

Validación de caracteres morfológicos diagnósticos y estandarización de condiciones de PCR de marcadores mitocondriales, para la identificación de tres subespecies de *Amazona ochrocephala* (*A. o. ochrocephala*, *A. o. nattereri*, *A. o. panamensis*) Psittacidae, Aves.

Jaramillo-Castaño María José¹

¹Estudiante de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia. email: ma.jaramillo@javeriana.edu.co

Resumen

Amazona ochrocephala o “Lora real” es el ave más traficada en varias regiones de Colombia. Considerando la disminución de sus poblaciones naturales y el número de individuos decomisados, se busca favorecer protocolos de liberación. Sin embargo, la delimitación de sus subespecies mediante caracteres morfológicos resulta ambigua, dificultando la determinación del lugar de liberación. En el presente estudio se realizó la validación de los caracteres morfológicos que permiten diferenciar tres subespecies de *A. ochrocephala*, y se estandarizaron las condiciones de PCR para tres marcadores mitocondriales que posibilitan la identificación molecular de las subespecies. El análisis multivariado mostró que las medidas morfométricas por sí solas no discriminan entre subespecies, pero que estas combinadas con los caracteres cualitativos generan agrupaciones (no compactas) correspondientes a las subespecies morfológicas. Se encontraron los intervalos de valores óptimos de temperatura de anillamiento y volumen de ADN que permiten obtener los amplificados esperados. Los caracteres cualitativos (presentados en la clave taxonómica elaborada) parecen tener un mayor poder de discriminación. Se recomienda realizar una colorimetría para la especie y un estudio en sistemática molecular con las condiciones encontradas.

Palabras clave.

Amazona ochrocephala, subespecies, morfología, identificación, estandarización, liberación.

Introducción

El tráfico ilegal de fauna es considerado uno de los principales factores responsables de la disminución del tamaño de las poblaciones silvestres a nivel mundial (Rosales 2012), después de la fragmentación y de la pérdida de hábitat (Bello et al. 2014). En Colombia, esta actividad representa una amenaza importante para las poblaciones naturales de psitácidos (guacamayas, loros y pericos; Restrepo-Roda & Pulgarín-Restrepo 2017).

Dentro de los psitácidos, *Amazona ochrocephala* (Gmelin 1788 en Hoppe 1992) o “lora real”; es la especie más traficada en los departamentos de Risaralda y Valle del Cauca, y la segunda dentro de las especies de aves traficadas en el resto del país (Restrepo-Roda & Pulgarín-Restrepo 2017). Esto

se debe, en gran parte, a su amplia distribución en el territorio nacional, a su colorido plumaje y a la capacidad de imitar vocalizaciones humanas, haciéndola especialmente apreciada como mascota (Corantioquia 2008).

Diariamente llega un gran número de loras reales a los centros de recepción de fauna silvestre del país, sobrepasando la capacidad de carga de estas instituciones. Como resultado se generan condiciones de hacinamiento, estrés, alta mortalidad y bajo bienestar para los animales decomisados (Restrepo-Roda & Pulgarín-Restrepo 2017). Los individuos de *A. ochrocephala* incautados llegan a los centros de recepción, donde los médicos veterinarios realizan una valoración para determinar el estado epidemiológico y el estado físico general. Posteriormente se les realiza una evaluación comportamental y se dejan en cuarentena; una vez determinada su capacidad de vuelo, son trasladados a jaulas diseñadas para desarrollar y favorecer el vuelo o a jaulas convencionales. Esto con el fin de realizar una posible rehabilitación y liberación de los individuos (Minambiente 2010).

Amazona ochrocephala está representada por 3 subespecies en Colombia (Hoppe 1992 y Rodríguez & Hernández 2002): *A. o. ochrocephala* presente en las laderas de los Andes, desde el Norte de Santander hasta el departamento del Meta, y parte del Amazonas; *A. o. nattereri* localizada en el piedemonte andino, en el departamento del Caquetá y del Putumayo. *A. o. panamensis* se distribuye desde el Norte del Chocó, pasando por la planicie del Caribe y la Sierra Nevada de Santamarta hasta el sur de la Guajira, también abarca la parte baja del Valle del Cauca y el sur del departamento de Magdalena (Hoppe 1992 y Rodríguez & Hernández, 2002).

Sin embargo, la clasificación subespecífica de este complejo es considerada un "dolor de cabeza taxonómico" (Howell & Webb 1995). Pese a que tradicionalmente la diferenciación de las subespecies se ha basado en caracteres morfológicos, como la extensión de la mancha amarilla en la cabeza, la extensión de la coloración roja en la curva del ala, la pigmentación de los picos y el tamaño corporal (Forshaw 1989); estudios moleculares sugieren que la taxonomía actual no corresponde a las agrupaciones naturales (Eberhard & Bermingham 2004, Russello & Amato 2004 y Ribas et al. 2005, 2006, 2007). A partir de análisis de ADNmt, Eberhard & Bermingham (2004), Ribas et al. (2007) y Urantówka et al. (2014), encontraron que el complejo está dividido en tres linajes primarios y reportan que los individuos de *A. o. ochrocephala* colombianos y venezolanos forman clado hermano de los restantes individuos sudamericanos, apoyando una reclasificación de la subespecie. No obstante, los resultados de estos estudios son parciales, ya que se han incluido un máximo de 7 muestras colombianas provenientes únicamente de la subespecie *A. o. ochrocephala*.

La sobreexplotación sobre *A. ochrocephala* ha generado que la presencia de esta especie sea poco frecuente, o que incluso se haya erradicado totalmente en grandes extensiones del norte y centro de

Colombia, donde en décadas pasadas era muy abundante (Rodríguez & Hernández 2002). Por esta razón, es de vital importancia generar protocolos de liberación que favorezcan la conservación *in situ* de las poblaciones silvestres de la especie. A pesar de que la lora real no se encuentra en una categoría de amenaza de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), sus poblaciones presentan una tendencia al decrecimiento (BirdLife International 2018), llegando incluso a considerarse como vulnerable a la extinción en el ámbito nacional según Rodríguez & Hernández (2002). Ejemplo de esto es la notable disminución del tamaño poblacional de subespecies como *A. o. panamensis* y *A. o. nattereri*, que han perdido alrededor del 70 % del hábitat potencial primario en el país (Corantioquia 2008).

Con el fin de evitar asignaciones poblacionales equivocadas, es indispensable identificar la subespecie a la cual pertenece cada individuo antes de su liberación, de modo que se pueda determinar de forma acertada la región en donde este debe ser reintroducido. La liberación de un animal en la región geográfica equivocada, puede producir perturbaciones en la estructura genética de las poblaciones como: una erosión genética intraespecífica (o eliminación de la diferenciación entre subespecies), una pérdida de adaptaciones locales (Templeton 1986) o una reducción de los tamaños de poblaciones (Jiménez & Cadena 2004). En Colombia, los problemas ligados a la liberación de los individuos decomisados en una región geográfica equivocada representan una amenaza recurrente, debido a la poca información disponible sobre las poblaciones de las cuales provienen.

La delimitación de las subespecies de *A. ochrocephala* puede resultar ambigua, debido a que los caracteres morfológicos utilizados varían significativamente, incluso a nivel intrasubspecífico (Howell & Webb 1995, Lousada & Howell 1996, Juniper & Parr 1998 y Eberhard & Bermingham 2004). Este estudio tiene como objetivo validar los caracteres morfológicos diagnósticos y estandarizar las condiciones de extracción y amplificación para tres marcadores mitocondriales que permitan la identificación de las subespecies de *Amazona ochrocephala* (*A. o. ochrocephala*, *A. o. nattereri*, *A. o. panamensis*) nativas de Colombia. Para tal fin, se van a verificar los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos diagnósticos reportados en la bibliografía con los observados en los individuos muestreados en el hogar de paso CARDER-APAP (Corporación autónoma regional de Risaralda- Asociación protectora de plantas y animales de Pereira). Posteriormente, se evaluará el poder discriminatorio de los caracteres morfológicos reportados como diagnósticos. Finalmente, se van a estandarizar las condiciones de extracción y amplificación para los marcadores mitocondriales *COI*, *ATPasa 6* y *ND2*.

La validación del uso de caracteres morfológicos en la determinación taxonómica de los individuos decomisados, justificaría la utilización de esta herramienta de identificación, que resulta más rápida, práctica y económica para las corporaciones autónomas regionales del país.

Métodos

Muestreo

Selección grupo de estudio:

Se muestrearon treinta individuos de *A. ochrocephala* procedentes de la incautación de especies silvestres, bajo el cuidado del hogar de paso CARDER-APAP, ubicado en la vereda la María del municipio de Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia.

