, H. J., Forster, P. y Roehl, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1): 37-48.
- Ball, R. M. and J. C. Avise. 1992. Among avian populations and the evolutionary significance of subspecies. *The Auk*. 109(3):626-636.
- Barrowclough, G. F. J. G. Groth, L. A. Mertz, and R. J. Gutiérrez. 2006. Genetic structure of mexican spotted owl (*Strix occidentalis lucida*) populations in a fragmented landscape. *The Auk*, 123(4):1090-1102.
- Barry, P. D., and D. A. Tallmon. 2010. Genetic Differentiation of a Subspecies of Spruce Grouse (*Falcapennis Canadensis*) in an Endemism Hotspot. *The Auk* 127(3):617-625.
- Cantú-Guzmán, J.C., M. E. Sánchez-Saldaña, M. Grosselet, J. Silva-Gómez. 2007. Tráfico ilegal de pericos en México: una evaluación detallada. *Defenders of Wildlife*, Washington, D.C.
- CONANP. [ONLINE]. 2012. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas <www.conanp.gob.mx> Noviembre de 2012.
- Diario oficial de la federación. 2002. Norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001 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.
- Draheim, H. M., M.P. Miller, P. Baird, and S. M. Haig. 2010. Subspecific status and population genetic structure of least terns (*Sterna antillarum*) inferred by mitochondrial DNA control-region sequences and microsatellite DNA. *The AUK*. 127(4):807-819.

-
- Driskell, A. C., S. Pruett-Jones, K. A. Tarvin and S. Hagevik. 2003. Evolutionary relationships among blue- and black-plumaged populations of the white-winged fairy-wren (*Malurus leucopterus*). *Australian Journal of Zoology* 50(6) 581-595.
- Eberhard, J. R., T. F. Wright and E. Bermingham. 2001. Duplication and Concerted Evolution of the Mitochondrial Control Region in the Parrot Genus *Amazona*. *Mol. Biol. Evol.* 18(7):1330–1342.
- Eberhard, J. R. and E. Bermingham. 2004. Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. *The Auk* 121(2):318-332.
- Faria, P. J., N. M. R. Guedes, C. Yamashita, P. Martuscelli and C. Y. Miyaki. 2008. Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): implications for conservation. *Biodivers Conserv.* 17:765–779.
- Fitz-Simmons, N. 1997. Male marine turtles: Gene flow, philopatry and Mating systems of the green turtle *Chelonia mydas*. Tesis doctoral, Universidad de Queensland, Australia.
- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press.
- Friedmann, H., L. Griscom, and R. T. Moore. 1950. Distributional check-list of the birds of Mexico: Part 1. *Pacific Coast Avifauna* 29, 1-202. Cooper Ornithological Club.
- Forshaw, J. M. 1989. Parrots of the world. Princeton University Press. USA.
- Funk, C. W., E. D. Forsman, T. D. Mullins and S. M. Haig. 2008. Introgression and dispersal among spotted owl (*Strix occidentalis*) subspecies. *Blackwell Publishing Ltd* 1(161–171).
- Hackett, J. S. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (aves). *Molecular phylogenetics and evolution.* 5 (2): 368–382.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hasegawa, M., K. Kishino and T. Yano. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial. *DNA Journal of Molecular Evolution* 22, 160-174.

