



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

BioTécnica
Análisis Moleculares

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

INFORME DE TRABAJO
FINAL DE GRADUACIÓN

**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN UNA
POBLACIÓN CAUTIVA DE LAPAS VERDES (*Ara ambigua*, Bechstein)
MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES**

María Fernanda Herrero Fernández

BioTécnica Análisis Moleculares

Firma asesor de empresa o institución
Ing. Walter Solano Sánchez

Firma del profesor asesor ITCR
Prof. Giovanni Garro Monge

Cartago, 2006.

**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN UNA
POBLACIÓN CAUTIVA DE LAPAS VERDES (*Ara ambigua*) MEDIANTE
LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**MSc. Giovanni Garro Monge,
Profesor Asesor-ITCR**

**Ing. Walter Solano Sánchez,
Asesor-Empresa**

**Dr. Kenneth Madriz Ordeñana,
Lector**

DEDICATORIA

Todo mi esfuerzo y trabajo se lo dedico a mis papás y a mis hermanos. Los quiero mucho, muchas gracias por su apoyo incondicional.

M. Fernanda.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación no se hubiera podido llevar a cabo sin la generosa colaboración de muchas personas y organizaciones, a quienes expreso mi agradecimiento a continuación.

Al Parque de Conservación y Vida Silvestre ZooAve, en particular a su colaborador el Ing. Raúl Fournier por el respaldo e interés demostrado para la realización del proyecto.

A la Dr. Mónica List por llevar a cabo la toma de sangre de las aves.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y a la Comisión de Incentivos y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por brindar el financiamiento que hizo posible concretar este estudio.

A la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) por conceder los permisos de acceso a la biodiversidad.

A Pamela Álvarez por su asistencia en el proceso de sexado de las lapas.

Al Dr. Kenneth Madriz y al Ing. Walter Solano por su excelente trato durante mi estancia en el laboratorio de BioTécnica Análisis Moleculares y por su valiosa guía y consejo durante el proceso.

A los profesores Giovanni Garro y Eric Hernández por la gran ayuda que me brindaron.

Por último, agradezco a mis padres, hermanos y amigos por el constante apoyo y estímulo que me dieron durante todo este tiempo. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	5
INDICE DE CUADROS	7
INDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE ANEXOS	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
RESUMEN	11
1 INTRODUCCIÓN	12
2 REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 Conservación de la Biodiversidad	15
2.2 Conservación de especies en cautiverio	16
2.3 Conservación de Ara ambigua	16
2.4 Parque de Conservación y Vida Silvestre Zoo Ave	18
2.5 Información General sobre la lapa verde (Ara ambigua).....	19
2.5.1 Taxonomía	19
2.5.2 Fenotipo	20
2.5.3 Hábitat.....	21
2.5.4 Reproducción	21
2.5.5 Alimentación.....	22
2.6 Distribución en el mundo y en Costa Rica.....	22
2.7 Conceptos	23
2.8 Análisis del ADN como herramienta de conservación.....	24
2.9 Técnicas moleculares.....	25
2.9.1 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los marcadores moleculares	25
2.10 Análisis Estadísticos.....	31
2.10.1 Medidas de diversidad genética.....	31
2.10.2 Agrupación o <i>clustering</i> para visualizar las relaciones.....	32

2.11	Determinación del sexo en aves	33
2.11.1	Técnicas de Sexado en Aves.....	33
3	MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1	Muestreo de aves en cautiverio.....	36
3.2	Extracción de ADN genómico.....	36
3.3	Aplicación de marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética entre las lapas.	36
3.3.1	PCR.....	37
3.3.2	Electroforesis en gel de Agarosa al 1%.....	38
3.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	39
3.4	Análisis de datos	39
3.5	Determinación del sexo mediante ADN.....	39
3.5.1	Electroforesis	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Aplicación de marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética entre las lapas	42
4.2	Determinación del sexo por ADN	50
5	DISCUSIÓN	52
6	CONCLUSIONES	60
7	RECOMENDACIONES	61
8	ANEXOS	62
9	LITERATURA CITADA	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Información taxonómica sobre la lapa verde.....	20
Cuadro 2. Información sobre los imprimadores utilizados para llevar a cabo los PCR's de variabilidad.....	37
Cuadro 3. Composición de la mezcla de reacción utilizada para realizar el PCR para el estudio de variabilidad genética de las lapas.....	38
Cuadro 4. Ciclos utilizados en el termociclador para llevar a cabo los PCR de variabilidad.....	38
Cuadro 5. Composición de la mezcla de reacción utilizada para realizar la PCR de sexado de las lapas verdes.....	40
Cuadro 6. Ciclos utilizados en el termociclador para llevar a cabo los PCR de sexado.....	41
Cuadro 7. Alelos para cada uno de los <i>loci</i> analizados presentes en cada una de las lapas verdes.....	44
Cuadro 8. Información sobre la heterocigosidad para cada <i>locus</i> analizado.....	48
Cuadro 9. Promedio para los cuatro <i>loci</i> analizados de algunos de los valores obtenidos durante el análisis y su error estándar.....	48
Cuadro 10. Resultado del sexado de las 32 lapas verdes y su distribución en el ZooAve.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de una lapa verde en la que se puede apreciar claramente su fenotipo.....	21
Figura 2. Área de distribución geográfica de <i>Ara ambigua</i> en el territorio costarricense..	23
Figura 3. Esquema del proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	26
Figura 4. Gel Poliacrilamida 4% con la PCR realizada con el marcador CT74 y CT21.....	43
Figura 5. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el <i>locus</i> CT74..	45
Figura 6. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el <i>locus</i> CT21..	46
Figura 7. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el <i>locus</i> CT43..	46
Figura 8. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el <i>locus</i> CT55..	47
Figura 9. Representación gráfica de las frecuencias alélicas de cada uno de los <i>loci</i> analizados ..	47
Figura 10. Dendrograma tipo UPGMA de la relación genética entre las 32 lapas verdes, <i>Ara ararauna</i> (AR) y <i>Amazona autumnalis</i> (AM), determinada con 4 microsatélites.....	49
Figura 11. Visualización de los productos de un PCR de sexado en un gel de Agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.....	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografía de una lapa verde en su nido.....	62
Anexo 2. Fotografía de dos lapas verdes.	62
Anexo 3. Fotografía del árbol de <i>Dipterix panamensis</i>	63

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la variabilidad genética existente en la población cautiva de lapas verdes (*Ara ambigua*) en el ZooAve mediante el uso de microsatélites.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar las condiciones de PCR para cada microsatélite de manera que se puedan obtener datos informativos sobre la variabilidad genética de los individuos.
- Determinar el sexo de cada una de las aves mediante el análisis de su ADN.
- Proponer criterios científicos para el desarrollo de un plan de conservación de la lapa de acuerdo con los resultados obtenidos durante la realización del proyecto.

**EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN UNA
POBLACIÓN CAUTIVA DE LAPAS VERDES (*Ara ambigua*, Bechstein)
MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES**

María Fernanda Herrero Fernández*

RESUMEN

*La lapa verde (*Ara ambigua*, Bechstein) es una de las especies de Psitácidos amenazadas de Costa Rica. Dada esta alarmante situación es necesario diseñar planes de conservación de la especie. Al respecto, el Parque de Conservación y Vida Silvestre ZooAve desde 1994 ha establecido un programa de crianza de aves en cautiverio. En la presente investigación se utilizó la técnica de análisis de ADN con microsatélites para determinar la variabilidad genética entre 32 lapas verdes cautivas en dicho parque. Se encontró que este grupo de aves posee una diversidad genética significativa lo que se refleja en la alta heterocigosidad que presentó, y que los loci CT74 y GT55 son los más polimórficos de los cuatro que se analizaron. Por tanto, las lapas verdes cautivas en el Zoo Ave podrían ser de gran utilidad para futuros programas de conservación de la especie.*

Palabras clave: *Ara ambigua*, Psitácidos, microsatélites, variabilidad genética, loci.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

1 INTRODUCCIÓN

La lapa verde (*Ara ambigua*, Bechstein) es una de las especies pertenecientes a la familia de los Psitácidos o loros. En Costa Rica se encuentra en peligro de extinción, debido a la destrucción de su entorno y al robo de los pichones para venderlos como mascotas. Según Fortino y Morrone (1997) el anidamiento y la alimentación de esta especie depende altamente del árbol de almendro (*Dipteryx panamensis*).

La tala indiscriminada del almendro, ha traído como consecuencia que la población de *Ara ambigua* sea fragmentada y aislada en la naturaleza, lo que causa que los individuos tengan dificultad para hallar parejas reproductivas (Fortino y Morrone, 1997).

Generalmente, el hábitat de esta especie se encuentra limitada a tierras bajas húmedas. En Costa Rica limita su anidamiento a la Zona Huetar Norte, concretamente entre los ríos San Carlos, San Juan, Sarapiquí y las faldas del norte de la Cordillera Volcánica Central (Chassot y Monge, 2002).

De acuerdo con un estudio realizado por Chassot y Monge (2002), se determinó que el área de distribución de la lapa verde en Costa Rica se ha reducido en un 90% desde principios del siglo XX, por lo que podría desaparecer dentro de unos años si no se toman medidas para su conservación. En el mismo estudio se comprobó que para que una población de lapas sea viable debe estar conformada por un mínimo de 50 parejas con capacidad reproductiva. Por debajo de esta cifra, la población no cuenta con la diversidad genética necesaria para mantenerse en buenas condiciones.

Por esta razón la intervención humana es vital para crear un plan de conservación de las especies y evitar en la medida de lo posible la consanguinidad entre estas, sobre todo cuando están siendo criadas en cautiverio, ya que cuando

este fenómeno se presenta la tasa de mortalidad de las crías es de seis a siete veces mayor que la normal (Fortino y Morrone, 1997).

Algunos de los problemas a corto plazo que se pueden presentar si existiera un alto índice de consanguinidad entre individuos se observan en la salud física, en la reducción del mantenimiento del vigor y la fecundidad. A largo plazo, también se dan problemas con la pérdida del vigor y con la adaptabilidad evolutiva de una población frente a un medio ambiente cambiante. Por estas razones es importante evitar al máximo este fenómeno en la población de *A. ambigua*, de forma que al liberarlas tengan la capacidad de sobrevivir y reproducirse (Fortino y Morrone, 1998).

A partir de 1994, el Parque de Conservación y Vida Silvestre Zoo Ave, ubicado en la Garita de Alajuela, ha establecido un programa de crianza de aves en cautiverio. Las aves cautivas fueron confiscadas por el Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE) y se utilizan como reproductores para la posterior liberación de las crías en zonas protegidas. En lo que se refiere a lapa verde, cuenta con una población de 32 individuos que se utilizan en dicho programa de reproducción.

Sin embargo, en torno a la crianza de especies en cautiverio existe mucha polémica, principalmente sobre la utilidad de la reproducción y reintroducción de individuos con fines de conservación. Se cuestiona el alto costo de mantenimiento, la aparición de enfermedades contagiosas graves (que pueden estar en dormancia por mucho tiempo, principalmente en psitácidos) y en algunos casos el poco éxito de la liberación (Brightsmith *et al.* 2006).

En la presente investigación se pretende estimar la relación genética en una población cautiva de 32 lapas verdes del ZooAve para poder recomendar un plan de liberación adecuado para su sobrevivencia en el medio natural.

Para estimar la variabilidad genética, se aplicó una metodología basada en el análisis de ADN con marcadores moleculares tipo microsatélites, la cual fue

implementada en el laboratorio de BioTécnica Análisis Moleculares. Adicionalmente se determinará el sexo de éstas aves mediante análisis de ADN.

La técnica del sexado de aves mediante ADN es de gran importancia ya que mediante características morfológicas externas resulta muy difícil determinar el sexo de algunas aves y los otros métodos existentes las someten a manipulaciones riesgosas e invasivas que pueden causarles la muerte (Cortés, 2001). De manera que es importante aplicar un método que no las dañe o les cause estrés, especialmente si están en peligro de extinción, como lo es el caso de la lapa verde.

Además, conocer el sexo de cada uno de los individuos perteneciente a una población cautiva y las posibles parejas reproductivas es esencial para el éxito de los programas de crianza y reintroducción (Rusello y Amato, 2001).

Debido al carácter ecológico y conservacionista del presente proyecto, este tendrá un impacto positivo en la sociedad costarricense y en la biodiversidad del país. Se beneficiarán las actividades económicas relacionadas con el turismo ecológico, debido a que la lapa verde es uno de los principales atractivos de la fauna de Costa Rica.

Asimismo, mediante técnicas de caracterización genética y de Biología Molecular, es posible llevar a cabo estimaciones certeras sobre la variabilidad genética de las especies. De esta manera se pueden crear planes de reproducción partir de datos confiables sobre su parentesco, minimizando los niveles de consanguinidad y por lo tanto la tasa de mortalidad en su ambiente natural.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Conservación de la Biodiversidad

A partir de 1992, luego de la Cumbre de la Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo que se realizó en Brasil, Río de Janeiro, se ha dado una tendencia hacia la conservación de la biodiversidad genética con la que cuenta nuestro planeta (Aranguren y Jordana, 2001).

Este tema es de especial interés por varias razones, entre ellas porque la diversidad es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones, ya que les da capacidad de adaptación ante distintos ambientes, que algunas veces pueden ser desfavorables. Además, con la conservación de especies se preserva el patrimonio genético de una región, y con el estudio de variedades particulares se puede llegar a detectar genes únicos que en algún momento podrían llegar a ser de alguna utilidad para estas poblaciones (Aranguren y Jordana, 2001).

