

# **Estandarización de condiciones de amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial de especímenes colombianos del perico carisucio (*Eupsittula pertinax*)**

Paz-Cortés Daniela Noemí<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. [daniela.paz@javeriana.edu.co](mailto:daniela.paz@javeriana.edu.co)

## **Resumen**

*Eupsittula pertinax* se encuentra dentro de las aves con mayor número de incautaciones en la escena del tráfico ilegal en Colombia. Estos especímenes de ser liberados retornarían a los rangos de distribución de la especie, sin embargo, morfológica y geográficamente no hay certeza sobre la subespecie a la que pertenecen. El uso de herramientas moleculares podría solucionar este vacío de conocimiento, para este propósito se estandarizaron las condiciones de la PCR para cuatro marcadores mitocondriales (*COI*, *12S*, *16S* y *ND2*) que a futuro sean base para la identificación de las subespecies de *E. pertinax*. Se extrajo el ADN de 33 individuos, a partir de las almohadillas plantares y uñas de ejemplares de colecciones biológicas (12) y sangre de individuos decomisados por tráfico residentes en hogares de paso (21). Se estandarizaron las temperaturas de hibridación óptimas para los primers de cada marcador. Se obtuvieron en total 33 secuencias correspondientes a 14 individuos de *E.pertinax* y uno de *Aratinga weddellii*. Se realizaron análisis de distancias de estas secuencias mediante árboles *Neighbor Joining* (NJ) individuales para cada marcador como para concatenaciones entre marcadores.

## **Palabras clave**

Psittacidae, PCR, extracción de ADN, colecciones biológicas, análisis de distancias.

## **Introducción**

El tráfico de fauna silvestre es una de las principales amenazas que afectan a las poblaciones de la familia Psittacidae en Colombia (Restrepo-Rodas & Pulgarín-Restrepo, 2017). Dentro de este grupo taxonómico *Eupsittula pertinax* (Lineo 1758) también conocida como “perico carisucio” se encuentra como una de las especies con mayor frecuencia en las cifras de incautación de especímenes por parte de las autoridades ambientales en el país (Rodas et al., 2016). Las razones que motivan la extracción de estas aves de sus hábitats para el comercio ilegal incluyen la tenencia de estos animales como mascotas, ya que como otros psitácidos, son capaces de reproducir vocalizaciones humanas y presentan un plumaje con coloraciones atractivas. Aunque otras amenazas se consideran prioritarias respecto a la conservación de las aves en

Colombia tal como la fragmentación y pérdida del hábitat (Berkunsky et al., 2017; Botero-Delgado & Páez 2011), la presión que genera el tráfico ilegal de fauna silvestre es una amenaza activa.

Los individuos que son decomisados por las autoridades competentes son trasladados a centros de recepción o atención de fauna silvestre, o a los denominados hogares de paso (Lamprea-Maldonado et al., 2019), Estas instituciones son cruciales ya que de estas dependerá la disposición final de los individuos que son acogidos allí. Hay tres destinos principales para los incautados: la liberación de los individuos, la recepción en bioparques o zoológicos, y finalmente la eutanasia (Lamprea-Maldonado et al., 2019). En los casos donde se opta por la liberación, una consideración que es vital para este proceso es tener certeza de la subespecie a la que pertenece un individuo dadas las consecuencias negativas de liberaciones en áreas geográficas erróneas (Jiménez & Cadena, 2004). Liberaciones equívocas pueden causar alteraciones en la estructura genética de las poblaciones, atenuación o eliminación de diferencias entre subespecies y la pérdida de adaptaciones locales que suelen tener estas categorías taxonómicas a su entorno (Jiménez & Cadena, 2004; Bosnjak et al., 2013). Las Corporaciones Autónomas Regionales tienen grandes retos al realizar una liberación adecuada de los individuos y esta resulta aún más crítica si se trata de una especie con subespecies como lo es el caso de *E. pertinax*.