Diez individuos de cada una de las tres subespecies de *A. ochrocephala* fueron seleccionados en jaulas de vuelo y en jaulas convencionales. La subespecie de cada uno de los individuos seleccionados fue determinada utilizando los caracteres morfológicos presentados en el Anexo 1 y Figura 1. Estas determinaciones fueron confirmadas por la veterinaria del hogar de paso.

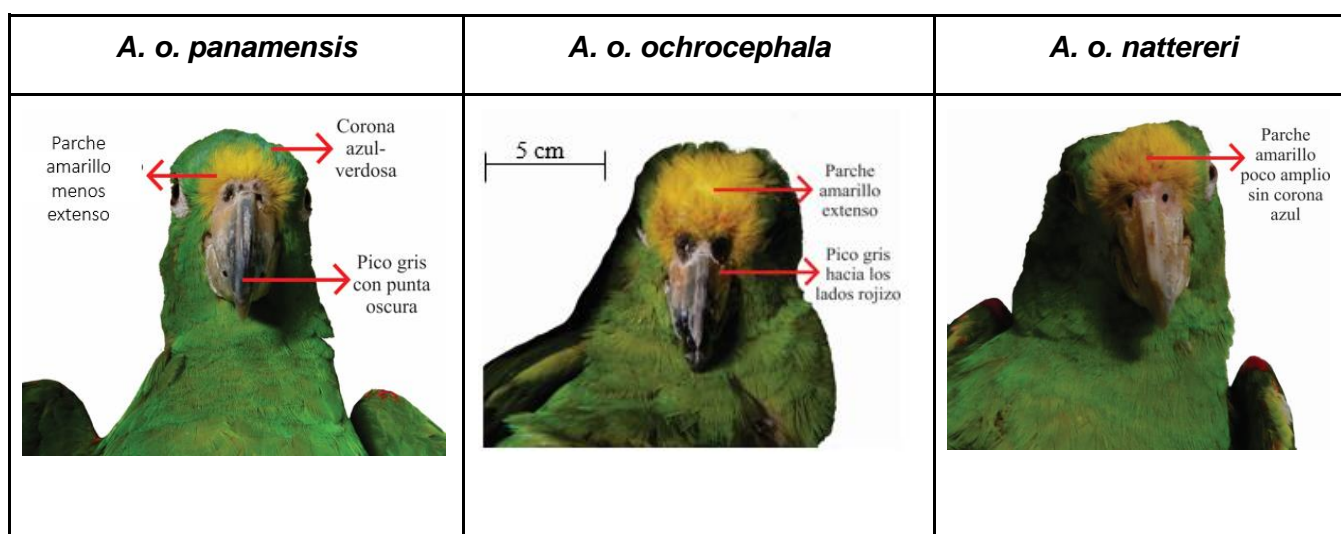


Figura 1. Caracteres morfológicos utilizados en la identificación en el hogar de paso CARDER-APAP. Las subespecies de *A. ochrocephala* se pueden diferenciar principalmente por la extensión del parche amarillo en la frente.

Toma de muestras:

Los individuos seleccionados fueron sedados por el veterinario del hogar de paso utilizando una dosis de 15mg/kg vía intramuscular en pectoral de Ketamid® (ketamida y midazolam). A cada uno de ellos se les extrajo 1 mL de sangre utilizando una jeringa de 1 mL y una aguja de calibre 2G. Las muestras fueron depositadas en tubos vacutainer con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante (BD Vacutainer K3E). Cada tubo fue marcado con la subespecie y el número de microchip del individuo. Se insertó un microchip en algunos individuos que no poseían al momento de la selección, y se dejó registro en la historia clínica correspondiente.

Cada uno de los individuos seleccionados tiene asignado un expediente con el número de microchip o historia clínica, subespecie, número de muestra, fotos y las medidas morfométricas estándares para aves (Figura 2). Las medidas tomadas fueron: Longitud total (Ltot) y culmen curvo (CC) haciendo uso de un metro de costura. Culmen total (CT), longitud de la cola (Lcola), y ancho de comisura (AC) utilizando un calibrador; y para la longitud del ala (Lala) se utilizó una regla de 30 cm con tope.

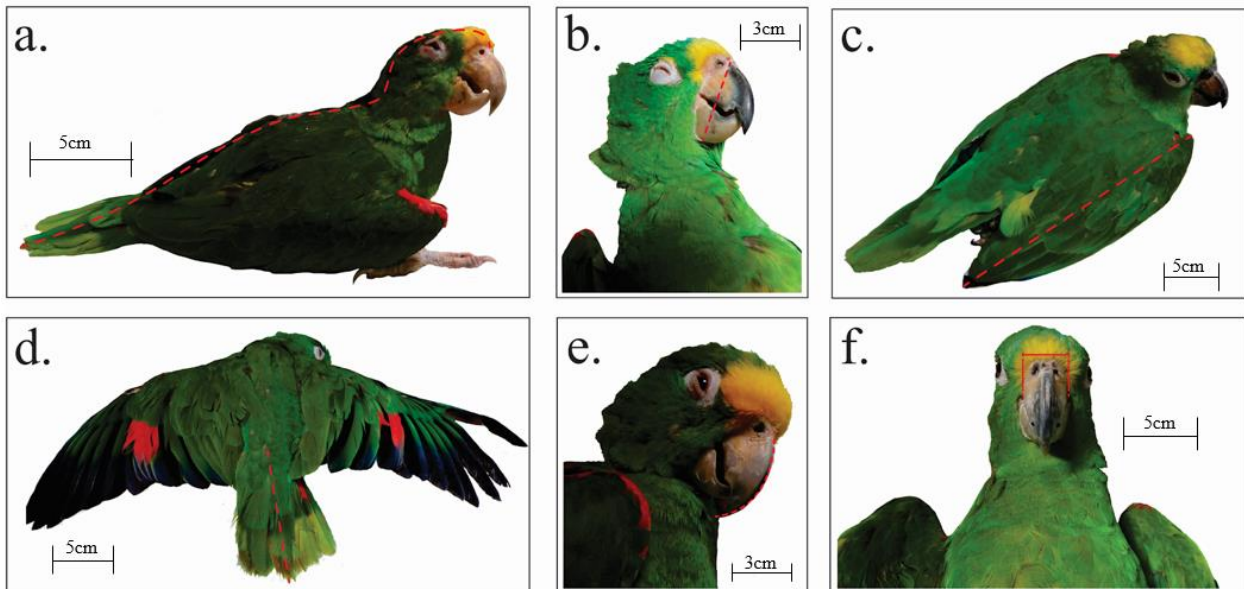


Figura 2. Medidas morfométricas tomadas: **a.** Longitud total (Ltot), **b.** Culmen total (CT), **c.** Longitud del ala (Lala), **d.** Longitud de la cola (Lcola), **e.** Culmen curvo (CC), y **f.** Ancho de comisura (AC). Ltot y CC fueron medidas haciendo uso de un metro de costura. Lcola, CT y AC se midieron utilizando un calibrador. Lala se midió utilizando una regla de 30 cm con tope.

Análisis estadístico:

Se realizó una prueba χ^2 , utilizando los valores observados en los individuos muestreados y los reportados en la bibliografía por Forshaw (1989). La hipótesis nula plantea que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medidas morfométricas de los individuos muestreados y los valores reportados en la bibliografía. Se utilizó un valor de significancia de 0.05 y 9 grados de libertad. Posteriormente, se realizó un análisis multivariante para determinar el poder de discriminación de las variables morfológicas medidas y reducir las variables que reflejan la varianza entre grupos. Para esto, se estandarizaron los datos restando la media de cada variable y dividiendo por la desviación estándar.

Se comprobaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad y multicolinealidad utilizando el software Past 4.02. En cuanto a la multicolinealidad, la matriz de covarianzas para las medidas morfométricas entre las tres subespecies evaluadas, presentó covarianzas iguales, por lo que no fue posible realizar un análisis discriminante.

Una vez seleccionadas las variables cuantitativas que cumplen los supuestos necesarios, se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) en Statgraphics 18, para reconocer las tendencias en la formación de los grupos e identificar las medidas morfométricas responsables. Los componentes principales (CP) son el conjunto de combinaciones lineales de las variables medidas y se obtienen multiplicando el peso de las variables (coeficiente) por el valor que toma la variable correspondiente. También se realizó un análisis de conglomerados con las variables cualitativas menos ambiguas y los componentes principales en Past 4.02, utilizando el coeficiente de similitud de Gower y el algoritmo de agrupación UPMAG (Hammer 2012). Los caracteres morfológicos cualitativos fueron codificados como: 1= pequeño 2= Mediano 3 = Grande, para la extensión del parche amarillo; y presencia = 1, ausencia= 0, para la presencia de la corona verde-azulada.