Por lo tanto, con los programas de conservación se persigue mantener la máxima cantidad de variabilidad genética. Esta se define como la habilidad genética para variar o la variación de los genes dentro de cada especie, con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación (Aranguren y Jordana, 2001).

Es importante que las especies que se quieran conservar presenten algunas características, como que brinden protección a muchas otras especies que comparten el mismo hábitat (efecto sombrilla), que hayan sido bastante investigadas y que atraigan la atención de fuentes de financiamiento, lo cual se da en muchos casos si la especie se encuentra en peligro de extinción (Chaves, 2004).

2.2 Conservación de especies en cautiverio

Generalmente, los animales en cautiverio se desarrollan pobremente en comparación con los individuos que se encuentran en estado silvestre, lo que afecta la adaptabilidad de los primeros en la naturaleza y por lo tanto su tasa de sobrevivencia (Brightsmith *et al.* 2003).

Al tener una pequeña población confinada en un área relativamente reducida, es prácticamente inevitable que se den apareamientos entre individuos emparentados, lo que conlleva a un incremento de la consanguinidad (homocigosis). En las poblaciones endogámicas se incrementa la susceptibilidad a patógenos y disminuye la capacidad de sobrevivir frente a cambios ambientales. De ahí la importancia de que la diversidad genética presente en una población sea considerada en planes de conservación para evitar su extinción (Nader *et al.* 1999).

Para evitar la depresión por consanguinidad en este tipo de poblaciones, sería ideal contar con los registros genealógicos de los individuos que la conforman para poder crear un plan de reproducción adecuado, pero la mayoría de las veces no se cuenta con este tipo de información. Por esta razón se deben implementar otras estrategias, como lo son los análisis genéticos a través del uso de marcadores moleculares para estimar de una manera confiable la diversidad genética entre los individuos de interés (Aranguren y Jordana, 2001).

2.3 Conservación de Ara ambigua

La lapa verde se encuentra en el apéndice I de CITES¹, por lo que está declarada en peligro de extinción. En nuestro país, la lapa verde es considerada como una especie en peligro de extinción según el Decreto No. 26435-MINAE publicado en La Gaceta No. 233 del 3 de diciembre de 1997 (Madriz, 2004).

¹ Por sus siglas en inglés: "Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna". Convención Internacional para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre.

En los últimos años el área de distribución de la población de la *A. ambigua* en Costa Rica se ha reducido en un 90%. De acuerdo con los estudios realizados por el Proyecto de Investigación y Conservación de la Lapa Verde en la Zona Norte, en nuestro país quedaba una población reproductiva de 25-35 parejas en el 2003 para un total de 200 lapas en la naturaleza. Esta situación se ha dado principalmente por la destrucción de su entorno, ya que la causa principal de su desaparición es la tala indiscriminada del almendro (Fortino y Morrone, 1997).

Por lo tanto, la protección del hábitat de la lapa verde la beneficiará a ella y a una multitud de otras especies, ejerciendo así lo que los biólogos llaman el efecto sombrilla. Este consiste en que ante la falta de conocimiento sobre los requerimientos de la mayoría de especies, falta de financiamiento, y la necesidad de actuar rápido, se diseña una estrategia de conservación enfocada en una especie en la que al menos se conocen sus requerimientos básicos de hábitat, como lo es caso de *A. ambigua* (Chassot y Monge 2002; Chaves, 2004).

En Costa Rica, como una estrategia de conservación para rescatar la población remanente de esta especie, se ha venido consolidando lo que es el Corredor Biológico San Juan-La Selva, cuyo Comité Ejecutivo propuso el establecimiento del Parque Nacional Maquenque en el área prioritaria de la lapa verde (30000 ha), y la aplicación de un Pago de Servicios Ambientales (PSA) rentable para la protección absoluta del bosque afuera del parque propuesto (Chassot y Monge, 2002; INBio, 2004).

La sobrevivencia de la lapa verde depende únicamente de la disponibilidad de un hábitat adecuado e intacto, por lo tanto esta población no se recuperará si no se frena la deforestación y el aprovechamiento forestal en la Zona Norte. Los bosques que son hábitat crítico para la supervivencia de la lapa verde se encuentran altamente amenazados, por lo que se debe iniciar el desarrollo de un plan de conservación capaz de proteger el entorno necesario para mantener una pequeña población reproductiva en Costa Rica (Chassot y Monge, 2002).

De esta forma, al promover un desarrollo sostenible de la Zona Norte se favorece la conservación de *A. ambigua*. Es importante incitar a los finqueros a que exploten de manera sostenible el bosque mediante actividades alternas como extracción de productos no maderables (plantas medicinales, frutas y semillas) y apoyar las iniciativas de reforestación con especies nativas maderables que beneficien a la lapa verde, a través de un Pago de Servicio Ambiental económicamente favorable para estos tipos de proyectos (Chassot y Monge, 2002).

Sin embargo, también es importante tomar en cuenta otros factores a la hora de la conservación de la lapa. Brightsmith *et al.* (2003) indican que la familia Psittacidae, a la cual pertenece *A. ambigua*, contiene la más alta proporción de especies en peligro de extinción que ninguna otra familia grande de aves y que los loros son susceptibles a una gran variedad de enfermedades letales y contagiosas, las cuales se pueden expresar hasta edades avanzadas de los individuos, de manera que pueden pasar varios años sin que sean detectadas.

2.4 Parque de Conservación y Vida Silvestre Zoo Ave

Este parque queda ubicado en la Garita de Alajuela, y su misión es promover la culturización ambiental y educar a la gente acerca de la importancia de la vida silvestre costarricense dentro de los ecosistemas tropicales y su papel vital en el medio ambiente global (Zoo Ave, 2006).

Dentro del mismo parque se encuentra el Centro de Rescate de Vida Silvestre Tropical (CRVST) y el Centro de Reproducción de Especies en Vías de Extinción (CRAVE). El primero recibe, atiende, rehabilita y reintegra a su hábitat a animales silvestres heridos, huérfanos o que han sido objeto de cautiverio o maltrato por parte de las personas. El segundo se dedica a la reproducción en cautiverio de especies en peligro de extinción, con el propósito de liberar a los animales nacidos en cautiverio en zonas donde desaparecieron o están a punto de extinguirse a causa de la intervención humana (Zoo Ave, 2006).

Uno de los proyectos del Zoo Ave es el de Reintroducción de la Lapa Roja (*Ara macao*) en el Parque Nacional Piedras Blancas, cuyo objetivo principal es establecer una nueva población de lapas rojas en Costa Rica, que junto con las poblaciones naturales conformarían en el futuro tres poblaciones de importancia significativa en el país (Zoo Ave, 2006).

Las lapas que se liberan nacen en cautiverio en el CRAVE, y el pie de cría es de origen nacional y proviene de decomisos efectuados por el Ministerio de Ambiente y Energía y de donaciones hechas por particulares. Con esta población se había llevado a cabo un análisis de variabilidad mediante microsatélites en el laboratorio BioTécnica Análisis Moleculares. Los datos aportados por este estudio indicaron que esta metodología es de gran utilidad para la determinación de la diversidad genética de *A. macao*. Con estos datos es posible dirigir con un criterio más preciso el diseño de programas de crianza y cautiverio para evitar homogeneidad en las poblaciones naturales (Arias *et al.* 2005).

El Zoo Ave también cuenta con una población cautiva de lapa verde a partir de la cual pretende establecer una nueva población en nuestro país con el fin de evitar la extinción de la especie. La metodología utilizada para estimar la diversidad genética de la lapa roja fue la misma que se aplicó para realizar el presente estudio de la población de lapa verde, la cual se explica en detalle posteriormente (Zoo Ave, 2006).

2.5 Información General sobre la lapa verde (*Ara ambigua*)

2.5.1 Taxonomía

La lapa verde, conocida también como guacamayo verde mayor, pertenece a la familia Psittacidae, también conocida como la familia de las cotorras. Se subdivide en cuatro subfamilias, de las cuales a tres apenas se les asignan de una a seis especies. La subfamilia Psittacinae es la que contiene la gran mayoría de las cotorras, pericos y guacamayos (INBio, 2004; Jiménez, 2003). En el cuadro 1

se puede apreciar detalladamente la taxonomía de la lapa verde.

Cuadro 1. Información taxonómica sobre la lapa verde.

Categoría	Taxa
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Aves
Orden	Psittaciformes
Familia	Psittacidae
Género	<i>Ara</i>
Especie	<i>ambigua</i>

Fuente: INBio, 2004.

2.5.2 Fenotipo

Ara ambigua es el segundo Psitácido más grande de América. Mide aproximadamente entre 79 y 85 cm, y pesa en promedio 1,3 kilogramos. Su cola es relativamente más corta y robusta que la de la lapa roja (*Ara macao*), el pico es mucho más grueso. Los adultos son verde amarillento, con la frente roja. La piel de la cara es blancuzca, cruzada por líneas de plumas rojas y negras. El pico es negro con la punta gris, las patas son oscuras. Los individuos más jóvenes son parecidos a los adultos solo que un poco más opacos y más color oliva. Es una especie que no presenta dimorfismo sexual (hembras y machos son iguales morfológicamente) (ver figura 1) (Stiles y Skutch, 1991).



Figura 1. Fotografía de una lapa verde en la que se puede apreciar claramente su fenotipo. Tomada de www.corbis.com

2.5.3 Hábitat

Esta ave suele encontrarse en las copas de los árboles de los bosques húmedos de las tierras bajas. Vuela largas distancias para llegar a los almendros de montaña, los cuales son su principal fuente de alimento y hábitat. En Costa Rica se desplazan sobre la vertiente del Caribe. Se reproducen en la región de Boca Tapada (San Carlos) durante el primer semestre del año. Luego migran hacia la región de Sarapiquí y a las faldas del Parque Nacional Braulio Carrillo (Stiles y Skutch, 1991).

2.5.4 Reproducción

Las lapas son fieles a su pareja por toda la vida y casi los son a sus nidos. En Costa Rica anida de diciembre a junio. La mayoría de las parejas ponen el primer huevo a finales de enero y para finales de febrero nacen sus crías. Si no se presentan inconvenientes llegan a tener dos pichones en promedio (INBio, 2004).

2.5.5 Alimentación

Las semillas de los frutos del almendro de montaña constituyen el principal componente en la dieta de las lapas verdes. Visitan estos árboles desde septiembre, cuando los frutos inmaduros están disponibles, hasta abril, cuando los frutos se vuelven escasos (INBio, 2004).

Cuando las semillas de *D. panamensis* escasean las lapas prefieren alimentarse de las semillas de *Sacoglottis trichogyna*, también conocido como titor, rosita o manteco. Cuando ninguno de los dos tipos de frutos anteriores está disponible (septiembre y octubre) se alimentan de una variedad de aproximadamente 37 especies de frutos. Nueve de las 37 especies son de tierras altas y por lo tanto son fuentes de alimento una vez que las lapas han migrado a mayores altitudes (García, 2003; INBio, 2004).

2.6 Distribución en el mundo y en Costa Rica

En el mundo, la lapa verde se encuentra distribuida desde el este de Honduras hasta el noroeste de Colombia y el oeste de Ecuador (Stiles y Skutch, 1991).

Históricamente, la lapa verde anidaba a lo largo de los bosques de tierras bajas del Caribe costarricense. En 1993 y 1994 los miembros del Proyecto de Investigación y Conservación de la Lapa Verde llevaron a cabo una extensa búsqueda en el noreste de nuestro país. Lograron identificar aproximadamente 1000 kilómetros cuadrados como área de anidamiento significativa de la especie en el territorio nacional (ver figura 2) (Chassot y Monge, 2002).

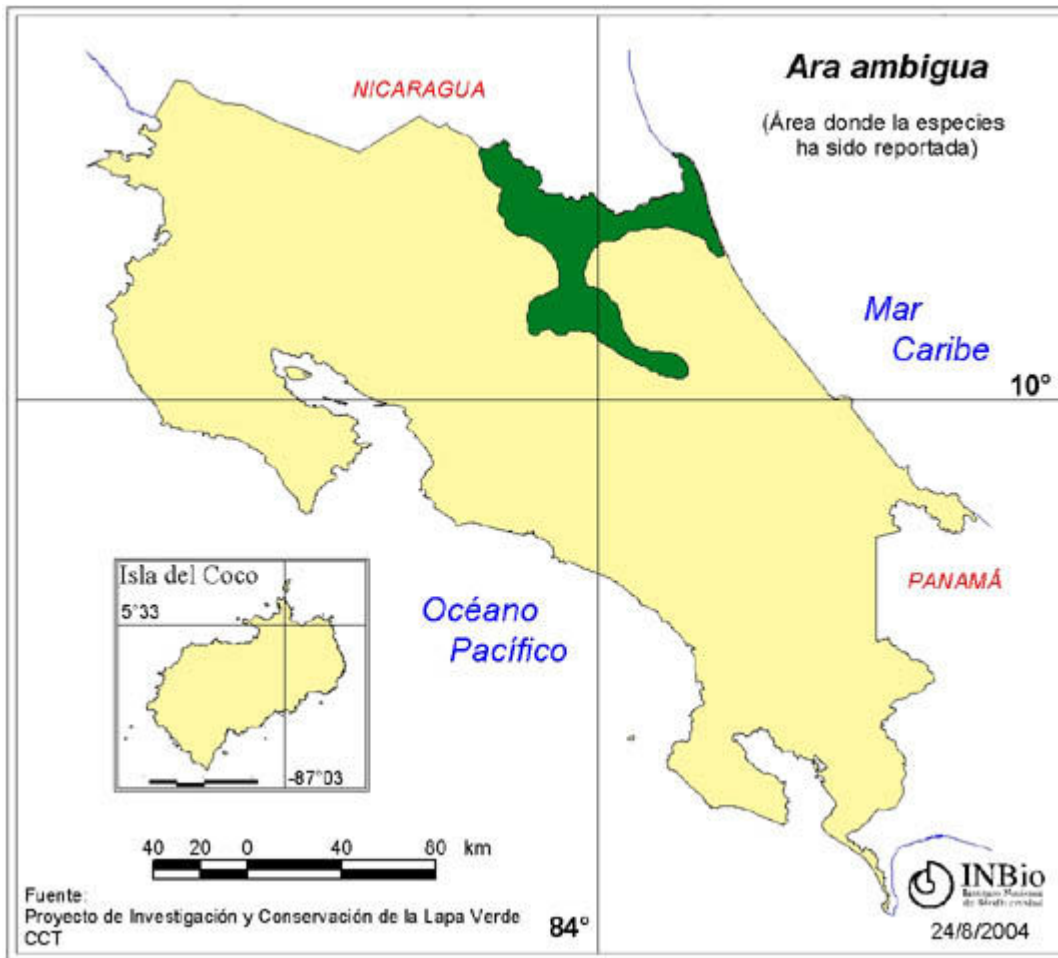


Figura 2. Área de distribución geográfica de *Ara ambiguus* en el territorio costarricense.
Tomado de: INBio, 2004.