*E. pertinax* posee 14 subespecies en total con una distribución desde el occidente de Panamá, las islas de Bonaire, Aruba, Curazao, St Thomas, St. Croix, Tortuga, Margarita norte de Venezuela, Guyana y Surinam hasta el nororiente de Brasil (Rodríguez-Mahecha y Hernández-Camacho 2002). Cuatro de ellas distribuidas en territorio colombiano. *E. p. aeruginosa* (Linnaeus, 1758) con un rango de distribución al norte de Colombia desde la costa caribeña al sur, en medio del Valle del río Magdalena, hasta el norte del departamento de Santander, y al este a través de la Península de la Guajira. *E. p. lehmanni* (Dugand, 1943) descrita principalmente por los llanos del Meta con distribución por el centro y este de Colombia, al este de Los Andes, desde Casanare al sur hasta el extremo norte del Vaupés y al este hasta el río Orinoco en el oeste del Amazonas. *E. p. griseipecta* (Meyer de Schauensee, 1950) con distribución conocida únicamente en el Valle del Río Sinú, Córdoba y *E. p. chrysogenys* (Massena & Souance, 1854) propia del departamento de Guainía (Forshaw, 1989; Clements, J. F. 2007). Los caracteres que han diferenciado a estas subespecies han sido exclusivamente morfológicos. Estos incluyen al plumaje (principalmente la extensión de coloración en la cola y coronilla) como también algunas medidas morfométricas tal como la longitud de la cola (Forshaw, 1989; Dugand, 1943). Sin embargo, estos caracteres pueden ser muy variables, incluso entre individuos que compartan la misma localidad, tampoco tienen en cuenta la variación entre los individuos adultos y juveniles. Es así como los caracteres morfológicos usados en esta especie presentan limitaciones para proponer características diagnósticas en

grupos poco diferenciados como las subespecies. Una solución a esta limitante son los análisis genético-moleculares que utilizan como carácter de identificación al ácido desoxirribonucleico (ADN). Para este propósito los estudios con marcadores moleculares mitocondriales han demostrado ser una opción óptima para determinar lo que está ocurriendo evolutivamente dentro de un taxón (Urantowka et al., 2017; Tavares et al., 2006).

Retomando la problemática planteada respecto a la liberación de especímenes, una solución posible para este problema incluiría una base de datos con marcadores moleculares asociados a coordenadas geográficas de las cuales puedan compararse estas entradas respecto a las muestras de ADN de un individuo candidato a liberación. Desafortunadamente, esta base de datos aún no existe, sin embargo, una fuente de material genético con gran potencial y con uso en crecimiento en la ornitología, corresponde a los museos y colecciones biológicas (Edwards et al., 2005). El uso de este material es muy valioso y hace innumerables contribuciones a la ciencia y a la sociedad, entre ellas las relacionadas a las investigaciones en sistemática y filogenética molecular de las aves (Funk, 2018). Este valor se ve reflejado por ejemplo desde el estudio de especies raras o extintas hasta estudios sobre la estructura genética de las poblaciones en estudio (Payne & Sorenson, 2002; Habel et al., 2013). Toda una serie de ventajas se relacionan a su uso dado que estas poseen datos de distribución geográfica que a la larga traen nuevos conocimientos e información a medida que las técnicas moleculares avanzan y nuevas preguntas de investigación son planteadas (Payne & Sorenson, 2002; Astrin et al., 2013).

Este estudio tiene como objetivo estandarizar las condiciones de PCR para cuatro marcadores mitocondriales (*COI*, *12S*, *16S* y *ND2*) para *E. pertinax* a partir de muestras de tejidos de especímenes depositados en colecciones biológicas y museos al igual que de individuos provenientes de centros de recepción de fauna. Esto con propósito de apoyar una futura identificación molecular de las subespecies como la construcción de esta base de datos que ayudaría en los procesos de liberación de las aves incautadas.

## **Materiales y métodos**

Un total de 33 muestras de especímenes de *E. pertinax* fueron utilizadas para este estudio. De este total, 12 corresponden a tejidos de piel y uñas procedentes de especímenes depositados en el Museo de Ciencias Naturales de La Salle (9) y del Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana (3) tres muestras colectadas para los departamentos de Guajira, Córdoba y Atlántico, y el resto colectadas para Meta (**Anexo 1**). Los 21 restantes son muestras de sangre provenientes de individuos del Centro de recepción y rehabilitación de Fauna Silvestre (CRRFS) de la Secretaría Distrital de Ambiente (SDA),

Bogotá D.C. Algunas de estas muestras correspondieron a lo trabajado por Acevedo (2019) y Escobar (2020) (**Anexo 2**). Adicional a esto se hizo el procesamiento en laboratorio de tres muestras de sangre de pericos canosos, *A. weddellii* esto con el propósito de usar sus secuencias como grupo externo o *outgroup* en los análisis de distancias.