Adicionalmente realizó un análisis de varianza ANOVA entre las medias de las variables morfométricas (Ltot, Lala, Lcola, CC) para las tres subespecies en Past 4.02. Esto con el fin de determinar si hay una diferencia significativa entre las medidas de las tres poblaciones (*A. o. ochrocephala*, *A. o. nattereri*, *A. o. panamensis*). También se realizó el análisis de varianza para los valores reportados por Forshaw (1989).

Construcción de la clave taxonómica.

Se elaboró una clave taxonómica virtual para la identificación de las subespecies de *A. ochrocephala* utilizando el software Xper2. Los descriptores hacen referencia a los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos. Se eligieron aquellos caracteres cualitativos con la menor ambigüedad y los caracteres cuantitativos utilizados fueron el resultado del muestreo para los 30 individuos evaluados. Las medidas morfométricas fueron ingresadas como variables categóricas para tener la opción de estados de carácter. A cada carácter se le asoció una descripción, sus posibles estados, e ilustraciones orientadoras. En el caso de las medidas morfométricas, se indicó cómo se realizó la medición y con qué instrumento. Adicionalmente, se añadió el carácter de distribución, para orientar la identificación de especímenes según el área geográfica donde fue decomisado. Finalmente, el programa calculó el poder de discriminación de los caracteres, mediante los índices (LIS s.f):

$$\text{Jaccard} = \frac{n1+n2}{n1+n2+n3}$$

Donde,

n1= Estados de caracter posible para el primer taxón

n2= Estados de caracter posible para el segundo taxón

n3= Estados de carácter presentes en ambos taxones

$$\text{Sokal y Michener} = \frac{n1+n2}{n1+n2+n3+n4}$$

Donde además de n1, n2 y n3,
n4= Estados de carácter que no están presentes en los dos taxones

$$XPER = \frac{C1}{C2}$$

Donde,

C1= N.º de parejas de taxones que no tienen estados de carácter en común.

C2= N.º total de taxones

Componente de laboratorio

Extracción de ADN

-Con resina Chelex-100: Para este proceso se mezclaron 1000 µL de agua MiliQ estéril con 20 µL de sangre total de cada individuo y se dejaron precipitando una noche. Posteriormente se centrifugó la mezcla precipitada a 13000 rpm durante 5 min y se extrajo el sobrenadante. Se añadieron 170 µL de Chelex al 20% en movimiento y se incubó a 56 °C por 30 min. Finalmente, se homogeneizó la muestra por vórtex y se dejó en ebullición por 8 min, una vez terminado este tiempo se centrifugó a 130000 rpm por 3 minutos.

-Con Kit: El ADN genómico fue extraído de 10µL de sangre anticoagulada de cada individuo, utilizando el kit DNeasy tissue and blood de QIAGEN® (Qiagen 2006), siguiendo el protocolo para células de sangre nucleadas suministrado por el fabricante. Inicialmente la lisis de las membranas celulares se realizó mediante una combinación de actividad enzimática (proteínasa K) junto a lisis mecánica (agitación y calor) y las condiciones de amortiguación se ajustaron utilizando tampones para proporcionar condiciones óptimas de unión al ADN. Posteriormente, el lisado se descargó en la columna del DNeasy Mini y se centrifugó. Durante la centrifugación, el ADN se une a la membrana de la columna y a medida que los contaminantes e inhibidores la atraviesan son eliminados (se realizan dos pasos de lavado con buffers). Por último, el ADN se eluye dos veces en un tampón bajo en sal (Qiagen 2006).

Primers utilizados

El gen *ATP sintasa 6 (ATPasa 6)* de 684 pb, una porción de 622 pb del gen *Citocromo oxidasa I (COI)* y una porción de entre 700-800 pb del gen *NADH deshidrogenasa 2 (ND2)*, se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la región *ATPasa 6* use utilizó C02GQL (GGACAATGCTCAGAAATCTGCGG, L8929) con A6VALH (AGAATTAGGGCTCATTTGTGRC, H9436) primers utilizados por Eberhard & Bermingham (2004). El gen *ND2* se amplificó con METB (CGAAAATGATGGTTTAACCCCTTCC, L5233) y

ND2LSH (GGAGGTAGAAGAATAGGCYTAG, H6102), primers utilizados por Eberhard & Bermingham (2004). El fragmento del gen *COI* se amplificó usando los primers BirdF1 (TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC) y COIbirdR2 (ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTGG) (Hebert et al. 2004).

Estandarización condiciones de PCR

Por un lado, se estandarizó la temperatura de anillamiento realizando gradientes de ocho temperaturas con el fin de determinar la temperatura óptima para la hibridación de los primers. Para los genes *ATP 6* y *ND2* se utilizó el gradiente 52.0 °C, 52.5 °C, 53.3 °C, 54.7 °C, 56.3 °C, 57.6 °C, 58.5 °C y 59.0 °C, incluyendo las temperaturas reportadas para estos marcadores por (Baracca et al. 2000, Eberhard & Bermingham 2004, Divya et al. 2015, Hanapi et al. 2015, Pinedo-Castro 2017a y Ai et al. 2019) y la temperatura calculada en el programa Sabina Anzlovar. Para el gen *COI* el gradiente utilizado fue: 49.0 °C, 49.7 °C, 50.9 °C, 52.9 °C, 55.2 °C, 57.0 °C, 58.2 °C y 59.0 °C; incluyendo las temperaturas de anillamiento reportadas para este gen por (Ivanova & Grainger 2007, Rosli et al. 2011, Lancheros-Pilego & Fernández 2013 y Pinedo-Castro 2017) y la temperatura calculada en el programa Sabina Anzlovar.

Por otro lado, se estandarizó el volumen de ADN ensayando con 2.0 µL de ADN y variando el volumen entre 0.5-5 µL, dependiendo de la observación de barridos o ausencia de amplificados, hasta encontrar los valores que generaron mejores resultados para cada gen y muestra.

Amplificación de genes mitocondriales

Las amplificaciones por PCR se realizaron según las condiciones estandarizadas por el laboratorio de genética de poblaciones molecular y biología evolutiva (LGMBE-PUJ), en reacciones con volumen final de 25 µL: 2.5 µL de buffer 10X, 3.0 µL de MgCl₂, 1.0 µL de mix de dNTPs, 1.0 µL de cada primer, 1.0 µL de Taq polimerasa genTaq y entre 0.5-3.0 µL de ADN con concentraciones entre 19.16 y 301.61 ng/ µL.

Para los genes *ATPasa 6* y *ND2* el programa en el termociclador fue: una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 34 ciclos de 95 °C por 30 s, 59 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y una extensión final de 72 °C por 7 min (Pinedo-Castro 2017a).

Para el gen *COI* el programa en el termociclador fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 49 °C, 52,9 °C y 58.2 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y una extensión final de 72 °C por 7 min (Pinedo-Castro 2017). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% para asegurar que el fragmento obtenido tuviera el tamaño apropiado y la concentración suficiente.

Resultados

Caracterización morfológica

La observación de las características reportadas en bibliografía sobre los individuos muestreados, reveló que los caracteres aplicables para una primera aproximación son: la extensión del parche amarillo en la frente, la presencia de una corona azul-verdosa y la coloración del pico.

La subespecie *A. o. ochrocephala* presenta el parche de mayor extensión mientras que *A. o. panamensis* y *A. o. nattereri* exhiben un parche amarillo de menor extensión. *A. o. panamensis* es la única subespecie que posee una corona verde-azulada bordeando el parche amarillo (Figura 1). En cuanto a la coloración del pico, la subespecie *A. o. ochrocephala* se caracteriza por presentar una coloración rojiza en los laterales, mientras que *A. o. panamensis* tiene los laterales grises amarillentos y *A. o. nattereri* exhibe los laterales de amarillo a rosado (Figura 1).

La subespecie *A. o. nattereri* presentó el mayor tamaño corporal, seguido por el de *A. o. ochrocephala*. A su vez, *A. o. panamensis* presentó el menor tamaño (Anexo 1). No obstante, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre los valores de longitud total observados y reportados en literatura por Forshaw (1989) para las subespecies *A. o. panamensis* y *A. o. nattereri* (Anexo 2).

Los caracteres color del plumaje en las mejillas, color del plumaje en el pecho, color de las coberteras auriculares y extensión del plumaje rojo en la curva del ala, resultaron difícilmente aplicables. Esto debido a la falta de precisión de los estados de carácter descritos en la bibliografía. Así mismo, se encontraron individuos con una combinación de caracteres ambigua. Por ejemplo, algunos individuos que presentaron plumaje verde oscuro, característico de *A. o. nattereri*, exhibieron además un parche amarillo amplio característico de *A. o. ochrocephala*.

Análisis estadístico:

Los resultados de la prueba χ^2 para las cuatro variables estudiadas arrojaron que los valores encontrados para los individuos identificados como *A. o. panamensis* difieren significativamente de los valores que se esperaban para dicha subespecie (Anexo 2). Las medidas de Lala y Lcola de los individuos identificados como *A. o. nattereri* no difieren de los valores reportados en bibliografía, mientras que Ltot y CC son significativamente diferentes de los valores esperados (Anexo 2). Por último, las cuatro medidas morfométricas de los individuos clasificados como *A. o. ochrocephala* corresponden con los valores reportados por Forshaw (1989) para la subespecie (Anexo 2).