2.7 Conceptos

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la biomolécula orgánica que almacena la información genética tanto en organismos procariontes como eucariontes. Es un tipo de ácido nucleico y consta de dos cadenas organizadas en doble hélice. El ADN conforma las unidades hereditarias conocidas como genes, las cuales forman parte de los cromosomas que son densos paquetes que contienen las instrucciones para que las células fabriquen las proteínas (Klug y Cummings, 1999).

Los genes que codifican para proteínas contienen secuencias no codificantes conocidas como intrones, que interrumpen las secuencias

codificantes, llamadas exones. Los genes constituyen apenas una pequeña parte del genoma de los organismos mientras que los intrones conforman el resto (Sudbery, 2004).

La ubicación de un gen a lo largo de un cromosoma se denomina *locus* (*loci* en plural) y las formas alternativas de un gen se conocen como alelos. Estas se dan como consecuencia de una mutación. Frecuentemente, estas variaciones originan algún cambio en las características del organismo y si llegan a formar parte del genotipo del mismo pueden extenderse por toda una población mediante mecanismos reproductivos (Klug y Cummings, 1999).

Por lo tanto, la variación genética generalmente es causada por mutaciones cromosómicas y mutaciones génicas o puntuales. Estas últimas se dan como consecuencia de un cambio en la información química almacenada en el genotipo de un organismo (Klug y Cummings, 1999).

2.8 Análisis del ADN como herramienta de conservación

Durante los últimos años ha surgido una nueva disciplina científica que ha significado una gran ayuda en lo que se refiere a conservación de especies. Esta es conocida como Ecología Molecular. Consiste en la aplicación de marcadores genéticos moleculares a problemas de ecología y evolución con el objetivo de identificar individuos, poblaciones o especies y estudiar las relaciones que se establecen entre éstos (Jordano, 1999).

Las técnicas moleculares permiten obtener información sobre la variabilidad del contenido genético de los organismos. Se puede estudiar la genealogía de los mismos y las relaciones filogenéticas entre diferentes poblaciones, especies, géneros, etc. Esta información genética se utiliza para mejorar la gestión de las distintas especies amenazadas (Jordano 1999).

En el caso de la lapa verde, estos análisis proveen una herramienta que

podría evitar la consanguinidad cuando estas son criadas en cautiverio, de manera que permiten la reintroducción de especies con alto grado de diversidad genética en la naturaleza. También se pueden determinar las parejas reproductivas, debido a que la homogeneidad genética puede ocurrir al azar en los animales, como entre los que son confiscados en diferente momento y lugar (Nader *et al.* 1999).

2.9 Técnicas moleculares

2.9.1 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los marcadores moleculares

El desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR²) ha sido de gran importancia para poder llevar a cabo estudios de variabilidad genética. La PCR consiste en la amplificación de un segmento de ADN utilizando la enzima taq ADN polimerasa termoestable, cebadores o imprimadores, y oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia que se quiere amplificar (Aranguren *et al.* 2005; Klug y Cummings, 1999).

Para poder amplificar ADN, éste debe ser desnaturalizado en cadenas sencillas para que los cebadores se puedan unir a la cadena complementaria. La doble hélice de ADN se desnaturaliza con calor, alrededor de 95°C por un tiempo determinado (Klug y Cummings, 1999).

Los imprimadores son oligonucleótidos sintéticos, e hibridan con las secuencias flanqueantes del segmento a amplificar (por lo que se debe tener información sobre dicha secuencia). Se utilizan dos y cada uno tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas de ADN. Los imprimadores hibridan con el ADN de cadena sencilla (Klug y Cummings, 1999).

A la mezcla de reacción con la que se lleva a cabo el PCR, se le añade la

² Por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction.

enzima ADN taq polimerasa la cual es resistente al calor. Su función es extender los cebadores en dirección 5'-3', usando como molde el ADN de cadena sencilla. Este proceso da como resultado una molécula de ADN de doble cadena con los iniciadores incorporados en el producto final (Ver figura 3) (Klug y Cummings, 1999).

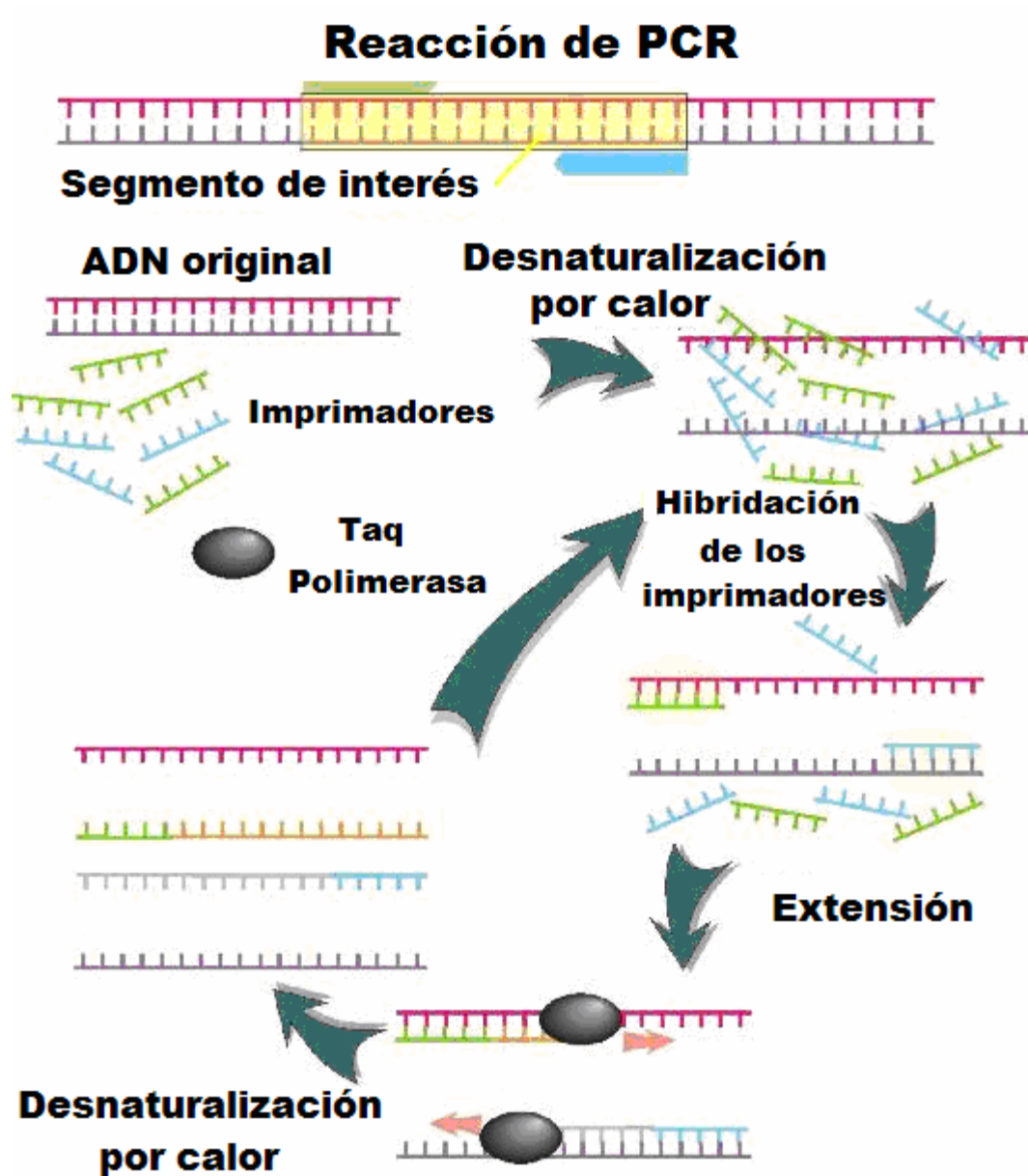


Figura 3. Esquema del proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tomado de: Nickle, 2003.

De acuerdo con lo anterior, la técnica de PCR se puede resumir en tres pasos: desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión de las cadenas complementarias de ADN. El conjunto de estos pasos se denomina ciclo. Generalmente cada uno se realiza a una temperatura específica. El primer ciclo produce dos moléculas de ADN, el segundo cuatro y así sucesivamente de manera exponencial. El proceso es automático y se lleva a cabo en una máquina llamada termociclador, la cual se puede programar para que lleve a cabo un número determinado de ciclos produciendo grandes cantidades de segmentos de ADN en unas pocas horas (Klug y Cummings, 1999).

Por lo tanto, mediante la PCR es posible generar moléculas de ADN en cantidades que permitan su caracterización a partir de muy poco material (una raíz de pluma, células epiteliales, etc.), lo que permite un muestreo no invasivo o poco destructivo de organismos vivos y el análisis de restos (Jordano, 1999).

2.9.1.1 Aplicaciones de la PCR

A partir de esta técnica, se han venido desarrollando otras utilizadas en estudios de variabilidad genética en especies animales, como por ejemplo, el uso de marcadores genéticos, que son regiones conocidas del ADN, muy variables de un individuo a otro (polimórficos) y que se heredan sin cambios de una generación a la siguiente (Aranguren *et al.* 2005).

Según Carrera *et al.* (2003) para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre los individuos de la población y un modo de herencia mendeliana; y que esta variación puede ser desde cambios fenotípicos heredables significativos hasta la variación de un solo nucleótido.

Las distintas formas heredables de estos marcadores genéticos se denominan alelos. Por lo tanto constituyen una herramienta muy valiosa en los estudios de identificación genética ya que cada individuo tendrá unos marcadores

genéticos distintos a los del resto, es decir tendrá sus propios alelos (Aranguren *et al.* 2005).

2.9.1.2 Marcadores moleculares

Un marcador molecular se define como una región del genoma, generalmente de posición conocida, que presenta polimorfismo y que además establece una relación inequívoca entre el y la presencia del material genético que lo controla (Aranguren *et al.* 2005).

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Claros, 2000).

2.9.1.2.1 Marcadores moleculares tipo microsatélites

Una de las principales aplicaciones de la PCR son los marcadores genéticos moleculares conocidos como microsatélites. Estos consisten en repeticiones en tándem de unidades de dos, tres o cuatro nucleótidos de longitud. Por esta razón también se les llama repeticiones cortas en tándem (STRs³). Están ubicados en todas las partes del genoma, incluso dentro de las regiones codificantes. Son muy polimórficos, ya que el tamaño final de cada microsatélite depende de cómo varíe el número de repeticiones (Sudbery, 2004).

De acuerdo con Aranguren *et al.* (2005), los STRs han venido sustituyendo o complementando a otros marcadores en lo que se refiere a la conservación de especies, ya que por su alto nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo *multilocus*, de particular interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución, como lo son los de parentesco, y en los que otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones.

³ Por sus siglas en inglés: Short Tandem Repeats.

Los microsatélites son considerados como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones debido a que son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes, por lo que se pueden diferenciar individuos homocigotas de heterocigotas, son fáciles de medir y analizar, son confiables, repetitivos y automatizables y además requieren cantidades mínimas de ADN (Aranguren y Jordan, 2001; Becerra y Paredes, 2000).

Cabe destacar que las mutaciones modifican el número de repeticiones de los STRs, aumentándolas o disminuyéndolas. El cuadrado de la diferencia en el número de repeticiones entre dos microsatélites es proporcional al momento de divergencia de un ancestro común. Es decir, una mutación es un cambio progresivo y los fragmentos que migran distancias similares han experimentado pocas mutaciones (IPGRI, 2004).

Sin embargo, los microsatélites presentan algunas desventajas, como que el número de secuencias de los mismos en el genoma es limitado, lo que restringe su utilización para la elaboración de mapas genéticos cuando se compara con el número potencialmente ilimitado de *loci* correspondientes a otro tipo de marcadores como los RFLP's (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción), RAPD's (Amplificación Aleatoria de Fragmentos Polimórficos de ADN) y AFLP's (Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados). Entre otras de sus limitaciones se encuentran el esfuerzo y la inversión económica inicial necesaria para su desarrollo y que sus secuencias de flaqueo no se conservan mucho entre especies de algunos géneros, lo que hace que los marcadores no sean transferibles a especies no relacionadas directamente. No obstante, existe la posibilidad de usar los mismos imprimadores en más de una especie debido a que existe cierto grado de conservación de los microsatélites entre genomas de algunas especies relacionadas (Becerra y Paredes, 2000; Butcher *et al.* 1999).