#### *Obtención de muestras*

La obtención de las muestras de especímenes de museos se basó en el trabajo realizado por Töpfer y colaboradores (2011). Los especímenes fueron colocados en una hoja de papel limpia y fueron muestreados individualmente. Muestras de las almohadillas plantares de los loros fueron removidas de cada espécimen utilizando un bisturí estéril, cada vez que se removiera tejido de un individuo distinto las cuchillas eran desinfectadas con etanol absoluto y cuando fue necesario se reemplazó la cuchilla por una nueva. Las muestras de las almohadillas fueron removidas de una de las dos patas del animal y procurando no dañar al espécimen. Una vez extraídas las almohadillas fueron pesadas inmediatamente con una balanza digital portátil buscando alcanzar un peso mínimo de 25 mg.

#### *Procesamiento de muestras en laboratorio*

Las muestras de almohadillas plantares, sangre y uñas fueron extraídas a partir de tres métodos distintos: extracción inorgánica con resina quelante al 20% (Chelex 100 TM Walsh et al., 1991), extracción orgánica con fenol-cloroformo (Sambrook et al., 1989) y finalmente con kit comercial (DNeasy tissue and blood de QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad inicial de la muestra fue tenida en cuenta para seleccionar el método de extracción de ADN para cada una de estas. Los extraídos de ADN fueron cuantificados con el espectrofotómetro/fluorómetro DS 11 de DeNovix.

#### *Primers utilizados*

Para el fragmento de 669 pb del gen citocromo oxidasa I (*COI*) fue amplificado con BirdF1 (TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC) y COIbirdR2 (ACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCAGAA) (Schindel et al., 2011). La porción de 398 pb del gen *12S* se utilizó el par L1735 (GGATTAGATACCCCACTATGC); H2170 (AGGGTGACGGGCGGTATGTACG) (Ribas & Miyaki, 2004). Para la región de 544 pb del gen *16S* se emplearon L2702 (CCTACCGAGCTGGGTGATAGCTGGTT), H3309 (TGCGCTACCTTCGCACGGT) (Ribas & Miyaki, 2004). Finalmente, para el gen *NADH* deshidrogenasa II (*ND2*) con una región de 868 pb se utilizó METB

(CGAAAATGATGGTTTAACCCCTTCC, L5233) ND2LSH (GGAGGTAGAAGAATAGGCYTAG, H6102) diseñados por Eberhard & Bermingham (2004).

#### *Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR*

Todas las reacciones contaron con un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 3  $\mu\text{L}$  de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), 1  $\mu\text{L}$  de cada cebador, 1  $\mu\text{L}$  de GenTaq polimerasa, 1  $\mu\text{L}$  mix dNTPs y volúmenes de ADN entre 1-7  $\mu\text{L}$  (58.245  $\text{ng}/\mu\text{L}$  – 407.715  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) de acuerdo con el protocolo manejado por el Laboratorio de Genética de Poblaciones Molecular y Biología Evolutiva (LGPMBE de la PUJ).

Para determinar la temperatura de anillamiento adecuada para cada conjunto de primers se realizaron gradientes de ocho temperaturas distintas. Para el gen *COI* el programa en el termociclador correspondió a una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s seguido de las temperaturas de anillamiento 45°C, 50°C, 51°C, 52°C, 55°C, 56°C, 56.2°C y 60°C reportadas en literatura para este marcador por 30 s (Pinedo-Castro 2017; Jaramillo-Castaño, 2020; Pabón-Viteri, 2016; Padilla-Jacobo et al., 2016) luego 72°C por 30 s finalmente la fase de extensión final a 72°C por 7 min. Para los marcadores *12S* y *16S* el ciclo en el termociclador correspondió al programa reportado por Ribas & Miyaki (2004) iniciando con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, un gradiente de temperaturas de anillamiento entre los 52°C y 56.5°C, seguido de una extensión a 72°C por 40 s y finalmente una extensión final a 72°C por 5 min. Para *ND2* el programa de amplificación siguió una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 34 ciclos de 95 °C por 30 s, el gradiente de temperaturas de anillamiento para este marcador incluyó las temperaturas 52°C, 52.5°C 53.3°C, 54.7°C, 56.3°C 57.6°C, 58.5°C y 59 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y una extensión final de 72 °C por 7 min (Pinedo-Castro 2017; Jaramillo-Castaño, 2020; Eberhard & Bermingham 2004).