De las seis medidas morfométricas tomadas en campo, cuatro cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Ltot, Lala, Lala, CC). Con estas cuatro variables cuantitativas se realizó el análisis de componentes principales (ACP). Los tres primeros componentes (CP) reflejan

el 43%, 27% y 18% de la variación de los datos respectivamente, explicando el 88 % de la muestra. El cuarto componente refleja tan solo el 12% de esta varianza.

Los resultados de extracción de componentes principales muestran que las variables que explican en mayor medida las diferencias morfométricas son: la longitud de la cola (Lcola), el culmen curvo (CC) y la longitud del ala (Lala). Estas variables poseen los coeficientes más altos al momento de calcular los componentes principales (Anexo 3). Por su parte, la longitud total (Ltot) explica en menor proporción la varianza de la muestra.

La ordenación obtenida con el método de análisis de componentes principales (ACP), no mostró una clasificación consistente con lo reportado en la literatura (Anexo 4). Se encontró que los CP no permiten separar los individuos evaluados en tres poblaciones, correspondiente a las 3 subespecies muestreadas.

El dendrograma producto del análisis de conglomerados, muestra la formación de dos grandes agrupaciones (Anexo 5). El grupo más extenso tiene como individuo hermano al ejemplar 22- *A. o. ochrocephala* y se subdivide en dos clados, el ejemplar 11-*A. o. ochrocephala* siendo el individuo hermano de la agrupación restante. El primer subclado está compuesto por ocho individuos, en su mayoría pertenecientes a la subespecie *A. o. ochrocephala*, con excepción del individuo 23-*A. o. nattereri*. El segundo subclado está conformado en su mayoría por individuos correspondientes a la subespecie *A. o. nattereri* con excepción de los individuos 9-*A. o. panamensis* y 13-*A. o. ochrocephala*. En esta agrupación hay nueve individuos y se evidencian subclados de hasta 3 individuos de la misma subespecie (Anexo 5).

Dentro de la segunda gran agrupación el ejemplar 15-*A. o. ochrocephala* aparece como grupo hermano de dos grupos menores. Un subclado compuesto por los individuos 10- *A. o. panamensis* y 1- *A. o. panamensis* y el segundo subclado compuesto por una agrupación de 6 individuos de *A. o. panamensis* y una conformada por el individuo 3-*A. o. panamensis* y 24-*A. o. nattereri* (Anexo 5).

En términos generales se observa que los individuos de una misma subespecie presentan valores mayores de similitud y se encuentran cercanos entre sí. No se encontraron agrupaciones compactas, donde cada grupo estuviera compuesto por todos los individuos correspondientes a una misma subespecie.

El análisis de varianza ANOVA mostró que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos identificados en el hogar de paso (p -valor > 0.05) a partir de las medidas morfométricas. De igual forma, el resultado del ANOVA para los valores de referencia por subespecie reportados por Forshaw (1989) indica que tampoco hay una diferencia significativa (p -valor > 0.05). Estos resultados implican que las variables morfométricas utilizadas como caracteres morfológicos diagnósticos difícilmente discriminan entre las 3 subespecies analizadas.

Los resultados del índice de Jaccard, índice de Sokal y Michener, y el índice XPER permitieron determinar cuáles de los caracteres propuestos en la clave taxonómica elaborada (Anexo 7) tiene un mayor poder de discriminación dependiendo de los estados de carácter que se compartan o no entre grupos (Anexo 6). Todos los caracteres a excepción de la presencia de la corona verde-azulada ofrecen un alto grado discriminación entre las subespecies, pues hay un estado de carácter asociado a cada subespecie.

Resultados componente de laboratorio:

Extracción

Los extraídos con Chelex se tornaron viscosos y en la cuantificación de ADN los valores de concentración excedieron en su mayoría los 1000 ng/ μ L (relación 260/280 = 1.49 aproximadamente). Tras diferentes ensayos utilizando los gradientes de temperatura mencionados y variando el volumen de ADN, no se visualizaron bandas para ningún marcador mitocondrial con estos extraídos. La extracción con kit generó extraídos con entre 20 y 300 ng/ μ L de ADN por microlitro y con una relación 260/280 en promedio de 1.87, que dieron como resultado la amplificación de los marcadores utilizados.

Estandarización PCR

Para el gen *ATPasa 6*, se visualizaron bandas utilizando las ocho temperaturas del gradiente probado (Baracca et al. 2000, Eberhard & Bermingham 2004, Divya et al. 2015, Pinedo-Castro 2017a). Sin embargo, se eligió la temperatura de 59.0 °C, puesto que generó las bandas más definidas. Para la mayoría de las muestras se obtuvieron bandas con buena resolución utilizando 2 μ L y variando en un rango entre 3.0 μ L y 0.5 μ L de ADN para una concentración de entre 20.9 μ L/ng y 246.13 μ L/ng (Anexo 8b). Para el gen *COI*, se obtuvieron bandas en todo el gradiente probado, sin embargo, se eligieron tres temperaturas óptimas de anillamiento correspondientes a 52.9 °C y 58.2 °C y 49.0 °C, en concordancia con (Lancheros-Piliago & Fernández 2013 y Rosli et al. 2011). Fue necesario utilizar 1 μ L de RNAsa en la preparación del mix para la PCR, para eliminar la presencia de una segunda banda utilizando la temperatura de anillamiento de 52.9 °C. El volumen de ADN con el cual se obtuvieron la mayor cantidad de bandas fue de 0.8 μ L, y en un intervalo de 0.6 μ L - 2.0 μ L de ADN representando una concentración entre 16.72 μ L/ng - 196.90 μ L/ng. Para el gen *ND2* se obtuvieron bandas utilizando 52.0 °C y 59 °C como temperatura de anillamiento acorde con lo reportado por Pinedo-Castro (2017), se eligió la temperatura de 59 °C por la definición de las bandas. Los volúmenes de ADN que generaron amplificados fueron 0.5 y 0.6 μ L con concentraciones entre 15.52 μ L/ng y 246.13 μ L/ng (Anexo 8a).

Discusión

Caracterización morfológica:

Las características de coloración del plumaje resultaron ambiguas en la identificación de los individuos, principalmente por la falta de una colorimetría estandarizada para las subespecies de *A. ochrocephala*.

Por una parte, no fue posible detectar la variación en las tonalidades de verde de las mejillas. Hoppe (1992) reporta que *A. o. ochrocephala* presenta las mejillas de color “verde amarillento”, mientras que Forshaw (1989) reporta “verde esmeralda”. A su vez, no fue distinguible el tono “verde azulado” reportado para *A. o. nattereri* (Forshaw 1989). Para *A. o. panamensis* no hay información disponible acerca de la tonalidad de las mejillas, pero se observó que los individuos estudiados para esta subespecie presentaron visos esmeraldas.

Por otra parte, no fue diferenciable la coloración del pecho “verde amarillento” de *A. o. ochrocephala* y “verde claro” de *A. o. panamensis*, dado que los individuos muestreados presentaron visos de diferentes tonalidades de verde, en función de la incidencia de la luz. Solo la corona verde azulada reportada como carácter diagnóstico de *A. o. panamensis* resultó fácilmente reconocible. Resulta necesario estandarizar mediciones del color del plumaje en *A. ochrocephala* mediante un colorímetro, que exprese el color y luminosidad de la zona del individuo generando variables de coloración, como el utilizado por Cabrera-Huerta et al. (2018) para codornices.

Parte de la ambigüedad al utilizar caracteres morfológicos para la identificación de subespecies tiene que ver con la influencia del estadio de desarrollo en los caracteres morfológicos, que pueden variar significativamente, incluso entre individuos de la misma población (Howell & Webb 1995, Lousada & Howell 1996, Juniper & Parr 1998), o solaparse entre diferentes poblaciones (Howell & Webb 1995, Lousada & Howell 1996). Hoppe (1992) reporta que los individuos juveniles de *A. o. ochrocephala* y *A. o. nattereri* presentan un parche amarillo poco extenso en la frente. Por lo que debe prestarse especial atención al estadio de desarrollo al momento de realizar la identificación, para evitar que individuos juveniles sean clasificados erróneamente como *A. o. panamensis* (subespecie con el parche amarillo de menor extensión entre las tres subespecies).