2.9.1.2.2 Aplicaciones de los microsatélites

Durante los últimos años, los microsatélites han venido tomando un papel importante debido a sus diversas aplicaciones. Se utilizan para la identificación de genotipos individuales, en estudios del flujo de genes de diversas especies vegetales y animales. También se han aplicado en estudios de evaluación de germoplasma, diversidad genética, cartografía de genomas, estudios filogenéticos y evolutivos. Por lo tanto, gracias a esta técnica han sido posibles progresos en la comprensión del origen, función, mantenimiento y mejoramiento de la diversidad biológica (Butcher *et al.* 1999, IPGRI, 2003).

Ya se había hecho un estudio sobre la variabilidad genética de una población de lapas rojas (*Ara macao*), que también se encuentra en el Zoo Ave, evaluada mediante el uso de tres marcadores tipo microsatélite provenientes de otras especies de psitácidos reportados por Russello *et al.* (2001) y Caparroz *et al.* (2003). Con esta investigación se logró implementar una metodología de gran utilidad para determinar certeramente la variabilidad genética de la lapa roja y así contribuir con su conservación (Arias *et al.* 2005).

En la investigación de Rusello *et al.* (2001) se logró aislar varios microsatélites a partir de la lora *Amazona guildingui*. En total se caracterizaron nueve *loci* polimórficos variando de dos a nueve alelos por *locus*. Además, estos imprimadores amplificaron en otros cuatro géneros diferentes de Psitácidos, lo que demuestra el potencial de la utilidad de estos marcadores para futuros estudios poblacionales y de conservación de otras aves pertenecientes a esta familia.

En el caso de Caparroz *et al.* (2003), se caracterizaron seis *loci* tipo microstélites a partir de *Ara ararauna*, también conocida como lapa azul dorada. Estos variaron de uno a once alelos por *locus* y también amplificaron en otras dos especies de Psitácidos de distintos géneros.

2.10 Análisis Estadísticos

2.10.1 Medidas de diversidad genética

Para poder documentar el grado de variabilidad genética de una manera estándar, se necesitan medidas que permitan cuantificar esta información. La heterocigosidad es el método más común para medir la diversidad genética, también se han utilizado otro tipo de medidas para describir la variabilidad de un *locus* o de cierto número de *loci* similares (Hedrick, 2000).

2.10.1.1 Heterocigosidad

Debido a que los individuos que conforman las especies diploides pueden ser heterocigotos u homocigotos para cierto *locus*, esta medida representa una cuantificación biológica muy útil. Sin embargo, teóricamente las propiedades de distribución de la heterocigosidad son complicadas, y estas medidas no son muy sensibles a variaciones adicionales porque el límite máximo, uno, es el mismo para cualquier número de alelos. Esta limitación dificulta la diferenciación entre poblaciones con *loci* altamente variables, como los microsatélites, donde la heterocigosidad puede ser mayor de 0,8 (Hedrick, 2000).

2.10.1.2 Distancia genética

La distancia genética entre dos muestras se describe como la proporción de elementos genéticos (alelos, genes, gametos, genotipos) que no son compartidos por ambas muestras. Esta puede ser igual a uno solamente cuando las dos muestras no tienen elementos genéticos en común (IPGRI, 2004).

Los datos generados a partir de matrices de distancias genéticas pueden incorporarse en estudios filogenéticos, donde se contemplan las frecuencias alélicas y se pueden utilizar con marcadores genéticos codominantes como lo son los microsatélites (IPGRI, 2004).

La distancia dentro de una población es el promedio de la suma de los cuadrados de las diferencias en número de repeticiones entre alelos, por lo tanto, el cálculo de la distancia entre dos alelos es una transformación del número de repeticiones. Una de las dificultades en el uso de las STR's para estimar distancias genéticas es que su tasa de mutación es alta (IPGRI, 2004).

2.10.2 Agrupación o *clustering* para visualizar las relaciones

Es el proceso de agrupar (o conglomerar) objetos en categorías o clases, con base en sus particularidades o relaciones comunes. Existen varios tipos de agrupaciones, pero la que se llevó a cabo en este estudio es la cladística, la cual se basa en la genealogía o filogenia de las muestras de interés (IPGRI, 2004).

2.10.2.1 Dendrogramas

Los dendrogramas son la representación gráfica de datos en forma de árbol, en el cual se organizan los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado. Estos diagramas son una ilustración de las agrupaciones derivadas de la aplicación de un algoritmo de *clustering* o agrupamiento (Aluja, 2003).

Este tipo de representación permite apreciar claramente las relaciones de agrupación entre los datos e incluso entre subgrupos. De acuerdo con las sucesivas subdivisiones se pueden tomar criterios de agrupación de los mismos, la distancia entre los datos según las relaciones establecidas, etc. (Aluja, 2003).

2.10.2.1.1 Método de agrupamiento o *clustering* de pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA)

El UPGMA⁴, es el método más simple para la construcción de dendrogramas. Minimiza la distancia entre grupos, al tomar la distancia promedio

⁴ Por sus siglas en ingles: Unweighted Pair Group Average Method.

de todos los pares entre los individuos de la muestra (IPGRI, 2004).

Este método consiste en la búsqueda de la distancia más pequeña en la matriz y agrupar las unidades que la conforman como una sola unidad taxonómica independiente. Se calculan los promedios de la nueva unidad contra los restantes conformando una nueva matriz, y se repite el proceso hasta que todas las unidades queden conformando un solo elemento (Poot y Zavala, 1995).

2.11 Determinación del sexo en aves

Muchas de las diferentes especies de Psitácidos no presentan ningún dimorfismo sexual, es decir, morfológicamente el macho y la hembra son iguales, ya que no existe ninguna característica física (plumas, tamaño, color, etc.) que permita discernir entre ambos sexos. Esta situación complica la determinación del sexo de las mismas y ha sido una seria dificultad en su cría en lo que se refiera a la selección de parejas de reproductores (Cortés, 2001).

2.11.1 Técnicas de Sexado en Aves

2.11.1.1 Endoscopia

Es uno de los métodos más utilizados. Consiste en una práctica quirúrgica en la que se visualiza el aparato genital del ave, precisa de personal calificado y, como toda cirugía, puede necesitar anestesia y un período post-quirúrgico. Es una técnica bastante invasiva, y en aves pequeñas presenta serias dificultades, lo que unido a la susceptibilidad de las aves a la manipulación, hace que el riesgo de mortalidad sea elevado (Cortés *et al.* 1998).

2.11.1.2 Sexado por ADN

Es otro de los métodos utilizados y ha desplazado la endoscopia gracias a las ventajas que presenta, como menor costo económico, técnica más confiable, no es invasiva y no presenta riesgo de mortalidad, además se puede llevar a cabo

en cualquier momento de la vida del ave, incluso desde la eclosión (Cortés, 2001).

Al principio, la selección de un marcador genético sexual para llevar a cabo el sexado por ADN tuvo algunas dificultades. La fuente obvia es el cromosoma sexual W presente en las hembras (ZW) y ausente en los machos (ZZ). Similar al caso del cromosoma humano Y, es muy pequeño y presenta una cantidad desproporcionada de ADN basura. Estas secuencias evolucionan rápidamente, aún entre especies muy relacionadas, por eso proveen marcadores sexuales de rango limitado. Una técnica para sexar por medio de ADN es utilizar genes, ya que al ser regiones codificantes conservadas, este método sirve en una gran cantidad de especies de aves (Griffiths *et al.* 1998).

El primer gen del cromosoma sexual W presente en las aves que se descubrió en 1998 es el “chromobox-helicase-DNA-binding” (CHD-W). Este gen es muy conservado, y se ha demostrado que se puede utilizar un par de imprimadores para determinar el sexo de organismos pertenecientes a la clase Aves con la excepción de ratites (avestruces, emúes, etc.). Estos imprimadores amplifican simultáneamente partes homólogas del CHD-W y del gen relacionado CHD-Z. Al estar presente el CHD-Z en ambos sexos siempre debería amplificar, lo que asegura que la reacción de PCR funcionó. Sin embargo, los dos productos de CHD son del mismo tamaño, por lo tanto Griffiths *et al.* (1996) usaron una enzima de restricción para cortar un fragmento del CHD-Z selectivamente antes de la electroforesis. Finalmente las hembras presentan dos bandas y los machos una (Griffiths *et al.* 1998).

En un estudio hecho por Griffiths *et al.* (1998) se describe un nuevo método para sexar aves basado en dos genes CHD, el cual no se requiere usar una enzima de restricción para separar los productos de PCR, por lo tanto es más simple, económico y rápido. Se emplean dos imprimadores, P2 y P8, que flanquean las regiones exónicas pero luego amplifican un intrón en los dos genes, CHD-W y CHD-Z. Como estos intrones son no codificantes son menos conservados y sus longitudes usualmente difieren entre los genes. Como

resultado, los productos de PCR varían en tamaño desde el principio del proceso. La electroforesis revela inmediatamente una banda en los machos y dos en las hembras. Este método fue probado exitosamente en varias especies de aves.

El sexado con los imprimadores P2 y P8 es casi universal. No se ve muy afectado por variaciones en la concentración de ADN de la muestra y el par de imprimadores reduce la posibilidad de la aparición de bandas contaminantes. Es una manera efectiva de distinguir machos de hembras en las aves (Griffiths *et al.* 1998).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo de aves en cautiverio

Las muestras analizadas en este estudio provienen de 32 lapas verdes cautivas en el Parque de Conservación y Vida Silvestre Zoo Ave. A estas se les tomó una muestra de sangre de 2 ml para ser usada como fuente de ADN.

3.2 Extracción de ADN genómico

El ADN de las muestras fue extraído utilizando el Kit Wizard Promega (Promega, 2002), de acuerdo las especificaciones del fabricante y las modificaciones descritas por Arias *et al.* (2005). Este proceso había sido realizado previamente en el laboratorio, por lo que para la presenta investigación se contó con el ADN ya extraído. También se utilizó ADN de una lapa azul-dorada (*Ara ararauna*) y un loro (*Amazonas autumnalis*) como muestras control.

3.3 Aplicación de marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética entre las lapas.

Se utilizaron cuatro diferentes marcadores moleculares tipo microsatélites (Ver cuadro 2) tanto de las lapas como de *A. ararauna* y *A. autumnalis*. Estos marcadores son algunos de los reportados por Russello *et al.* (2001) y por Caparroz *et al.* (2003) para *Amazona guildingii* y *Ara ararauna* respectivamente. A continuación se muestra un cuadro con información sobre los imprimadores utilizados en el presente estudio.

Cuadro 2. Información sobre los imprimadores utilizados para llevar a cabo los PCR's de variabilidad.

Locus. No. De Accesoión del Banco Genético	Secuencia del imprimador (5'-3')	Repetición	T _a (°C)	Peso (pb)
UnaCT21	F: CTTTCCCATACTTAGCCATA R: AGACATTTCAAGACCGTGCC	(GT) _n (CTT)(GT) _n	52	245–273
UnaCT43	F: TCATCCTATCACCAGAAGGG R: CTTGAGGACAGTGACAGAGGG	(GT) _n	61	199–219
UnaCT74	F: CTGGACTGCTGCTCTTAACA R: AGCCTGAAGTGAAGTGCATG	(GT) _n	57	232–260
UnaGT55	F: TCTGCCCTCTGTCTTATGCC R: ACTTTGGTTTGTCCCTGC	(GT) _n (AT) _n	50	184–192

T_a: Temperatura de anillamiento.

pb: pares de bases.

3.3.1 PCR

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 12,5 µl de mezcla de reacción, conformada por los componentes que se muestran en el cuadro 3. Esta fue modificada a partir de las reportadas por Caparroz *et al.* (2003) y Rusello *et al.* (2001).

Cuadro 3. Composición de la mezcla de reacción utilizada para realizar el PCR para el estudio de variabilidad genética de las lapas.

Componentes	Concentración Final	1X (µl)
Buffer (10X) + KCl	1x	1,25
MgCl ₂ (25mM)	2,5 µM	1,25
dNTP's (2mM)	400 µM	2,5
Primer F (4 µM)	0,8 µM	2,5
Primer R (4 µM)	0,8 µM	2,5
Taq (5 u/µl)	0,5 u	0,1
Agua	----	1,4
ADN	----	1
		Volumen Final 12,5 µl

A continuación se describe en detalle el programa de perfil térmico utilizado para llevar cabo las PCR's para evaluar la variabilidad de las lapas, modificado a partir de los reportados por Caparroz *et al.* (2003) y Rusello *et al.* (2001).

Cuadro 4. Ciclos utilizados en el termociclador para llevar a cabo los PCR de variabilidad.

Paso	Tiempo	Temperatura °C
1. Desnaturalización inicial	5 minutos	95
2. Desnaturalización	1 minuto	95
3. Apareamiento de los imprimadores ⁵	40 segundos	Ver cuadro 2
4. Extensión	1 minuto	72
5. Extensión Final	30 minutos	72

3.3.2 Electroforesis en gel de Agarosa al 1%

Una vez obtenidos los productos de PCR se verificó su amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El registro de la presencia de bandas se llevó a cabo con el software Kodak

⁵ Los pasos del 2 al 4 se repiten por 34 veces antes de que empiece el paso 5.

Molecular Imaging Software v. 4.0 (Eastman Kodak Company, 2005).