#### *Electroforesis y visualización*

Para los amplificadores generados se realizaron corridas electroforéticas a 100 V por 60 minutos en geles de agarosa al 2%. La solución que permitió a los ácidos nucleicos desplazarse por la matriz de agarosa correspondió a buffer TBE (Tris-Borato EDTA) 0.5X asegurándose que el gel estuviese completamente sumergido en el líquido. Como agente intercalante se empleó bromuro de etidio al 3%. En cada pozo se agregó una mezcla de 4  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 2X y 4  $\mu\text{L}$  del amplificado, asimismo para tener referencia del tamaño de los fragmentos se utilizó el marcador de peso molecular Quick-Load® Purple 2-log DNA Ladder de BioLabs. Finalizada la corrida se visualizaron los geles en un transiluminador Vilber Lourmat, los amplificadores fueron guardados en nevera a -4°C.

## *Análisis de secuencias*

Posterior al procesamiento en laboratorio, los amplificadores de los cuales se visualizaron bandas al peso correspondiente y sin inespecificidades fueron seleccionados para secuenciar. Los amplificadores fueron trasladados a la sección Gene Core parte del Core facilities de la Universidad de Los Andes, la obtención de la secuencia de los fragmentos fue obtenida mediante secuenciación Sanger, analizado mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 3500 XL®. Se verificó mediante el algoritmo BLASTN que estas secuencias correspondieran a las secuencias de referencia depositadas en bases de datos (Zhang et al., 2000).

El alineamiento de las secuencias fue realizado de forma manual y con el método MUSCLE del programa MEGA versión 11.0 (Tamura K, Stecher G & Kumar S, 2021). También se realizaron alineamientos realizando concatenaciones entre las secuencias de los marcadores. Los árboles de distancia fueron construidos usando el método *Neighbor Joining* (NJ) ejecutado también en MEGA versión 11.0 (Tamura K, Stecher G & Kumar S, 2021) para el soporte de los árboles se escogió el método Bootstrap (BP) con 1000 iteraciones y para el modelo de sustitución nucleotídica se escogió el modelo de distancia-p.

## **Resultados**

### *Extracción de ADN*

Las muestras extraídas con el método inorgánico presentaron patrones particulares asociados al tipo de tejido extraído, para las muestras de almohadillas plantares la cuantificación para todas las muestras fue superior a los 900 ng/μL y una relación del espectro 260/280 entre 0.5 y 0.8. Respecto a las muestras de sangre extraídas por chelex, la cuantificación por espectrofotometría arrojó rangos de concentración entre 4-200 ng/μL y una relación 260/280 entre 0.8- 1.87. Respecto a las tres muestras de almohadillas que fueron extraídas por el método orgánico la cuantificación se encontró entre los 22-400 ng/μL de con un rango del espectro 260/280 entre 0.6-3. Los extraídos con kit comercial provenientes de uñas obtuvieron concentraciones entre 5-37 ng/μL y un rango de la relación 260/280 entre 0.3-1.02. (ver **Anexo 3**)

### *Estandarización condiciones de la PCR*

Para el gen *COI* se visualizaron bandas a las temperaturas de 51°C, 52°C, 56.2°C y 60°C del gradiente utilizado, pero se eligió 60°C como la temperatura de hibridación óptima ya que esta generó las bandas de mejor resolución. Para este marcador no se lograron visualizar bandas provenientes de muestras de especímenes de museos, pero se logró amplificar con este protocolo una muestra de *A. weddellii* (ver **Tabla 1**). La gran mayoría de muestras generaron bandas agregando entre 1-3 μL de ADN representando

concentraciones entre los 24,16 ng/μL - 72,48 ng/μL (**Anexos 4 y 8**). Los resultados del BLAST arrojaron rangos de porcentaje de identidad de las secuencias entre el 95.81% - 96.61%.