La gran ventaja de una clave taxonómica virtual (Anexo 7) es la posibilidad de escoger aleatoriamente los caracteres para realizar la identificación; diferente a una clave dicotómica en la que se debe llevar un orden específico. Esto resulta especialmente útil cuando no son observables todos los caracteres en un individuo, como en aquellos que presentan casos de picaje. El picaje en psitácidos en cautiverio es un desorden del comportamiento (o estereotipia), que puede llevar a la pérdida de plumaje localizada o generalizada (Bargalló et al. 2014). También resulta ventajoso considerando que la

enfermedad de pico y pluma (EPPP) es muy común en psitácidos en cautiverio (Bassami et al.1998) y se caracteriza por la pérdida de plumas, presencia de plumas con forma anormal y crecimiento excesivo e irregularidad de la superficie del pico (Pass & Perry 1984). De manera que en la identificación de un individuo que haya perdido el plumaje en las zonas donde la coloración es un carácter diagnóstico, o que presente un crecimiento anormal del pico, se puede optar por evaluar otros caracteres que sí sean observables en el ejemplar.

Análisis estadístico

La diferenciación fenotípica entre las subespecies de *A. ochrocephala* ha sido fundamentada en caracteres morfológicos. Sin embargo, más allá de los estudios realizados para la descripción propia de cada subespecie, no existen trabajos que hayan evaluado cuantitativamente la variación fenotípica de estas. El ACP realizado señala la falta de evidencias morfométricas que apoyen la existencia de tres subespecies.

Una primera posible causa de este resultado podría estar relacionada con sesgos y errores en la identificación realizada en el hogar de paso. Este hogar de paso se encuentra en el departamento de Risaralda y los animales decomisados corresponden a las incautaciones realizadas en la región. Considerando la lejanía con el Caquetá y Putumayo, donde se distribuye *A. o. nattereri*, cabe la posibilidad de que algunos individuos identificados como esta última subespecie pertenezcan en realidad a *A. o. ochrocephala* o *A. o. panamensis*.

Esto se puede ver soportado por el hecho de que algunas medidas resultaron significativamente diferentes de las reportados por Forshaw (1989) (Anexo 2). No obstante, conviene subrayar, que esto mismo sucede con todas las medidas para *A. o. panamensis* (Anexo 2), subespecie con el área de distribución más cercana al hogar de paso.

La segunda posible causa hace referencia a que las variables cuantitativas evaluadas no permiten discriminar entre grupos. Esto se ve apoyado por la falta de formación de unidades poblacionales discretas que apoyen la identidad taxonómica de las subespecies en el diagrama de dispersión (Anexo 4); y por el hecho de que no hay una diferencia significativa en las medias de las medidas morfométricas entre las subespecies ($p\text{-valor}>0.05$; incluyendo los valores de referencia). Adicionalmente, los rangos encontrados y reportados se sobrelapan entre sí, por lo que estas medidas parecen ser tan similares entre poblaciones que resultan poco útiles en la clasificación.

Sin embargo, al analizar las variables morfométricas en conjunto con los caracteres cualitativos, se encontró que, con contadas excepciones, los individuos de una misma subespecie presentan un mayor grado de semejanza entre ellos que con el resto de individuos de otra subespecie (Anexo 5). Aunque no se encontraron agrupaciones compactas donde cada clado estuviera compuesto por los diez

individuos identificados como la misma subespecie, si existe una cercanía o similitud significativa entre especímenes de la misma subespecie en el dendograma obtenido. Esto nos indica que probablemente las características que permiten discriminar entre grupos son la extensión del parche amarillo en la frente, la presencia o ausencia de corona verde-azulada y la pigmentación del pico en adultos. Por esta razón se recomienda realizar medidas de la extensión del parche amarillo con un calibrador y posteriormente realizar los análisis estadísticos correspondientes, de manera que se reduzca el sesgo al manejar esta extensión como grande, mediano, pequeño; interpretación que puede verse modificada por la percepción y subjetividad del observador.

Conforme al análisis de conglomerados, la clave taxonómica virtual propuesta (Anexo 7) está compuesta por los caracteres (extensión del parche amarillo, coloración del pico, presencia de una corona verde-azulada y las medidas morfométricas) que permitieron la formación de agrupaciones (no compactas) correspondientes a las subespecies morfológicas (Anexo 5). Los índices de Jaccard, Sokal y Michener y el índice de XPER, sugieren que los caracteres elegidos tienen un alto grado de discriminación (Anexo 6), pues en un solo paso se diferencian las tres subespecies, indicando que efectivamente se eligieron los caracteres menos lábiles y ambiguos.

Una tercera explicación de la falta de diferenciación morfométrica, puede tener origen en eventos de hibridación entre subespecies. Posiblemente, la pérdida de hábitat y ampliación de la barrera agrícola, han permitido la extensión de los rangos de distribución de las subespecies, favoreciendo que entren en contacto, similar a lo reportado por Bedoya & Murillo (2012) para *Ramphocelus flammigerus* en el Valle del Cauca. Sin embargo, el fenotipo de los híbridos es impredecible, por lo que vale la pena abordar esta posible causa desde la genética.

En aves, el concepto de subespecie ha generado polémica debido a que en muchos casos las subespecies sólo representan ejemplos de variación geográfica, pues no se cuenta con caracteres diagnósticos consistentes que permitan su discriminación adecuada (Cabrera-Huerta et al. 2018). En Colombia no hay trabajos que aborden esta problemática taxonómica a pesar de la importancia que implica una identificación intraespecífica adecuada para la liberación responsable y conservación de las los animales decomisados. Por esta razón resulta de gran importancia realizar estudios en sistemática molecular, particularmente en el caso de las subespecies de *A. ochrocephala* nativas de Colombia y así confirmar que correspondan a las agrupaciones genéticas.

Estandarización:

Es probable que la ausencia de amplificadores al utilizar los extraídos con Chelex, se deba a la contaminación y baja pureza de los mismos. Por un lado, el Chelex es una resina quelante que utiliza el intercambio iónico para unirse a iones de metales de transición como cationes Mg^{2+} (cofactor

esencial para la activación de las ADNasas). Al secuestrar los iones de magnesio, este protege a la muestra de las ADNasas que pueden permanecer activas, incluso después de la ebullición. De esta forma se evita la degradación del ADN (Singh et al. 2018). Sin embargo, no se eliminan los inhibidores (como el grupo hemo) que pueden ser perjudiciales en procesos posteriores (Phillips et al. 2012).

Por otro lado, el protocolo de extracción con Kit sigue cuatro pasos principales: lisis de las membranas, unión del ADN a la columna de centrifugación, lavado de contaminantes y elución del ADN (Phillips et al. 2012). Durante el proceso de centrifugación, el ADN se une selectivamente a la membrana y se eliminan los contaminantes e inhibidores enzimáticos como las proteínas y los cationes divalentes, a medida que pasan al fondo del tubo (Qiagen 2006). Es por esta razón que el ADN de los extraídos con el kit QIAGEN presentaron una relación 260/280 de 1.87 en promedio (ADN puro), mientras que esta proporción para los extraídos con Chelex fue de aproximadamente 1.49, relación apreciablemente más baja, probablemente debido a la presencia de proteínas u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm (Thermo Scientific 2008).

Aunque el aislamiento del ADN genómico con la resina Chelex es más rápido y económico, el ADN obtenido por este método contiene impurezas suspendidas que pueden provocar la degradación del mismo en el almacenamiento a largo plazo y la inhibición de la PCR (Singh et al. 2018). Adicionalmente se ha demostrado que los desechos orgánicos en forma de proteínas, como la hemoglobina en la sangre y otros compuestos (lactoferrina, IgG y mioglobina), inhiben la actividad de la polimerasa durante las reacciones de PCR (Al-Soud & Rådström 2001), lo que explica la ausencia de amplificadores utilizando este método de extracción.

Cabe resaltar que los extraídos con Chelex se tornaron viscosos días después de terminar el procedimiento de extracción. Algo similar sucedió durante la extracción con kit, donde se evidenció la formación de un coágulo que fue descartado durante el procedimiento de purificación. La formación de este coágulo, así como la viscosidad de las muestras puede indicar un problema del anticoagulante utilizado para el transporte y almacenamiento de las muestras. No obstante, el riguroso procedimiento de lavado en el método de extracción con kit hizo posible la eliminación a tiempo del coágulo, cosa que por la naturaleza del método de extracción con Chelex no fue posible.

Este fenómeno de coagulación puede atribuírsele a un problema en la manipulación de la sangre al depositarse en el tubo: si el volumen de sangre sobrepasa el nivel indicado en el tubo, la muestra se puede coagular. Adicionalmente, la muestra se debe mezclar al menos 10 veces seguidas asegurándose que la sangre tenga contacto con todas las paredes del tubo donde se encuentra el anticoagulante (Muñoz et al. 2016). Hay que considerar además que, durante la toma de muestras, factores como la selección de la aguja y la jeringa inadecuadas, o múltiples punciones en el mismo vaso sanguíneo (común en extracción de sangre a loros) pueden afectar a la muestra. Muñoz et al.