3.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE⁶)

Los productos de PCR se mezclaron con 15 µl de buffer PAGE y se desnaturalizaron en el termociclador o en baño maría a 95°C por cinco minutos. Luego se cargaron 2,5µl de cada muestra en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4% y se corrieron en buffer TBE 1X por una hora y media a 40 W. Los geles se tiñeron con Nitrato de Plata según el protocolo reportado por Caetano-Anollés y Gresshoff (1994).

3.4 Análisis de datos

El registro de los patrones de bandas específico para cada marcador se llevó a cabo con el software Kodak Molecular Imaging Software v. 4.0 (Eastman Kodak Company, 2005). La relación genética entre las lapas se evaluó mediante el análisis de la heterocigosidad de la población en general y para cada *locus* llevado a cabo con el GenALEx v.6 (Peakall & Smouse, 2005), y con un dendrograma tipo UPGMA generados con el software Statistica v. 6 (StatSoft, 2004). Con estos análisis fue posible estimar la diversidad genética entre los genotipos de interés para determinar su grado de cercanía genética.

3.5 Determinación del sexo mediante ADN

Se determinó el sexo de cada una de las lapas muestreadas mediante un procedimiento de estudio de ADN, basado en el análisis de regiones intrónicas de distintas longitudes presentes en los cromosomas sexuales de las aves. Para esto se llevó a cabo un PCR con imprimadores específicos para estas regiones (Griffiths *et al.* 1998). La composición de la mezcla de reacción de la PCR se detalla en el cuadro 5.

⁶ Por sus siglas en ingles: Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

Cuadro 5. Composición de la mezcla de reacción utilizada para realizar la PCR de sexado de las lapas verdes.

Componentes	Concentración Final	1X (10 µl)
Buffer 10X + KCl	50 mM	1 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 mM	0,6 µl
dNTPs (2mM)	200 µM	1 µl
Primer P2	100 ng	1 µl
Primer P8	100 ng	1 µl
Taq Polimerasa (5 u/µl)	0,15 u	0,1 µl
H ₂ O	----	4,3 µl
ADN	----	1 µl
		Volumen Total 9 µl

En cada PCR, además de las muestras, se utilizó un control negativo, dos controles positivos de macho y hembra, y un marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

El cuadro que se aparece seguidamente muestra el perfil térmico utilizado para realizar las PCR's para determinar el sexo de las aves.

Cuadro 6. Ciclos utilizados en el termociclador para llevar a cabo los PCR de sexado.

Paso	Tiempo	Temperatura °C
1. Desnaturalización inicial	1,5 minutos	94
2. Apareamiento de los imprimadores	45 segundos	48
3. Extensión	45 segundos	72
4. Desnaturalización ⁷	30 segundos	94
5. Apareamiento de los imprimadores	1 minuto	48
6. Extensión Final	5 minutos	72

3.5.1 Electroforesis

A cada uno de los productos de la PCR de sexado se les agregó 1,5 µl de buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% azul de Xilencianol, 30% glicerol), para proceder a realizar la electroforesis. Esta se llevó a cabo en geles de agarosa al 4% en buffer TAE 1X a 80 voltios por una hora y media. Alternativamente se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 2%. Una vez transcurrida la hora y media, los geles se tiñeron por 10 minutos en una solución de bromuro de etidio al 0,02% en buffer TAE 1X. Luego se observaron en presencia de luz ultravioleta y se fotografiaron con el equipo y software Kodak Molecular Imaging Software (Eastman Kodak Company, 2005).

⁷ Pasos del 2 al 4 se repiten 30 veces antes de que empiece el paso 5.

4 RESULTADOS

4.1 Aplicación de marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética entre las lapas

Para estimar la variabilidad genética presente en la población de lapa verde cautiva en el Zoo Ave, se evaluaron cuatro microsatélites en cada uno de los individuos que la conforman. Como control se utilizaron muestras de *A. ararauna* y de *A. autumnalis*. Se observó que todos los marcadores amplificaron exitosamente en la totalidad de los individuos evaluados, de manera que se logró obtener un patrón de bandas definido para cada muestra de acuerdo con el microsatélite utilizado.

Seguidamente se presenta la fotografía de dos de los geles PAGE obtenidos durante la realización del proyecto. En ambos se puede observar claramente la presencia de individuos homocigotas, lo cuales presentan únicamente una banda y de heterocigotos, que presentan dos bandas.

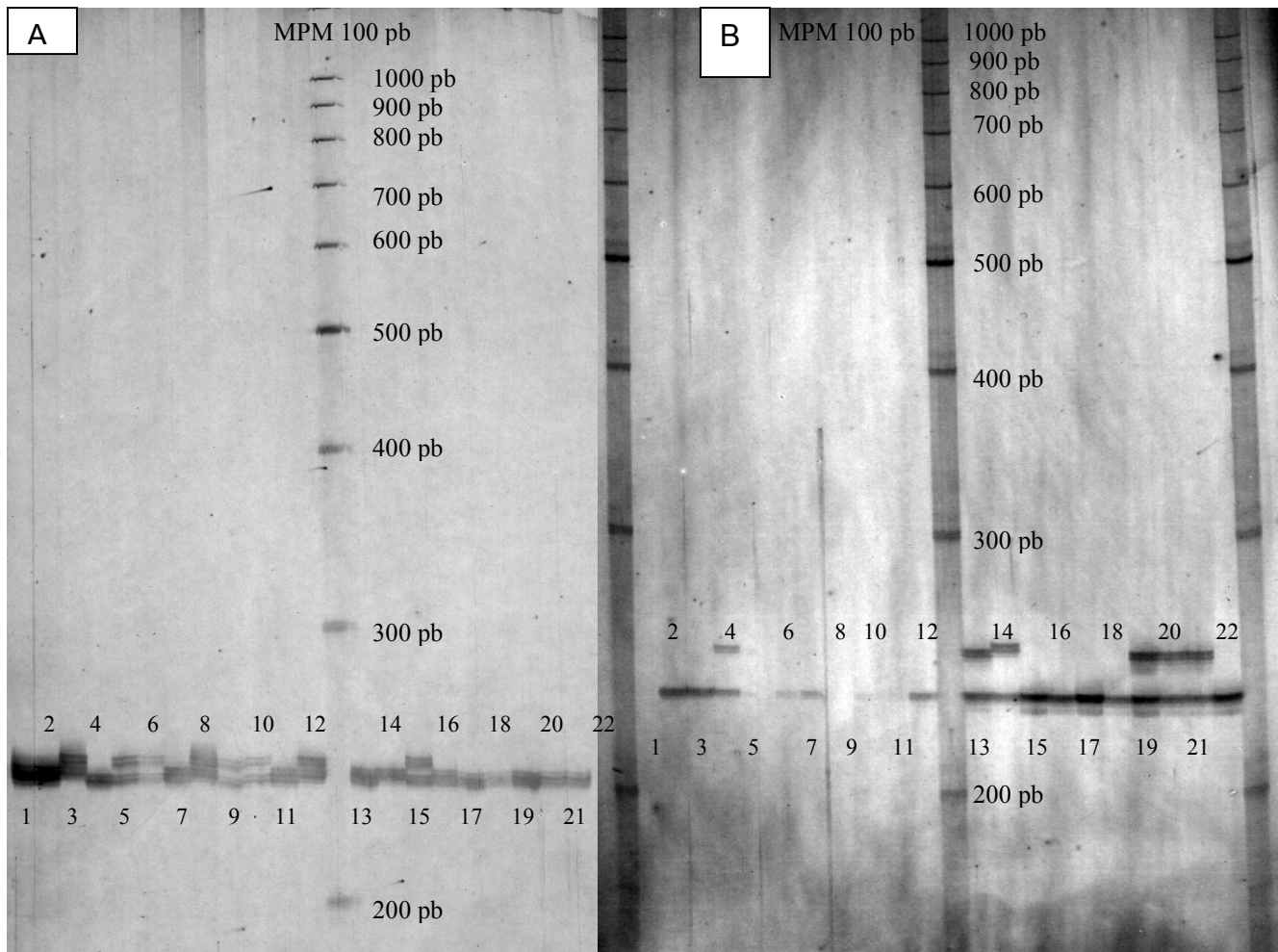


Figura 4. A) Gel Poliacrilamida 4% con la PCR realizada con el marcador CT74 para las lapas de la 1 a la 22. B) Gel Poliacrilamida 4% con la PCR realizada con el marcador CT21 para las lapas de la 1-22. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado es el de 100 pares de bases.

Con el fin de determinar la distancia genética entre los diferentes individuos, se estableció el peso de cada uno de los alelos obtenidos para los diferentes marcadores mediante el análisis de los geles PAGE con el Programa Kodak MI (Eastman Kodak Company, 2005). Los pesos se registraron en el cuadro que se presenta a continuación.

Cuadro 7. Alelos para cada uno de los *loci* analizados presentes en cada una de las lapas verdes.

Individuo	<i>Loci</i>							
	CT 74		CT 21		CT 43		GT 55	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
1	247	244	238	238	209	203	185	183
2	247	243	254	238	208	203	185	182
3	251	247	238	238	208	203	185	183
4	245	240	237	237	208	203	186	184
5	251	245	238	238	207	203	186	184
6	251	245	237	237	208	202	186	184
7	247	243	237	237	207	202	186	183
8	251	246	256	237	207	203	186	183
9	250	244	238	238	208	202	186	184
10	251	250	246	237	208	202	186	183
11	250	245	256	238	208	203	186	184
12	250	246	255	238	208	202	186	184
13	247	243	238	238	205	205	187	184
14	248	244	238	238	203	203	186	182
15	252	246	238	238	201	201	186	183
16	248	244	254	238	206	206	186	184
17	247	243	237	237	202	202	186	183
18	247	244	237	237	202	202	184	180
19	246	243	237	237	205	203	187	184
20	246	242	238	238	203	203	187	183
21	246	242	255	238	201	201	187	183
22	246	242	237	237	204	204	185	183
23	244	244	254	238	204	204	186	184
24	250	244	256	237	204	204	187	185
25	250	246	237	237	203	203	186	184
26	242	242	237	237	207	204	187	184
27	246	242	237	237	204	202	186	184
28	248	243	236	236	201	201	186	184
29	245	242	253	236	204	201	186	183
30	245	242	253	236	204	202	186	183
31	245	242	244	236	205	202	186	184
32	245	245	252	249	202	202	185	183

Una vez determinado el peso en pares de bases de cada una de las bandas obtenidas, se procedió a hacer los análisis estadísticos para determinar la relación entre las lapas. Mediante el software GenALEx v.6 (Peakall & Smouse, 2005) se determinaron la frecuencias alélicas para cada *locus* y otros valores, tales como la heterocigosidad observada, la esperada y el índice de fijación.

Como se puede apreciar en la figura 5, el *locus* CT74 presentó un total de 11 alelos, de los cuales más de la mitad se observaron frecuentemente en la población, resultando el marcador más polimórfico de los cuatro que se analizaron.

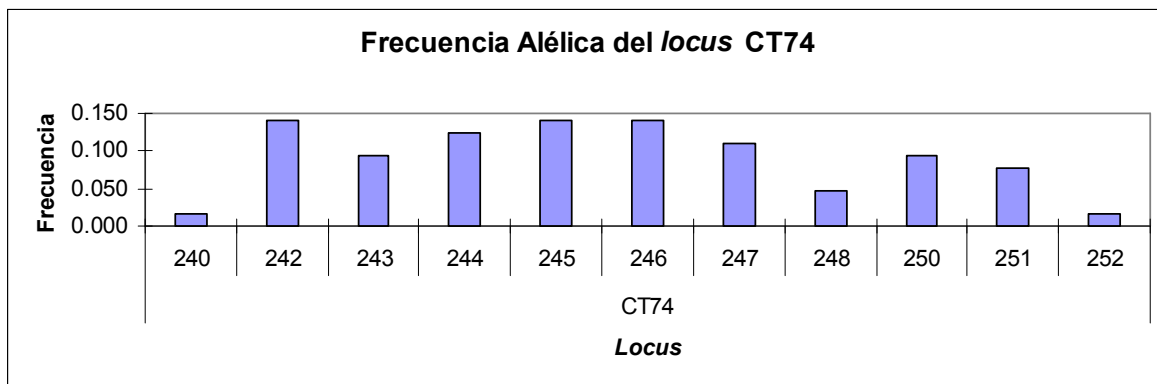


Figura 5. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el *locus* CT74 (GenALEx v.6).

De acuerdo con la figura 6, para el *locus* CT21 se observó un total de 11 alelos de los cuales sólo dos presentaron una alta frecuencia alélica, el 237 y el 238. Debido a estas circunstancias este marcador fue el que resultó menos polimórfico.

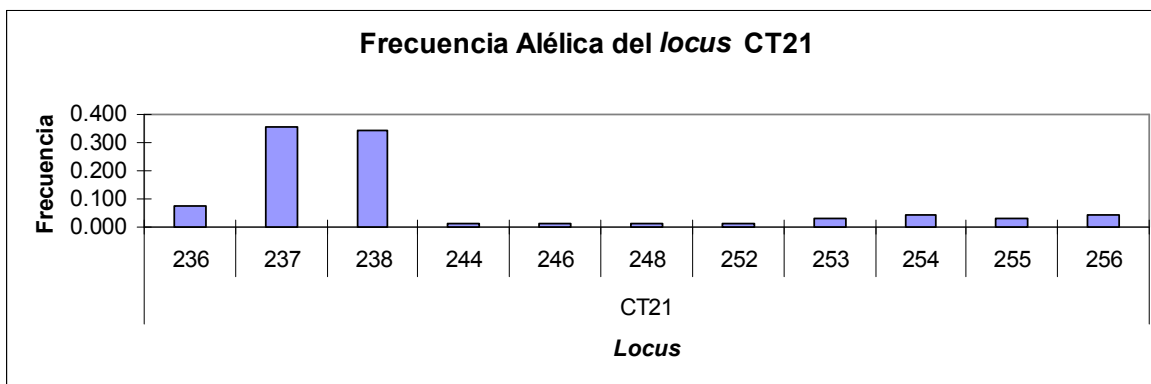


Figura 6. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el *locus* CT21 (GenALEx v.6).