-
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270:313-321.
- Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak and C. M. Francis. 2004. Identification of Birds through DNA barcodes. *Plos Biology.* 2:1657-1663.
- Hendrickson, S. L., R. Bleiweiss, J. C. Matheus, I. Silva de Matheus, N. L. Jácome and E. Pavez. 2003. Low genetic variability in the geographically widespread andean condor. *The Condor.* 105:1–12.
- Howell S. N. G. and S. Webb. 1995. *A Guide to the birds of Mexico and Northern central America.* Oxford University Press. USA.
- IUCN.[ONLINE]. 2011.The IUCN Red List of Threatened Species 2011.2. <www.iucnredlist.org> Enero de 2012.
- Johnson, J. A., R. T. Watson and D. P. Mindell. 2005. Prioritizing species conservation: does the cape verde kite exist? *Proc. R. Soc.* 272, 1365-1371.
- Kerr, K. C. R., M. Y. Stoeckle, C. J. Dove, L. A. Weigt, C. M Francis and D. N. Hebert. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology.* Primer Note 1-9.
- Kerr, K. C. R., D. A. Lijtmaer, A. S. Barreira, P. D. N. Hebert and P. L. Tubaro. 2009. Probing Evolutionary Patterns in Neotropical Birds through DNA Barcodes. *Plos One.* 4(2):1-6.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- Kirchman, J.J., E. E. Schirtzinger, and T. F. Wright. 2012. Phylogenetic relationships of the extinct Carolina Parakeet (*Conuropsis carolinensis*) inferred from DNA sequence Data. *The Auk* 129(2):197–204.
- Kumar S. and M. L. Blaxter, 2010. Comparing de novo assemblers for 454 transcriptome data. *Genomics.* 11:571
- Librado, P., and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 1451-1452
- Marín-Togo, M. C., T. C. Monterrubio-Rico, K. Renton, Y. Rubio-Rocha, C. Macías-Caballero, J. M. Ortega-Rodríguez, R. Cancino-Murillo. 2012. Reduced current distribution of Psittacidae on the Mexican Pacific coast: potential impacts of habitat loss and capture for trade. *Biodivers Conserv.* 21:451-473.

-
- Mayr, E. and P. D. Ashlock. 1991. Principles of systematic zoology. 2a Ed. McGraw-Hill. USA.
- Mayr, G. 2010. Parrot interrelationships-morphology and the new molecular phylogenies. *Emu*. 110: 348–357.
- Moore R. T. 1937a. Four new birds from northwestern Mexico. *Proceedings of The Biological Society of Washington*. 50: 95-102.
- Moore r. T. 1937b. A new race of Finsch's Parrot. *Auk*, 54: 528-529.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 9:373-375.
- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice, G. Grabowski. 2002. The simple fool's guide to PCR. Hawaii University.
- Phillimore, A. B. and I. P. F. Owens. 2006. Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proc. R. Soc. B*. 372, 1049-1053
- Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Renton, K. 1998. Reproductive ecology and conservation of the Lilac-crowned Parrot (*Amazona finschi*) in Jalisco, Mexico. Ph.D. Thesis. University of Kent, Canterbury.
- Renton, K. 2001. Lilac-crowned Parrot diet and food resource availability: resource tracking by a parrot seed predator. *Condor* 103: 62-69
- Renton, K. 2002. Influence of environmental variability on the growth of Lilac-crowned Parrot nestlings. *Ibis* 144: 331-339.
- Renton, K. and A. Salinas-Melgoza. 1999. Nesting behavior of the Lilac-crowned Parrot. *Wilson Bulletin*. 111:488–493.
- Renton, K. y E. E. Iñigo Elías. 2003. Evaluación del estado de conservación de las poblaciones de loro corona lila (*Amazona finschi*) en México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto No. AS001. México D. F. Proyecto No. AS001. México D. F.
- Ribas, C. C. and C. Y. Miyaki. 2004. Molecular systematics in Aratinga parakeets: species limits and historical biogeography in the 'solstitialis' group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:663-675.