(2016) recomiendan el uso de tubos con EDTA para la extracción de ADN de mamíferos y aves galliformes, mientras que recomiendan la heparina para todas las especies de aves. A su vez Martínez et al. (2009) reportan que el EDTA no es la mejor elección si el almacenamiento de la muestra es prolongado e indican que en aves muy pequeñas o muestras insuficientes el EDTA puede producir hemólisis. Es probable que alguno, o varios de estos factores no hicieran posible la extracción adecuada de ADN utilizando el Chelex. Por lo tanto, se recomienda utilizar heparina como anticoagulante, en lugar de EDTA para estudios posteriores.

Respecto a las temperaturas óptimas de anillamiento para las reacciones de PCR, se recomienda utilizar 58.2 °C para el gen *COI*, dado que las temperaturas de 52.9 °C y 49.0 °C generaron dos bandas al momento de verificar los amplificadores en la electroforesis. Estas bajas temperaturas pueden resultar inespecíficas para la hibridación de los primers con el ADN de las muestras, pues anillaron con secuencias diferentes a la que se querían evaluar.

Conclusiones

Los caracteres que parecen tener un mayor poder de discriminación en la identificación de individuos decomisados de *A. ochrocephala*, son la extensión del parche amarillo, la presencia de la corona verde-azulada y la coloración del pico, caracteres que permitieron la agrupación no compacta de individuos de una misma subespecie (Anexo 5). Las medidas morfométricas pueden apoyar estos caracteres, pero no generan por sí solas la formación de unidades poblacionales que permitan la identificación taxonómica de las subespecies evaluadas (Anexo 4). La posibilidad de hibridación entre las subespecies, así como la incertidumbre en la determinación de las poblaciones hacen necesario abordar un estudio en sistemática molecular en donde se utilicen los marcadores moleculares y las condiciones propuestas en la presente estandarización. Utilizar los caracteres morfológicos presentados en la clave taxonómica virtual, favorecerá una determinación taxonómica más acertada, reduciendo los riesgos asociados con la liberación de los individuos decomisados. Así mismo una futura validación molecular, permitirá una mejor comprensión de la historia filogenética y la taxonomía del grupo, esenciales para la conservación de *A. ochrocephala*.

Agradecimientos.

A mi mamá, por su amor, trabajo y sacrificio todos estos años. A mi papá y hermanos por los consejos y el cariño recibido en todo momento. A mi sobrina Abigail, que viene en camino y espero le guste la ciencia. A las amistades y el amor por las buenas anécdotas y el apoyo incondicional. A mis bromelias por permitirme crecer junto a ellas.

Agradezco profundamente a mi directora Myreya Pinedo y codirector Felipe Espinosa, gracias a su esfuerzo, dedicación y paciencia hoy puedo culminar este trabajo. A la Pontificia Universidad Javeriana y sus profesores, en especial al profesor Germán Jiménez.

Agradezco también a la CARDER, por su interés y buena disposición para llevar a cabo el proyecto. A todo el personal del hogar de paso CARDER- APAP, sin su ayuda y afecto no hubiera sido posible. Al laboratorio de genética y biología molecular Ltda., por el suministro de la genTaq. Y a todos quienes contribuyeron para culminar con éxito esta etapa.

Bibliografía

Ai L, Liu J, Jiang Y, Guo W, Wei P, Bai L (2019) Specific PCR method for detection of species origin in biochemical drugs via primers for the *ATPase 8* gene by electrophoresis. *Microchimica Acta* 186(9), 634 doi 10.1007/s00604-019-3738-5

Al-Soud WA, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of clinical microbiology* 39(2), 485-493 doi 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001

Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G (2000) Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the *ATPase 6* gene encoding subunit a. *The Journal of biological chemistry* 275(6), 4177–4182 doi 10.1074/jbc.275.6.4177

Bargalló F, Moura, AS, García C, Ronda G, Silvestre M (2014) Picaje en aves psitácidas. <http://axonveterinaria.net/web>. Consultado el 15 de Mayo de 2020.

Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR (1998) Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology*, 249(2), 453–459 doi 10.1006/viro.1998.9324

Bedoya J, Murillo O (2012) Evidencia morfológica de hibridación entre las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Passeriformes: Thraupidae) en Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 60(1), 75-85

Bello J, Báez M, Gómez M, Orrego O, Nagele L (2014) Biodiversidad 2014. Estado y Tendencias de la Biodiversidad Continental de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá D.C, Colombia

BirdLife International (2018) *Amazona ochrocephala*. The IUCN Red List of Threatened Species. Consultado en Marzo 7 de 2020

Cabrera-Huerta M, Ruiz-Campos G, Cueva H, Unitt P, León D, García-De León F (2018) Variación fenotípica infraespecífica de la codorniz de California (*Callipepla californica*, Aves: Odontophoridae) de la península de Baja California, México. *Huitzil*, 19(2), 180-204 doi 10.28947/hrmo.2018.19.2.343

- Corantioquia (2008) Caracterización de poblaciones de psitácidos en el valle de Aburrá-Antioquia
- Divya PR et al. (2015) Mitochondrial ATPase 6/8 genes to infer the population genetic structure of silver pomfret fish *Pampus argenteus* along the Indian waters. *Mitochondrial DNA*, 26(2), 189-194 doi 10.3109/19401736.2013.879655
- Eberhard JR, Bermingham E (2004) Phylogeny and Biogeography of the Amazona ochrocephala (Aves: Psittacidae) Complex. *The Auk*, 121(2), 318–332. doi 10.2307/4090396
- Forshaw JM (1989) *Parrots of the World*. Blandford Press, Londres, UK
- Hammer O (2012) PAST Paleontological STatistics Version 2.17 Reference Manual. Natural History Museum, University of Oslo, 229.
- Hanapi UK, Desa MN, Ismail A, Mustafa S (2015) A higher sensitivity and efficiency of common primer multiplex PCR assay in identification of meat origin using NADH dehydrogenase subunit 4 gene. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4166-4175 doi 10.1007/s13197-014-1459-7
- Hebert P, Stoeckle M, Zemplak T, Francis C (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2, 1657-1668
- Hoppe D. (1992) *The World of Amazon Parrots*. Tfh Pubns Inc, Montreal, CA, pp 76-78
- Howell S, Webb S (1995) *The Birds of Mexico and Northern Central America*. Oxford University Press, New York, USA
- Ivanova N, Grainger G (2007) *COI* amplification protocol. Canadian Centre for DNA Barcoding. Consultado el 15 de Mayo de 2020.
- Jiménez I, Cadena C (2004) Porque no liberar animales silvestres decomisados. *Ornitología Colombiana* No2 :53-57
- Juniper T, Parr M (1998) *Parrots: A Guide to Parrots of the World*. Yale University Press, Connecticut, USA
- Lancheros-Piliago D, Fernández JH (2013) AMDAR y PCR-extra-rápida para la identificación de la tortuga cabezona *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae) utilizando el gen mitocondrial *Citocromo c oxidasa I (COI)*. *Universitas Scientiarum*, 18(3), 321-330
- LIS. (s.f.) XPER2: an open tool to manage descriptive data. Laboratoire Informatique & Systématique. https://infosyslab.fr/?q=en/resources/software/cai/xper2/documentation_en. Consultado en Mayo 19 de 2020.

- Lousada S, Howell S (1996) Distribution, variation, and conservation of Yellow-headed Parrots in northern Central America. *Cotinga* 5:46-53
- Martínez G, Benavides R, Osorio H (2009) El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas. *Biosalud*, 8(1), 178-188
- Minambiente [Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial] (2010). <https://www.minambiente.gov.co/>. Resolución No. 2064 del 21 de octubre de 2010. Consultado en Marzo 4 de 2020
- Muñoz C, Rendón E, López O, et al. (2016) Colecta y conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo. Universidad autónoma metropolitana, México.
- Pass A, Perry R (1984) The pathology of psittacine beak and feather disease. *Australian Veterinary Journal*, 61(3), 69-74 doi 10.1111/j.1751-0813.1984.tb15520.x
- Phillips K, McCallum N, Welch L (2012) A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic science international. Genetics*, 6(2), 282–285 doi 10.1016/j.fsigen.2011.04.018
- Pinedo-Castro MO (2017) Genética de poblaciones molecular de los primates del género *Lagothrix* (Atelidae; Platyrrhini; Primates): La posición sistemática del taxón *tschudii* y la estructura espacial en *L. l. poeppigii* mediante secuencias mitocondriales. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Pinedo-Castro MO (2017a) Filogeografía comparativa de cinco taxones de felinos neotropicales (Jaguar, *Panthera onca*; Jaguarundi, *Puma yagouaroundi*; Ocelote, *Leopardus pardalis*; Margay, *Leopardus wiedii* y el complejo de especies de tigrillos; Felidae, Carnivora, Mammalia) mediante análisis del ADN mitocondrial. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Qiagen AG (2006) DNeasy© blood and tissue handbook. Qiagen AG, Hombrechtikon, Switzerland. Consultado en Febrero 10 de 2020
- Restrepo-Roda D, Pulgarín-Restrepo P (2017) Dinámicas de los loros en cautiverio en Colombia: tráfico, mortalidad y liberación. *Ornitología Colombiana*, 16: eA06-1
- Ribas C, Gaban-Lima R, Miyaki C, Cracraft J (2005) Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *Journal of Biogeography*, 32(8), 1409-1427 doi 10.1111/j.1365-2699.2005.01289.x
- Ribas C, Joseph L, Miyaki C (2006) Molecular systematics and patterns of diversification of the *Pyrrhura* parakeets (Aves: Psittacidae) with special reference to the *P. picta*/*P. leucotis* complex. *The Auk* 123(3), 660–680 doi 10.1642/0004-8038(2006)123[660:MSAPOD]2.0.CO;2