Como se muestra en la figura 7, el marcador CT43 presentó un total de 9 alelos. Aproximadamente la mitad de estos se observaron frecuentemente en la población, lo que lo hace un *locus* bastante polimórfico.

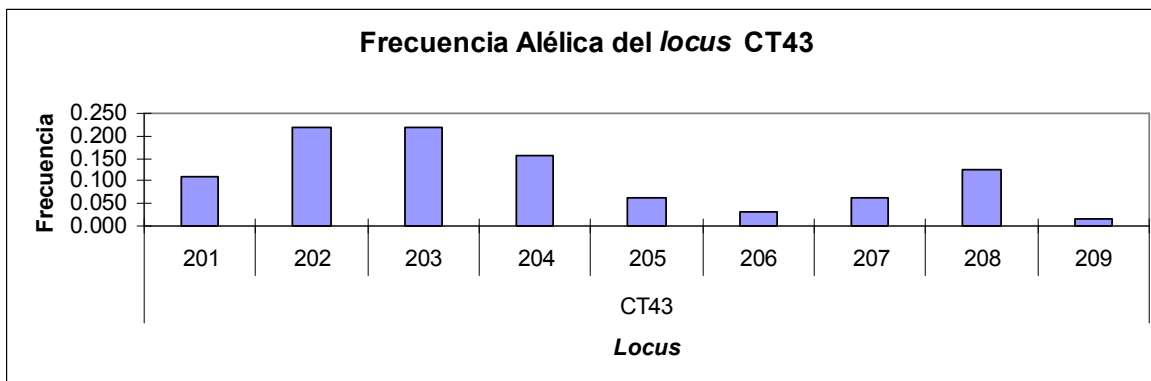


Figura 7. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el *locus* CT43 (GenALEx v.6).

En la siguiente figura se observa que para el *locus* GT55 se obtuvo un total de 7 alelos presentes en la población. Alrededor de la mitad resultaron con una alta frecuencia alélica. Debido a esto, este marcador se puede considerar polimórfico.

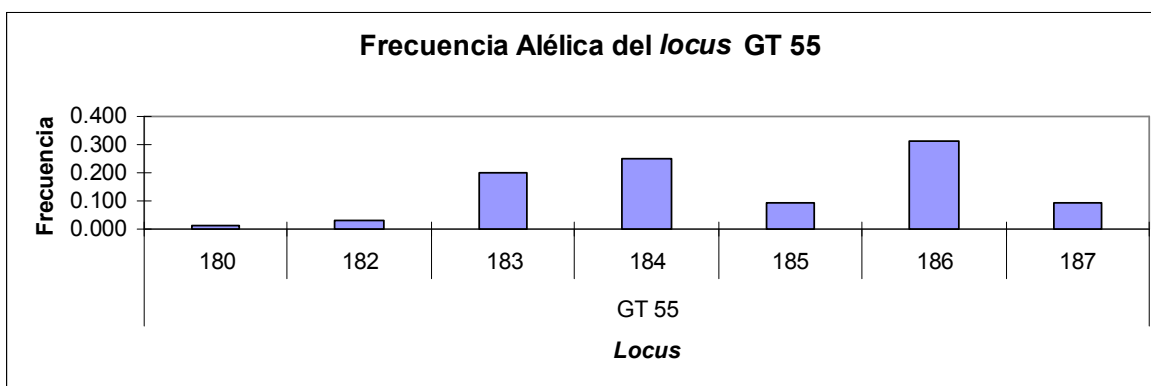


Figura 8. Representación gráfica de las frecuencias alélicas para el *locus* CT55 (GenALEx v.6).

El cuadro que se muestra a continuación es un cuadro resumen de los 4 presentados anteriormente. En el se puede observar las frecuencias alélicas de la totalidad de los alelos obtenidos durante el estudio para los 4 marcadores analizados.

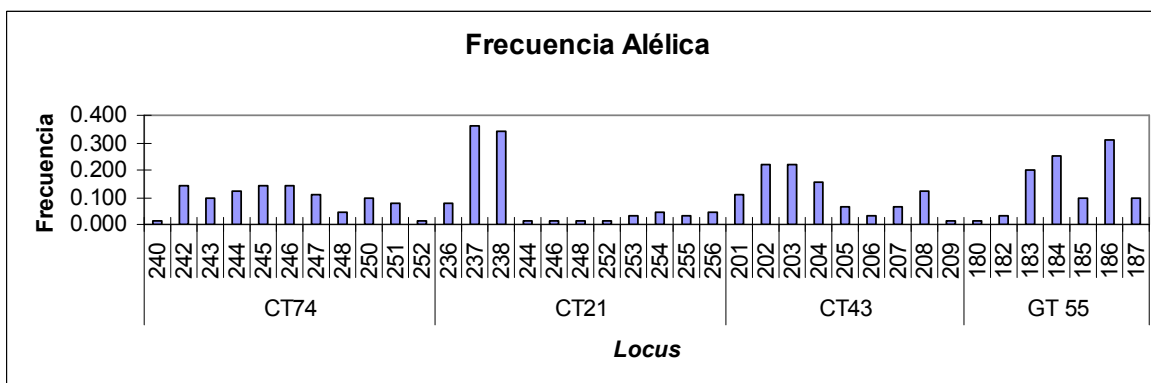


Figura 9. Representación gráfica de las frecuencias alélicas de cada uno de los *loci* analizados (GenALEx v.6).

En el cuadro 9 se pueden apreciar los datos obtenidos para la heterocigosidad de los *loci* analizados. Los marcadores CT74 y el GT55 fueron los que presentaron la más alta heterocigosidad, incluso mostraron niveles mayores a la heterocigosidad esperada, dando como resultado un índice de fijación negativo. Esto indica una deficiencia de individuos homocigotos para estos dos *loci*. Los marcadores CT43 y CT74 mostraron una heterocigosidad relativamente baja, menor a la esperada por lo que sus respectivos índices de fijación dan negativos, evidenciando una deficiencia de individuos heterocigotos para ambos *loci* (Hedrick, 2000).

Cuadro 8. Información sobre la heterocigosidad para cada *locus* analizado.

Locus	N	Na	Ho	He	F
CT74	32	11	0.906	0.887	-0.022
CT21	32	11	0.406	0.739	0.450
CT43	32	9	0.563	0.843	0.333
GT 55	32	7	1.000	0.780	-0.282

N: Número de muestras analizadas.

He: Heterocigosidad esperada.

Na: Número de alelos.

F: Índice de fijación.

Ho: Heterocigosidad observada.

El siguiente cuadro muestra el promedio del número de alelos y de la heterocigosidad obtenida para todos los *loci* en general. Como se puede observar la heterocigosidad observada se considera alta, ya que esta presentó un valor de 0.719, y a partir de valores mayores a 0.650 en una población, se considera que esta presenta un alto grado de heterocigosidad.

Cuadro 9. Promedio para los cuatro *loci* analizados de algunos de los valores obtenidos durante el análisis y su error estándar.

Valor	Promedio	Error Estándar
Na	9.500	0.957
He	0.812	0.033
Ho	0.719	0.033

A partir de la matriz de distancia genética generada con el software GenALEx v.6 (Peak & Smouse, 2005) se obtuvo el siguiente dendrograma, tipo UPGMA, mediante el programa Statistica v. 6 (StatSoft, 2004), en el cual se pueden apreciar 4 grupos principales de lapas verdes; A, B, C y D; y algunos subgrupos pertenecientes al grupo A. Se puede apreciar claramente como las muestras control, *A. ararauna* y *A. autumnalis* quedan por fuera de la población de *A. ambigua*. Cabe destacar que los individuos que resultaron más cercanos genéticamente son las lapas 29 y 30, mientras que las más alejadas son la 1 y 26.

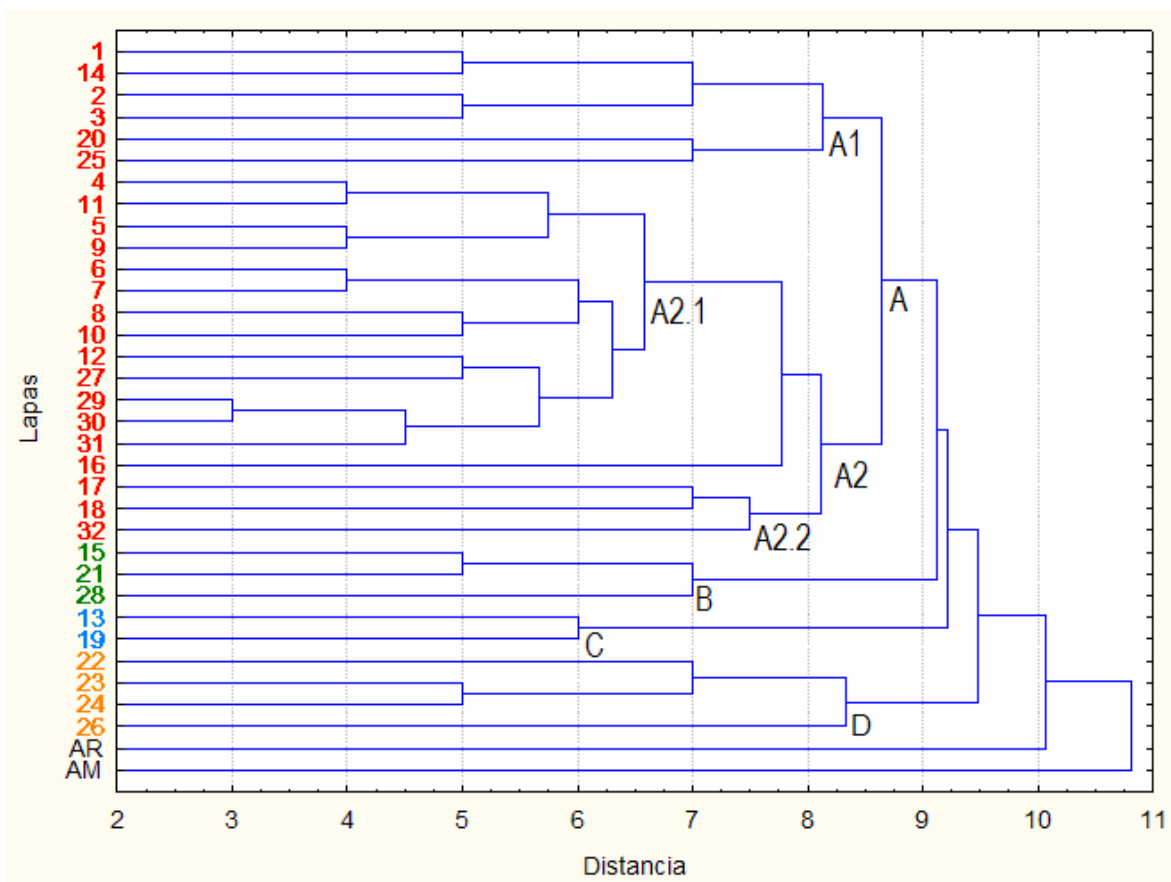


Figura 10. Dendrograma obtenido por el método UPGMA a partir de la relación genética entre las 32 lapas verdes, *Ara ararauna* (AR) y *Amazona autumnalis* (AM), determinada con 4 microsatélites.

4.2 Determinación del sexo por ADN

Mediante el procedimiento de sexado de las aves, se determinó que de las 32 lapas verdes, 19 resultaron hembras y 13 machos. En el cuadro que se muestra a continuación se aprecian estos resultados detalladamente, también se muestra la distribución de cada uno de los individuos en las jaulas con las que cuenta el Zoo Ave.

Cuadro 10. Resultado del sexado de las 32 lapas verdes y su distribución en el ZooAve.

Individuo	Sexo	Jaula	Individuo	Sexo	Jaula
1	Hembra	V-12	17	Hembra	B
2	Macho	V-12	18	Hembra	B
3	Macho	V-11	19	Hembra	B
4	Hembra	V-11	20	Macho	B
5	Hembra	V-10	21	Macho	V-6
6	Hembra	V-10	22	Hembra	V-6
7	Macho	V-9	23	Hembra	V-5
8	Hembra	V-9	24	Macho	V-5
9	Hembra	V-8	25	Macho	V-4
10	Macho	V-8	26	Hembra	V-4
11	Macho	V-7	27	Macho	V-3
12	Hembra	V-7	28	Hembra	V-3
13	Macho	B	29	Macho	V-2
14	Hembra	B	30	Hembra	V-2
15	Hembra	B	31	Macho	V-1
16	Hembra	B	32	Hembra	V-1

En la figura 11 se puede observar un gel de agarosa resultado de una electroforesis con los productos de un PCR de sexado, en cual se puede apreciar claramente el patrón de bandas específico para cada sexo, en las hembras se observa la presencia de dos bandas, mientras que en los machos sólo se ve una banda.