-
- Ribas, C. C., R. Gaban-Lima, C. Y. Miyaki and J. Cracraft. 2005. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography*. 1-19.
- Ribas, C. C., C. Y. Miyaki and J. Cracraft. 2009. Phylogenetic relationships, diversification and biogeography in Neotropical *Brotogeris* parakeets. *Journal of Biogeography* 36, 1712–1729.
- Ronquist, F. R., and J. P. H. Huelsenbeck. 2003. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Russello M. A. and G. Amato. 2004. A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. *Molecular Phylogenetics and evolution*. 30:421-437.
- Russello, M.A., C. Stahala, D. Lalonde, K. L. Schmidt and G. Amato. 2010. Cryptic diversity and conservation units in the Bahama parrot. *Conserv Genet*. 11:1809-1821.
- Salinas Melgoza, A. 1999. Elementos biológicos de la reproducción del loro corona lila (*Amazona finschi* Sclater 1864) en la costa de Jalisco, México. Tesis. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.
- Sánchez-Martínez T. C. and K. Renton. 2009. Availability and selection of arboreal termitaria as nest-sites by Orange-fronted Parakeets *Aratinga canicularis* in conserved and modified landscapes in Mexico. *Ibis*.151:311–320
- Sambrook, J. and D.W. Russell, 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 74: 5463-5467.
- Solórzano, S., A. J. Barker and K. Oyama. 2004. Conservation priorities for resplendent quetzals based on analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *The condor*. 106:449-456.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics* 6, 461-464.
- Swofford, D. L. 2002. *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and related methods)*, version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

-
- Tamura, K., and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512-526.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *Some mathematical questions in biology - DNA sequence analysis* (ed. Miura RM), pp. 57-86. Amer. Math. Soc., Providence, RI.
- Tavares, E. S., C. Yamashita, and C. Y. Miyaki. 2004. Phylogenetic Relationships among some neotropical parrot genera (psittacidae) based on mitochondrial Sequences. *The Auk*. 121(1):230-242.
- Tavares, E. S., A. J. Baker, S. L. Pereira, and C. Y. Miyaki. 2006. Phylogenetic Relationships and Historical Biogeography of Neotropical Parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) Inferred from Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences. *Systematic Biology*. 55(3):454 -470.
- Wenner, T. J., M. A. Russello, T. F. Wright. 2012. Cryptic species in a Neotropical parrot: genetic variation within the *Amazona farinosa* species complex and its conservation implications. *Conserv Genet*. 13:1427–1432.
- Wenzel M. A., L. M. I. Webster, G. Blanco, M. D. Burgess, C. Kerbiriou, G. Segelbacher, S. B. Pieltne and J. M. Reid. 2012. Pronounced genetic structure and low genetic diversity in European red-billed chough (*Pyrrhocorax pyrrhocorax*) populations. *Conserv Genet*. 13:1213–1230.
- Wiens, J. A. 1982. Forum: Avian Subspecies in the 1980's. *The AUK*. 99:593-615.
- Wilson, R. E., M. D. Eaton, S. A. Sonsthagen, J. L. Peters, K. P. Johnson, B. Simarra and K. G. McCracken. 2011. Speciation, Subspecies Divergence, and Paraphyly in the Cinnamon Teal and Blue-Winged Teal. *The Condor*, 113(4):747-761.
- Wright, T. F., E. E. Schirtzinger, T. Matsumoto, J. R. Eberhard, G. R. Graves, J.J. Sanchez, S. Capelli, H. Müller, J. Scharpegge, G. K. Chambers and R. C. Fleischer. 2008. A Multilocus Molecular Phylogeny of the Parrots (Psittaciformes): Support for a Gondwanan Origin during the Cretaceous. *Mol. Biol. Evol.* 25(10):2141-2156.
- Wu, Y., J. Huang, M. Zhang, S. Luo, Y. Zhang, F. Lei, F. H. Sheldon, F. Zou. 2012. Genetic divergence and population demography of the Hainan endemic Black-throated Laughingthrush (Aves: Timaliidae, *Garrulax chinensis monachus*) and

-
- adjacent mainland subspecies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 65:482–489.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput Biol.* 7(1-2):203-14.
- Zink, R. M., G. F. Barrowclough, J. L. Atwood, R. C. Blackwell-Rago. 2000. Genetics, Taxonomy, and Conservation of the Threatened California Gnatcatcher. *Conservation Biology*. 14 (5):1394–1405.
- 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., J. D. Rising, S. Mockford, A. Horn, J. M. Wright, M. Leonard and M. C. Westeberg. 2005. Mitochondrial DNA variation, species limits, and rapid evolution of plumage coloration and size in the savanh sparrow. *The Condor*. 107:21-28.