Ribas C, Tavares E, Yoshihara C, Miyaki C (2007) Phylogeny and biogeography of Yellow-headed and Blue-fronted Parrots (*Amazona ochrocephala* and *Amazona aestiva*) with special reference to the South American taxa. *Ibis*, 149(3), 564–574 doi 10.1111/j.1474-919X.2007.00681.x

Rodríguez J, Hernández J (2002). Loros de Colombia. Conservación Internacional de Colombia (Vol.3). Bogotá, Colombia pp 29-116

Rosales S (2012) Evaluación y monitoreo etológico de Psitácidos en el Centro de Rescate de ARCAS, Petén. Tesis de pregrado, Universidad del valle de Guatemala, Guatemala

Rosli MK, Zamzuriada AS, Syed-Shabthar SM, Mahani MC, Abas-Mazni O, Md-Zain BM (2011) Optimization of PCR conditions to amplify *Cyt b*, *COI* and *12S* rRNA gene fragments of Malayan gaur (*Bos gaurus hubbacki*) mtDNA. *Genetics and molecular research :GMR*, 10(4), 2554-2568 doi 10.4238/2011

Russello M, Amato G (2004) A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2), 421–437 doi 10.1016/S1055-7903(03)00192-1

Thermo Scientific (2008) 260/280 and 260/230 Ratios. T009-Technical Bulletin, 302-479-7707

Singh UA, Kumari M, Iyengar S (2018) Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological procedures online*, 20(1), 12 doi 10.1186/s12575-018-0077-6

Templeton A (1986). Coadaptation and outbreeding depression. In: Soulé (ed) *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp 105-116

Urantówka A, Mackiewicz P, Strzał T (2014) Phylogeny of *Amazona barbadensis* and the Yellow-Headed Amazon complex (Aves: Psittacidae): A new look at South American parrot evolution. *PLoS one*, 9(5) doi 10.1371/journal.pone.0097228

Anexos: Tablas y figuras.

Anexo 1. Integración de caracteres utilizados para la identificación de las subespecies de *A. ochrocephala* y medidas morfométricas observadas y esperadas para las subespecies. El valor de Ltot es un promedio entre los individuos muestreados, Lala, Lcola y CC está presentado en un intervalo de valor mínimo y máximo. Datos tomados de Forshaw (1989) y Hoppe (1992).

Característica	<i>A. o. ochrocephala</i>		<i>A. o. nattereri</i>		<i>A. o. panamensis</i>	
	Esperados	Observados	Esperados	Observados	Esperados	Observados
Ltot *(mm)	360	357.2	380	365.3	350	347
Lala*(mm)	210 – 220	196 - 232	221 – 235	200 -244	191 – 215	198 - 228
Lcola* (mm)	109 – 121	115 - 176.6	115 – 120	114 - 135.9	94 – 109	114.9 - 137.6
CC* (mm)	32 – 37	13.5- 45	32 – 34	30.6 - 40.4	29 – 33	33.2 - 38.6
Frente	Parche amarillo extenso	Observado	Parche amarillo menos extenso que <i>A.o.ochrocephala</i> .	Observado	Área amarilla más pequeña hacia amarillo verdoso. Cuenta con una corona verde-azulada	Observado
Mejillas	Verde amarillento o verde esmeralda	No observado	Verde azulado	No observado	No aplica	No observado
Coberteras auriculares	Verde amarillento o verde esmeralda	No observado	Verde azulado	No observado	No aplica*	No aplica*
Pico	Gris con los lados rojizos	Observado	Gris con los lados amarillentos o rosados	Observado	Gris amarillento con la punta oscura	Observado
Pecho	Verde amarillento	No observado	Verde oscuro	No observado	Verde claro	No observado
Curva del ala	Rojo	No observado	Rojo menos extenso	No observado	Rojo más extenso	No observado

Peculiaridades	No aplica	-Más grandes que las otras subespecies. -Coloración verde más oscura. -Plumas de la cola más largas	-Coloración verde más claro -Pico más pequeño.
----------------	-----------	---	---

*Ltot= Longitud total, Lala= Longitud del ala, Lcola= Longitud de la cola, CC= Culmen curvo.

*No aplica= No se ha reportado información para esa subespecie.

Anexo 2. Resultados de la prueba χ^2 para cada variable por subespecie.

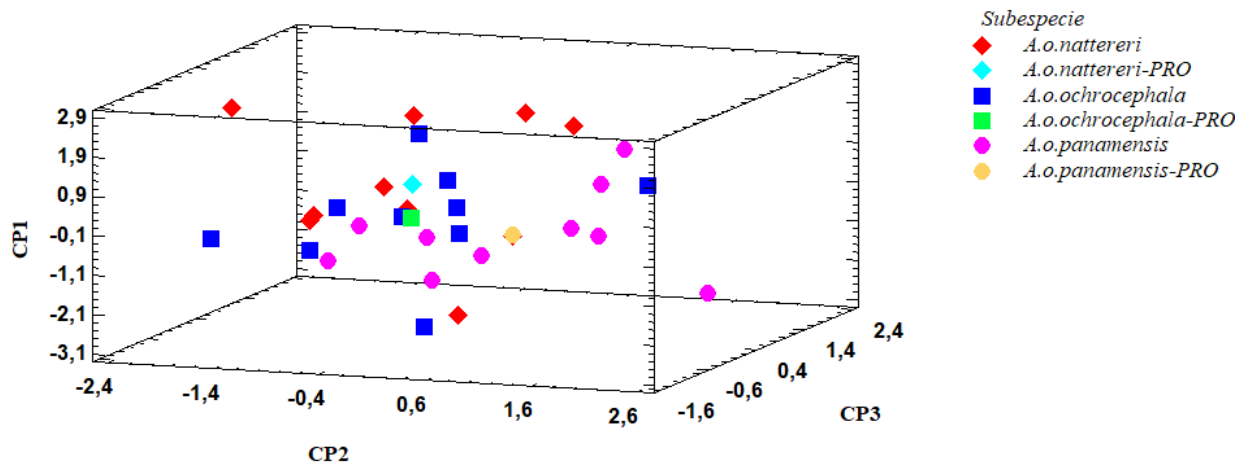
Carácter/ Subespecie	<i>A. o. panamensis</i>	<i>A. o. ochrocephala</i>	<i>A. o. nattereri</i>
Ltot	21.10	15.24*	19.13
Lala	180.13	4.05*	10.54*
Lcola	65.17	14.85*	15.66*
CC	65.59	15.49**	27.09