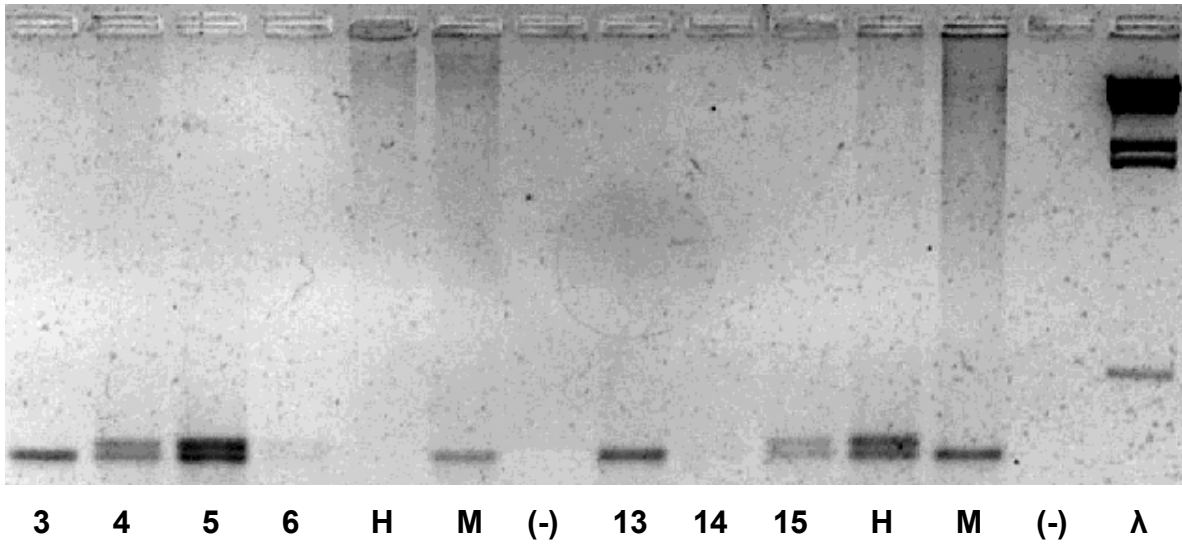


Figura 11. Visualización de los productos de un PCR de sexado en un gel de Agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Controles Positivos: H (hembra) y M (macho).

Control Negativo: (-).

Marcador de peso molecular: λ

5 DISCUSIÓN

A. ambigua es una de las especies de Psitácidos que se encuentra en peligro de extinción en nuestro país y en el mundo, principalmente por la deforestación indiscriminada del almendro de montaña, su hábitat primordial. Como consecuencia, la población de lapa verde ha sido fragmentada y aislada en la naturaleza, logrando que los individuos tengan dificultad para hallar parejas reproductivas (Fortino y Morrone, 1997).

El Parque de Conservación y Vida Silvestre ZooAve ha llevado a cabo una estrategia convencional de conservación de crianza de las lapas en cautiverio, pero esta presenta la desventaja de la posible endogamia que se puede dar entre los individuos, de manera que la diversidad genética de la progenie se puede reducir significativamente, porque al tener una pequeña población confinada en un área relativamente pequeña, es prácticamente inevitable que se den apareamientos entre individuos emparentados.

Al presentarse un alto grado homocigosis, se desarrolla una baja capacidad de adaptabilidad al ambiente natural y se es más susceptible a sufrir diversas enfermedades (Nader *et al.* 1999). Obviamente esto afectaría en forma negativa el porcentaje de sobrevivencia y adaptación de las lapas reinsertadas en la naturaleza, razón por la cual el Zoo Ave quiere planificar la reproducción de la población de *A. ambigua* de manera que la descendencia que se obtenga cuente con la mayor variabilidad genética posible, para luego liberarlas al entorno natural.

Con los análisis genéticos llevados a cabo en este estudio, a través del uso de marcadores moleculares se logró estimar la relación genética entre los individuos de interés, bajo un modelo basado en la distancia genética que las separa.

Se utilizaron cuatro marcadores tipo microsatélite para evaluar la variabilidad entre las lapas debido a que es una técnica muy informativa. Los

microsatélites han sido muy importantes en lo que se refiere a la conservación de especies, ya que por su alto grado de polimorfismo pueden definir un único genotipo *multilocus*, de particular interés en estudios que demanden una escala muy fina de resolución, como lo son los de parentesco o variabilidad genética (Aranguren *et al.* 2005). Además, los microsatélites son muy útiles para los estudios de genética de poblaciones porque presentan herencia mendeliana simple, son codominantes, lo que permite diferenciar individuos homocigotas de heterocigotas, son fáciles de medir y analizar, son muy confiables, repetitivos y automatizables (Aranguren y Jordan, 2001).

Las secuencias repetidas en tándem de los microsatélites se encuentran en todo el genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene un número distinto de repeticiones, lo que se asocia a alelos específicos de alta variabilidad, de forma que a través del uso de estos marcadores se pueden obtener patrones complejos de ADN en animales y otros organismos (Becerra y Paredes, 2000).

Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicas puesto que las secuencias flanqueantes varían de una especie a otra y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas (Becerra y Paredes, 2000). Sin embargo, debido a que no se han reportado microsatélites para *A. ambigua*, se utilizaron los marcadores desarrollados para *Ara ararauna* (Caparroz *et al.* 2003) y *Amazona guildingii* (Russello *et al.* 2001). Estos amplificaron exitosamente en lapa verde y en *Amazonas autumnalis* lo que indica que estos marcadores se encuentran conservados en los genomas de estas especies y posiblemente en otras especies relacionadas. Según Caparroz *et al.* (2003), los imprimadores utilizados también amplifican en otras especies de loros de los géneros *Ara* y *Amazonas*, y en otros más como *Brotogeris*, *Aratinga*, y *Pionus*.

En cuanto a la separación electroforética de los productos de amplificación por microsatélites, el sistema preferido y más ampliamente recomendado para llevarla a cabo es mediante la poliacrilamida (PAGE). Este sistema es el que más

se utiliza para estudios de diversidad ya que alcanzan mayores niveles de polimorfismos que los geles de agarosa (Osorio *et al.* 2005).

Según Lomonte (2001) los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas como transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos.

Durante la realización del proyecto no se presentó ningún inconveniente al utilizar este sistema. La mayoría de los geles que se obtuvieron presentaron un patrón de bandas claro y definido, pudiéndose identificar con precisión los alelos para cada *locus*. Sin embargo, esta técnica presenta la desventaja de que no es un proceso automatizado ante otras más nuevas como lo es el análisis de marcadores moleculares mediante un secuenciador automático y el marcaje de los imprimadores con compuestos fluorescentes los cuales emiten una coloración específica que permite identificar los alelos con precisión de forma automática (Lomonte, 2001).

El sitio de procedencia de las lapas verdes que se encuentran en el Zoo Ave no se conoce con certeza, ya que estas provienen de confiscaciones llevadas a cabo por el Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica (MINAE). Como resultado, mediante este trabajo no se encontraron conexiones entre la variabilidad genética de las lapas de acuerdo con su lugar de procedencia. Sin embargo se sabe que en nuestro país, el hábitat de *Ara ambigua* se restringe a la zona norte (ver figura 1). Debido a esto el grupo de lapas en estudio se puede considerar como una muestra representativa de la población natural.

El *locus* CT74 (ver figura 5) presentó un total de 11 alelos para las 32 lapas verdes. Más de la mitad de estos alelos se observaron frecuentemente en la población, lo que indica que este marcador es sumamente polimórfico. El *locus* GT55 (ver figura 8) presentó un total 7 alelos, de los cuales 3 fueron muy frecuentes en la población, por lo que también representa un marcador muy

polimórfico. Al haber muchos alelos frecuentes en un *locus* se espera que su heterocigosidad sea alta (Hedrick, 2000). Esta situación se ve reflejada en los valores de la heterocigosidad observada de los dos *loci* mencionados anteriormente, la cual resultó mayor que la esperada (ver cuadro 8). Para el CT74 este valor fue de 0,906; lo que demuestra que un 90,6% de la población es heterocigota, mientras que un 9,4% es homocigota. En el caso del GT55 la heterocigosidad observada es de 1,0 (ver cuadro 8) lo que indica que el 100% de la población resultó heterocigota para este *locus*.

El índice de fijación se usa para estimar la variabilidad genética del total de una población, de las subdivisiones de esta o de los individuos que la conforman. Si este presenta valores positivos indica una deficiencia de heterocigotos y los valores negativos indican un exceso (Hedrick, 2000). Para ambos de los *loci* (GT55 y CT74) se obtuvo un índice de fijación negativo, ya que la heterocigosidad observada superó a la esperada debido a la deficiencia de individuos homocigotas para estos marcadores en la población.

El marcador CT21 (ver figura 6) resultó ser el menos polimórfico de los cuatro *loci* analizados. A pesar de presentar un total de 11 alelos, sólo dos de ellos se observaron frecuentemente en la población. El valor de la heterocigosidad observada para este marcador es de 0,406; siendo el más bajo y resultó menor que la heterocigosidad esperada (0,739) (ver cuadro 8). En este caso, la alta frecuencia de los alelos 237 y 238, y la baja frecuencia del resto hace que la heterocigosidad se vea reducida debido a que la mayoría de los individuos son homocigotas para los alelos más abundantes (ver cuadro 7). Para el caso específico del marcador CT21 cabe destacar que de acuerdo con el estudio llevado a cabo por Caparroz *et al.* (2003), el mismo *locus* presentó un total de 11 alelos en la población de 49 lapas azul doradas analizadas, siendo el marcador que presentó el nivel de polimorfismo más alto. Esto quiere decir que a pesar de que se da una amplificación cruzada con los mismos *loci* en diferentes especies de Psitácidos los resultados pueden ser bastante variables.

El valor de la heterocigosidad observada para el *locus* CT43 es de 0,563. Este valor es menor al de la heterocigosidad esperada (0,843) (ver cuadro 8). Sin embargo, este marcador se puede considerar polimórfico ya que presentó un total de 9 alelos (ver figura 7) a pesar de que unos se observen más frecuentemente que otros. Al igual que en el caso el *locus* CT21 los valores del índice de fijación resultaron positivos, lo que muestra que la población presenta una deficiencia de individuos heterocigotos para estos dos marcadores.

Para toda la población y los cuatro marcadores se obtuvo un promedio de 9,5 alelos por *locus* (ver cuadro 9). Entre más alelos presente un mismo *locus*, este será más polimórfico e informativo. Por lo tanto, este resultado demuestra que en general los microsatélites utilizados son polimórficos, ya que presentan un alto número de alelos. En cuanto al valor de la heterocigosidad observada promedio de toda la población de *A. ambigua* se determinó que este fue de 0,719 (ver cuadro 9), con lo que se puede concluir que la población presenta una alta variabilidad genética entre los individuos que la conforman. La heterocigosidad promedio observada es alta, lo que quiere decir que existe un bajo nivel de homocigosis en la población. Sin embargo, la heterocigosidad promedio observada es menor heterocigosidad promedio esperada debido a que, como se mencionó anteriormente, los *loci* CT21 y CT43 presentaron una heterocigosidad relativamente baja, lo que contrarresta la elevada heterocigosidad de los otros dos marcadores.

En el estudio hecho por Arias *et al.* (2005) se utilizaron los microsatélites CT21, CT43 y CT74 desarrollados para *A. ararauna* para evaluar la relación entre 60 lapas rojas, debido a que no se han reportado microsatélites para *A. macao*. Los datos aportados por este estudio indicaron que esta metodología es de gran utilidad para la determinación de la diversidad genética de la lapa roja. No obstante, las relaciones genéticas de las poblaciones de *A. macao* y de *A. ambigua* han sido muy poco estudiadas a nivel molecular. Existe un único estudio molecular de diversidad genética en un grupo cautivo de 30 lapas rojas en la zona de Turubares en Costa Rica, en el que se determinó un alto nivel de variabilidad

genética en la población mediante el método de huellas genéticas obtenidas por de hibridación molecular (Nader *et al.* 1999).

El análisis de clúster UPGMA llevado a cabo con base en los polimorfismos detectados mediante los microsatélites, conglomeró al total de las lapas en cuatro grupos principales (ver figura 10). Los individuos control, *Ara ararauna* (AR) y *Amazonas autumnales* (AM), se encuentran sumamente distanciadas de la población de lapa verde, ya que son de especies diferentes a pesar de pertenecer a la misma familia. Los clusters A, B, C y D contienen la población de *A. ambigua*, el primero comprende la mayoría de los individuos, 23 lapas en total y a su vez se subdivide en grupos más pequeños. El grupo B consta de tres individuos, el C de dos y el D contiene cuatro lapas. Los ejemplos más representativos sobre la relación genética entre las lapas son el par 29 y 30 que es el más cercano en cuanto a distancia genética se refiere, y el par 1 y 26 que es el más distanciado. Se puede inferir que cualquier par de individuos pertenecientes al subgrupo A1 presentará una baja variabilidad genética, incluso en comparación con algún individuo del subgrupo A2. Sin embargo, los individuos del subgrupo A1 se encuentran más distanciados de los que conforman el subgrupo A2.2 que los del A2.1, debido a que este último se encuentra más alejado. Por lo tanto, entre las lapas de los diferentes clústers se espera encontrar una diversidad genética alta.

La planificación de la reproducción de especies amenazadas o en peligro de extinción requiere el conocimiento inequívoco del sexo de los individuos. En muchos de los Psitácidos este aspecto es de suma importancia, ya que de ello dependen gran cantidad de estudios de carácter evolutivo, ecológico y de crianza con fines comerciales o de conservación (Cortés *et al.* 1998).

Gran parte de los Psitácidos no presentan ningún dimorfismo sexual, lo cual ha representado una dificultad en su cría en lo que se refiere a la selección de parejas de reproductores (Cortés, 2001).