*p<0.05

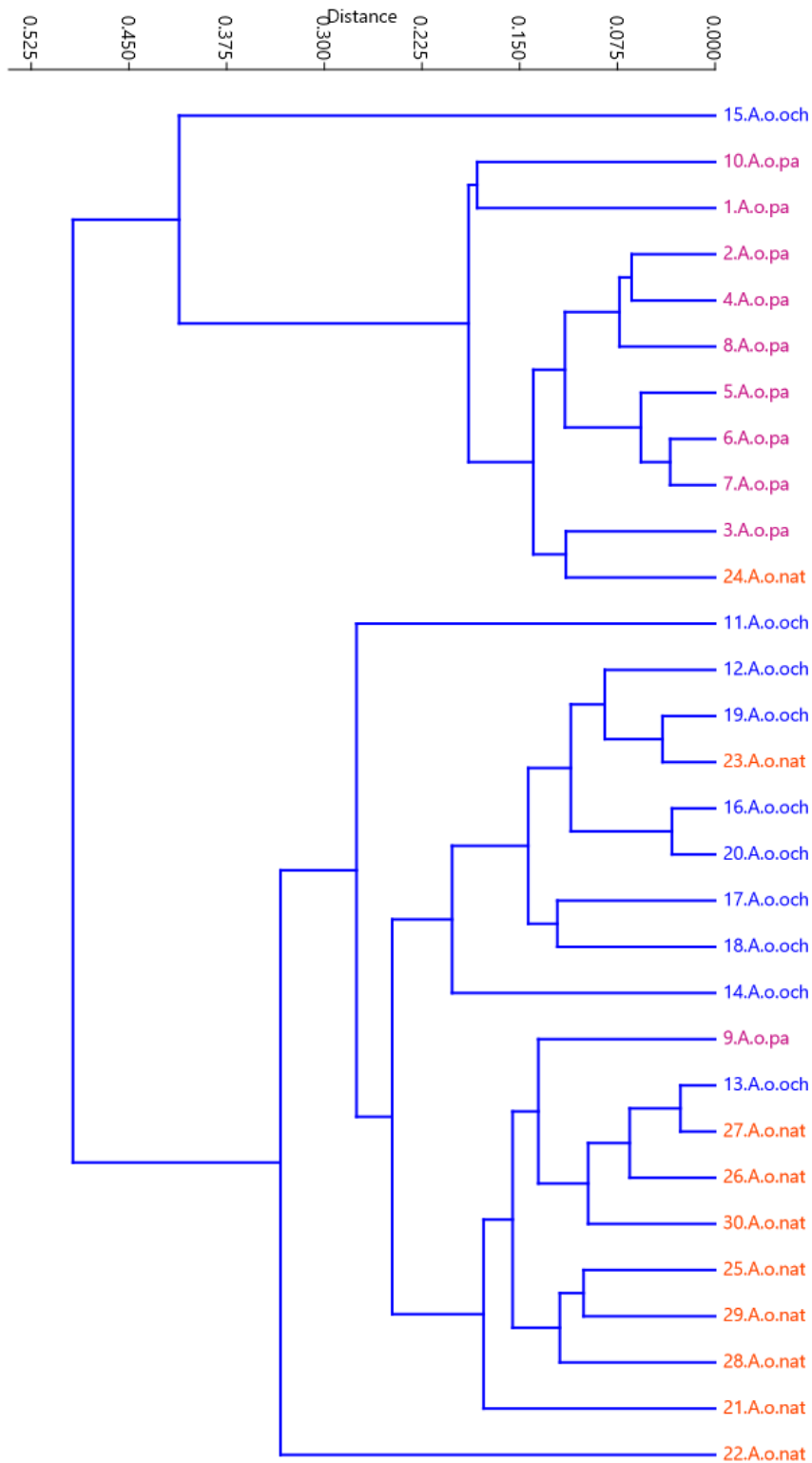
Nueve grados de libertad

Anexo 3. Peso de las variables en los componentes principales (CP)

Variable/Componente	CP1	CP2	CP3
Ltot	0.35772	-0.692759	-0.578596
Lala	0.608816	-0.205691	0.338114
Lcola	0.602007	0.212336	0.392112
CC	0.372783	0.657791	-0.630201



Anexo 4. Diagrama de dispersión de los tres componentes principales que explican el 88% de variabilidad de la muestra. No se evidencia la separación de subespecies en tres grupos definidos. Las subespecies acompañadas de -PRO hacen referencia al individuo ideal hipotético de cada subespecie, calculado a partir del promedio de cada medida morfométrica para la subespecie correspondiente.



Anexo 5. Análisis de conglomerados. Dendrograma obtenido a partir de los caracteres cualitativos y cuantitativos utilizando la distancia de Gower y el algoritmo de agrupación UPMAG. Los individuos del 1 al 10 pertenecen a la subespecie *A. o. panamensis* (A.o.pa, en rosado), los individuos del 11 al 20 pertenecen a la subespecie *A. o. ochrocephala* (A.o.och, en azul). Los individuos del 21 al 30 corresponden a la subespecie *A. o. nattereri* (A.o.nat en naranja).

Anexo 6. Lista de caracteres con su poder discriminatorio.

Carácter	Índice XPER	Índice Sokal y Michener	Índice Jaccard
Extensión del parche amarillo	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)
Presencia de corona verde-azulada	2/3 (0.67)	2/3 (0.67)	2/3 (0.67)
Coloración del pico	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)
Longitud total	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)
Longitud del ala	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)
Longitud de la cola	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)
Culmen curvo	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)
Distribución	3/3 (1.0)	2/3 (0.67)	3/3 (1.0)

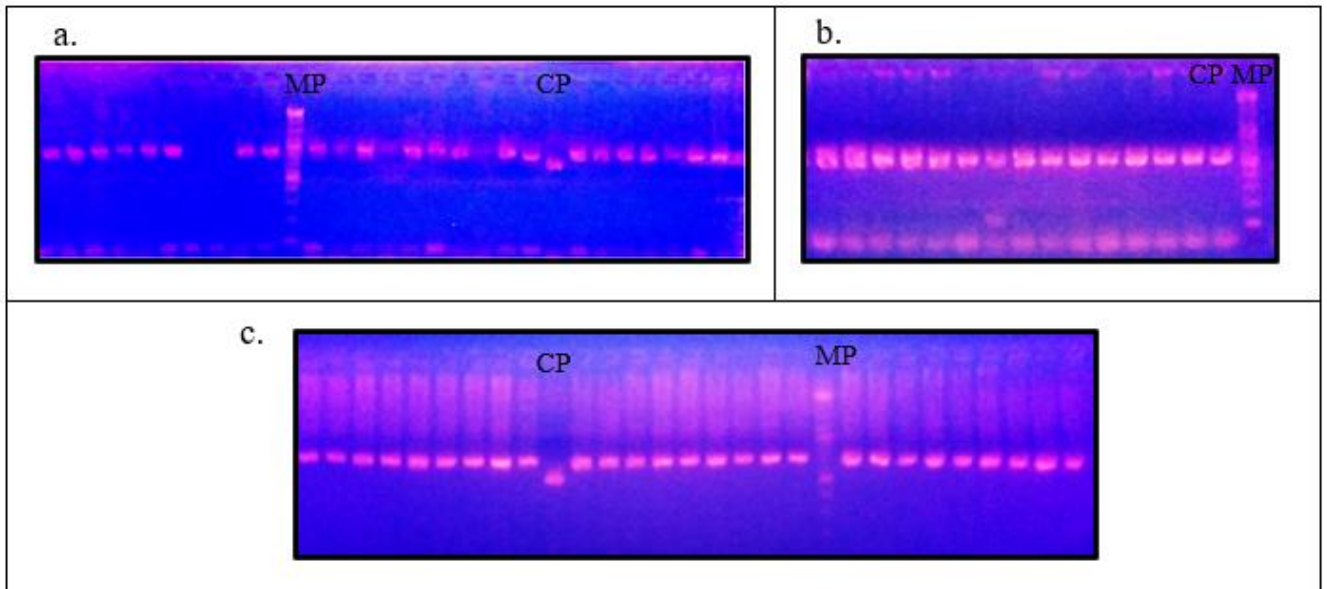
The image shows a screenshot of a taxonomic key software interface with four main panels:

- LISTA DE TAXONES: SUBESPECIES (Red border):** Lists three subspecies: 1. A.o. panamensis, 2. A.o. ochrocephala, and 3. A.o. nattereri.
- CARACTERES (Purple border):** Lists 10 descriptors: 1. Extensión del parche amarillo, 2. Corona verde-azulada, 3. Coloración del pico, 4. Longitud total, 5. Longitud del ala, 6. Longitud de la cola, 7. Culmen curvo, 8. Distribución, 9. Ancho de comisura, and 10. Culmen total.
- ESTADOS DE CARACTER (Orange border):** Shows the 'Estados' section for 'Parche pequeño', with 'Parche pequeño' selected and 'Parche mediano' and 'Parche grande' unselected.
- Definición e imágenes de los taxones (Blue border):** Provides a definition for 'A.o. panamensis' and includes three images of the subspecies: '1. Parche pequeño', '1. Parche mediano', and '1. Parche grande'.

Anexo 7.

Clave taxonómica virtual para la identificación de las tres subespecies de *Amazona ochrocephala* nativas de Colombia. La clave cuenta con: 1) la lista de los caracteres propuestos (cuadro morado), 2) Definiciones e imágenes de los caracteres propuestos (cuadro verde) 3) los posibles estados que puede adoptar cada carácter (cuadro naranja), 4) las definiciones de cada estado de carácter e

imágenes orientadoras (cuadro amarillo), 5) la lista de taxones a determinar (cuadro rojo) y 6) la definición e imágenes de estos taxones (cuadro azul).



Anexo 8. Geles de electroforesis con amplificados de cada marcador mitocondrial. **a.** Amplificados para el gen *ND2* a 59° C con 0.5 μ L de ADN. **b.** Amplificados del gen *ATPasa 6* a 59° C con 2 μ L de ADN. **c.** Amplificados del gen *COI* a 49° C con 2 μ L de ADN. MP= marcador de peso, y CP = control positivo.