El principio de la PCR que se utiliza para el sexado de aves se encuentra

en que en el caso de las hembras amplifican dos zonas, una del cromosoma W correspondiente al gen CHD y otra del cromosoma Z que presenta cierta homología con el gen, lo que permite su amplificación simultánea. Los machos poseen exclusivamente el cromosoma Z, por lo que únicamente se amplificará dicho fragmento (Cortés *et al.* 1998).

Al someter los productos amplificados a una electroforesis dan como resultado un patrón de bandas característico. Ambos sexos comparten las bandas amplificadas del cromosoma Z, característica que se utiliza como control interno de la reacción, ya que la ausencia de alguna de estas bandas puede haber sido ocasionada por algún error en la reacción. En las hembras además aparecen las bandas amplificadas del cromosoma W, lo que permite discernir entre ambos diferenciando los sexos de manera inequívoca (Cortés *et al.* 1998).

Como se puede observar en el cuadro 10, la población de *A. ambigua* analizada consta de 19 hembras y 13 machos equivalente a un 59.38% y a un 40,62% de la población respectivamente. Las parejas reproductivas conformada por los individuos 25-26 y 27-28 se encuentran distanciadas genéticamente. Esto indica que su descendencia probablemente contará con una gran variabilidad genética, lo que es esencial para los programas de reproducción en cautiverio. Las lapas 25 y 26 se encuentran en dos clusters diferentes y los más alejados entre sí, lo que demuestra su distanciamiento genético. Estas dos lapas son padres de las lapas 1 y 9, las cuales se esperaba que fueran individuos de una considerable diversidad genética que se puedan adaptar a las condiciones de la naturaleza a la hora de su liberación con un alto porcentaje de sobrevivencia (Nader *et al.* 1999).

La pareja reproductiva conformada por las lapas 3 y 4 son padres de la lapa 5. Estos dos progenitores no se encuentran tan distanciados genéticamente como la pareja 25-26. En la figura 10 se puede ver que estos dos individuos se encuentran en subgrupos diferentes, sin embargo, estos dos grupos son los más cercanos entre si. Con base en esta situación se puede esperar que la lapa 5 cuente con poca diversidad genética. La pareja 29-30 está conformada por los

individuos más cercanos genéticamente de toda la población *Ara ambigua* que se encuentra en el parque. De una posible descendencia a partir de estas dos lapas se pueden esperar individuos con un alto grado de homocigosis, por lo tanto con una baja capacidad de adaptabilidad en la naturaleza y con bajos porcentajes de sobrevivencia (Nader *et al.* 1999). Sin embargo, no se ha reportado que esta pareja haya tenido crías. El caso de las parejas 1-2, 7-8 y 23-24 es parecido al anterior, ambos individuos son cercanos genéticamente y no han tenido descendencia. No obstante, estas parejas ya están establecidas, lo que puede representar un inconveniente en el sentido de que las lapas son fieles a su pareja de por toda la vida (INBio, 2004). De manera que habría que observar el comportamiento de los machos y las hembras que conforman los dúos mencionados anteriormente ante la presencia de una lapa menos relacionada genéticamente para establecer pares de lapas reproductivos más aptos.

6 CONCLUSIONES

- La variabilidad genética estimada para los marcadores microsatélites estudiados permite señalar que la población de *Ara ambigua* cautiva en el ZooAve es bastante diversa.
- El *locus* CT74 resultó ser el más polimórfico de los cuatro microsatélites utilizados debido a que fue el que presentó la mayor cantidad de alelos y a que gran parte de estos se observaron frecuentemente en la población.
- El *locus* CT21 fue el menos polimórfico de los marcadores analizados porque únicamente dos de los once alelos que se observaron, presentaron una frecuencia alta y la mayoría de los individuos son homocigotas para los mismos.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir que las lapas verdes cautivas en el ZooAve pueden ser de gran utilidad para futuros programas de conservación de la especie, debido al alto nivel de diversidad genética con que cuenta esta población.
- Las parejas reproductivas 25-26 y 27-28 presentaron una alta diversidad genética debido a que resultaron ser las más distanciadas. Las demás parejas están separadas por una distancia genética menor.

7 RECOMENDACIONES

- A pesar de que en el presente estudio se logró estimar que la población de lapa verde es genéticamente diversa, se recomienda completarlo con mayor número de marcadores que permitan definir con más precisión la relación genética entre los individuos.
- Antes de establecer una población en cautiverio para fines de conservación, se debería llevar a cabo un estudio sobre la relación genética de los individuos que la conforman para evitar la endogamia entre estos desde un principio.
- Utilizar como control e incluir en el dendrograma alguna lapa verde que se encuentre en estado silvestre, para observar su distanciamiento genético con respecto a las que se encuentran cautivas en el ZooAve.
- La tinción de los geles de poliacrilamida da mejor resultado cuando las soluciones para realizarla están recién preparadas, sobre todo la de revelado. Por lo tanto se recomienda reutilizar máximo dos veces la solución de fijación y la de plata, y la de revelado prepararla nuevamente previo a cada tinción.
- En la jaula V-10 se encuentran dos hembras, por lo que sería recomendable que una de estas dos se trasladara con el macho 13 de la jaula B, que se encuentra distanciado genéticamente de las mismas. El macho 20 de la jaula B se encuentra cercano a cualquiera de estas dos hembras por lo que no se recomienda para pareja reproductiva.

8 ANEXOS

Anexo 1



Anexo 1. Fotografía de una lapa verde en su nido. Tomada de www.corbis.com

Anexo 2



Anexo 2. Fotografía de dos lapas verdes. Tomada de www.corbis.com

Anexo 3



Anexo 3. Fotografía del árbol de *Dipterix panamensis*. Tomada de www.corbis.com

9 . LITERATURA CITADA

- Aluja, T. 2003. Curso de “clustering” de datos. Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Estadística y Investigación Operativa. España. pp. 11-12.
- Aranguren, J; Jordana, J. 2001. Utilización de Marcadores de ADN (microsatélites) en Poblaciones de Animales Domésticos en Peligro de extinción. Artículos libres de la Asociación Venezolana de Producción Animal (AVPA). pp. 4-10.
- Aranguren, J; Bravo, R; Isea, W; Villasmil, Y; Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, Volumen. 13, N°. 1. pp. 30-42.
- Arias, M; Fournier, R; Madrigal, S; Madriz, K; Solano, W. 2005. Implementación de la técnica de marcadores moleculares para el estudio de la variabilidad genética de una población cautiva de lapas rojas (*Ara macao*) en Costa Rica. BioTécnica Análisis Moleculares.
- Becerra, V, Paredes, Mario. 2000. Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. Revista Agricultura Técnica. Volumen 60, N° 3, pp. 270-281.
- Brightsmith, D; Hilburn, J; del Campo, A; Boyd, J; Frisius, M; Frisius, R; Janik, D; Guillén, F. 2003. Supervivencia y Reproducción de Guacamayo Escarlatas (*Ara macao*) Criados a Mano en el Estado Silvestre. Trad. por: Daphne Matsufuji. pp. 1-5.
- Butcher, P; Glaubitz, J; Moran, G. 1999. Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de árboles forestales. Recursos Genéticos Forestales. N°. 27. Depósito de Documentos de la FAO.
- Caetano-Anollés, G; Gresshoff, P. 1994. Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling. Institute of Agriculture and Center for Legume Research. University of Tennessee. Promega Notes Magazine. N°. 45. pp. 13.

- Carrera, A; Helquera, M; Salomón, N; Picca, A. 2003. Marcadores Moleculares. Biotecnología y Mejoramiento. Capítulo IV. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina (INTA). pp. 62-65.
- Caparroz R, Miyaki CY, Baker J. 2003. Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes*, Volumen 3. pp. 441-443.
- Chassot, O; Monge, G. 2002. Proyecto de Investigación y Conservación de la Lapa Verde. La lapa verde a un paso de la extinción. Centro Científico Tropical. San José, Costa Rica. <<http://www.lasuerte.org/conservation.htm>> Visitada el 28/06/06.
- Chaves, J. 2004. Sombrillas para la conservación. Departamento de Ciencias Biológicas. Purdue University, USA. <http://www.zeledonia.org/files/revista/Zeledonia_10_1/Sombrillas.htm> Visitada el 03/11/06.
- Claros, G. 2000. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga. <<http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>> Visitada el 14/11/06.
- Corbis. 2006. Corbis Corporation. All visual media. <<http://corbis.com/>> Visitada el 04/11/06.
- Cortés, O. 2001. El ADN, útil para determinar el sexo de las aves. Servicio de Genética Clínica. Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid <<http://www.consultavet.es/consejos.php3?id=43>> Visitada el 28/06/06.
- Cortés, O; Cañón, J; Dunner, S. 1998. Sexado de aves mediante técnicas moleculares. Servicio de Genética Clínica. Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid <<http://www.ucm.es/info/genetvet/sexado-aves.doc>> Visitada el 03/11/06.
- Eastman Kodak Company. 2005. Kodak Molecular Imaging Software version 4.0.4. XX, EEUU. Disponible en: <<http://www.kodak.com/US/en/health/s2/index.jhtml>>.

- Eco-Index. 2006. Investigación y Conservación de la Lapa Verde. Proyecto Corredor Biológico San Juan - La Selva. <<http://www.eco-index.org/search/resultss.cfm?ProjectID=261>> Visitada el 03/07/06.
- García, M. 2003. Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en Centroamérica. Taller Regional sobre los Recursos Genéticos Forestales de Centroamérica, Cuba y México. CATIE, Costa Rica. pp. 10-13.
- Fortino, A; Morrene, J. 1997. ¿Deben existir los Zoológicos? Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. Volumen 8. N°43. pp. 5-9.
- Griffiths, R; Daan, S; Dijkstra, C. 1996. Sex identification in birds. Proceedings of the Royal Society of London B, 263. pp. 1635-1644.
- Griffiths, R; Double, M; Orr, K; Dawson, G. 1998. A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology. Blackwll Science Ltd. Volumen 7, pp 1071-1075.
- Hedrick, P. 2000. Genetics of Populations. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts. USA. pp. 75-83, 283.
- INBio (Instituto Nacional de Biodiversidad), 2004. *Ara ambigua*. Especies de Costa Rica. <<http://darnis.inbio.ac.cr/ubis/FMPro?-DB=UBIPUB.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=detail.html&-Op=eq&id=6322&-Find>> Visitada el 30/10/06.
- IPGRI. 2004. Medidas de la diversidad Genética. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje. Cornell University. pp. 19-24.
- IPGRI. 2003. Tecnologías basadas en el ADN. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Cornell University. pp. 13.
- Jiménez, M. 2003. Las Cotorras y sus Parientes. Familia *Psittacidae*. Zoológico Electrónico. Damisela. <<http://www.damisela.com/zoo/ave/otros/psitta/psittacidae/index.htm>> Visitada el 20/11/06.
- Jordano, P. 1999. Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación de especies. Estación Biológica de Doñana, CSIC. Sevilla, España. pp. 1-3.

- Klug, W; Cummings, M. 1999. Conceptos de Genética. 5ª Edición. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. Traducido por: José Luis Ménsua Fernández. pp 6-9, 475.
- Lomonte, B. 2001. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. Inmunología General. Manual de Laboratorio. Universidad Politécnica de Cataluña, España. pp 92-96.
- Madriz, B. 2004. Relación de dependencia directa para la alimentación y anidación de la lapa verde (*Ara ambigua*) y el almendro (*Dipteryx panamensis*) en la zona norte de Costa Rica. Informe de consultoría presentado a la Comisión Interna del SINAC y FONAFIFO. pp. 3-20.
- Nader, W; Werner, D; Wink, M. 1999. Genetic diversity of scarlet macaws *Ara macao* in reintroduction studies for threatened populations in Costa Rica. Biological Conservation. Vol 87. pp 269-272.
- Nickle, T. 2004. Principles of Genetics. Mount Royal Collage. <<http://www2.mtroyal.ab.ca/~tnickle/3311/>> Visitada el 13/11/06.
- Osorio, M; Vegas, A; Márquez, A. 2005. Estandarización de las condiciones para la separación electroforética de productos amplificados por microsatélites en materiales de papa. Revista CENIAP HOY. Maracay, Aragua, Venezuela. Nº 8. pp. 13-17.
- Peakall, R; Smouse, P. 2005. GenAEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia.
- Poot, M; Zavala, J. 1995. Desarrollo de un programa de computación para análisis filogenético a través de fragmentos de restricción. Centro de Investigaciones Regionales de la Universidad Autónoma de Yucatán, México. Revista Biomed. Volumen 6. pp. 76-82.
- Promega Corporation. 2002. Wizard Genomic DNA Purification Kit.
- Russello, M; Amato, G. 2001. Application of a Noninvasive, PCR-Based Test for Sex Identification in an Endangered Parrot, *Amazona guildingii*. New York, USA. Zoo Biology. Volumen 20. pp 41-45.

- Russello, M; Calcagnotto, D; DeSalle, R; Amato, G. 2001. Characterization of microsatellite loci en the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Molecular Ecology Notes*. Volumen 1. pp. 162-164.
- Stiles, G; Skutch, A. 1991. *A Guide to the Birds of Costa Rica*. Ornithology. Cornell University, USA, New York. pp. 177.
- StatSoft. 2004. *STATISTICA*. Versión 6. Data Analysis Software Products. Tulsa, Oklahoma, USA.
- Sudbery, P. 2004. *Genética Molecular Humana*. 2ª Edición. Pearson Educación S. A., Madrid. Traducido por: José Luis Paternáin. pp. 42.
- Zoo Ave. 2006. *Zoo Ave: Santuario de Vida Silvestre*. Fundación para la restauración de la naturaleza. <<http://www.zooave.org/>> Visitada el 22/11/06.