Para el gen *I2S*, la temperatura de anillamiento reportada por Ribas y Miyaki (2004) fue de 53°C, temperatura que para las muestras de *E. pertinax* dieron bandas inespecíficas por lo cual se realizó un gradiente buscando aumentar esta temperatura y encontrar una adecuada (ver **Anexo 8**). Con este gradiente también amplificaron las muestras en todas las temperaturas, pero se eligió a la temperatura de 56.2°C como la temperatura óptima dada la buena definición de las bandas y ausencia de inespecificidades. El gen *I2S* fue el único marcador del cual se lograron visualizar bandas de muestras provenientes de especímenes de museos ver **Tabla 1**. Para ambos tipos de tejidos se lograron visualizar bandas entre 1-2.5 μL de ADN concentraciones de 201,167 ng/μL -502,9175 ng/μL. En principio según lo reportado por Ribas y Miyaki (2004) el fragmento del gen *I2S* fue de 295 pb, pero en este caso se obtuvo un fragmento de alrededor de 400 pb (ver **Anexo 5**). Dada la diferencia entre las longitudes de estos fragmentos se presentaron dudas en torno al fragmento amplificado, estas dudas se disiparon con los resultados del BLAST con porcentajes de identidad de las secuencias obtenidas entre 98.45% a 99.48% frente a secuencias de *E.pertinax* depositadas en GenBank.

Para el gen *I6S* la temperatura de anillamiento de 53°C sugerida por Ribas y Miyaki (2004) no generó bandas por lo que se realizó un gradiente de 8 temperaturas (ver **Anexo 8**), la temperatura de 52°C fue seleccionada como la óptima donde se visualizaron bandas utilizando entre 1-7 μL de ADN representando concentraciones entre los 201,167 ng/μL -1,408,169 ng/μL (ver **Anexo 6**). Porcentajes de identidad de las secuencias en BLAST entre 97.98% - 99.80%.

Para el gen *ND2* en el gradiente realizado se presentaron bandas a lo largo de todo el gradiente, sin embargo, la temperatura óptima escogida fue la de 52°C ya que las bandas presentadas en las demás temperaturas se encontraron alrededor de los 300-400 pb mientras que el fragmento esperado a amplificar se encuentra por encima de 800 pb (Eberhard & Bermingham, 2004) La longitud real del fragmento amplificado es de 868 pb. Se lograron visualizar bandas agregando entre 1-5 μL de ADN a la reacción con concentraciones entre los 29,782 ng/μL -148,91 ng/μL (ver **Anexos 7 y 8**). Porcentajes de identidad de las secuencias en BLAST entre 94.76% - 98.28%.

#### *Análisis de distancias*

Para el árbol generado para el marcador *COI* se puede observar que la secuencia amplificada de *A. weddellii* queda claramente como grupo externo y de este se forman dos agrupaciones mayores que presentan el mismo ancestro. Esta primera agrupación (BP=39) conformada por cinco individuos del cual

AP831 es el hermano del segundo agrupamiento mayor (BP=29). De esta secuencia diverge el agrupamiento de la secuencia AP920 (BP=49), este a su vez hermano del subgrupo representado por la secuencia AP1062 (BP=37) y el último subgrupo (BP=50) conformado por dos secuencias (AP959 y AP1004) descendientes de AP1062.

La segunda agrupación mayor (BP=29), conformada por seis individuos (muestras AP004 a la AP1100) el que se subdivide en dos. La primera subdivisión (BP=77) está conformada por las dos secuencias hermanas de AP831. La segunda subdivisión (BP=31) tiene como secuencia ancestral a la muestra AP303 y de la cual diverge la agrupación de la secuencia AP1079 (BP=89). Por último, el agrupamiento del par AP1048 y AP004 (BP=55) las cuales son las secuencias menos cercanas a la muestra de *A. weddellii* (**Figura 1A**).

Para el marcador *I2S* de los cuales se logró amplificar ejemplares de museos (1304 y 1209) se observan dos grupos principales, uno de ellos conformado por la secuencia 1209 y otro conformada por el resto. De esta segunda agrupación encontramos dos subgrupos, el primero con un BP=53 conformado por dos secuencias y el segundo con un BP=78 establecido por ocho secuencias de las cuales AP920 está más diferenciada de las demás. Existe otro subgrupo con BP=100 del cual divergen los grupos con BP=42 y BP=66, cada uno de ellos establecidos con tres secuencias. El grupo de BP=61 de las secuencias AP1098 y AP303 fueron las más distantes respecto a las secuencias del museo. (**Figura 1B**).

Para el marcador *I6S* la secuencia de AP1079 conforma al grupo ancestral del cual divergen dos agrupaciones, la primera conformada por dos secuencias (BP=78) y la segunda conformada por tres (BP=58). A partir de la secuencia ancestral AP1003 diverge el grupo de las secuencias AP831 y AP920 (BP=97) (**Figura 1C**).

Para el marcador *ND2* se encontró que tanto el árbol generado con las secuencias de este marcador como la concatenación con las secuencias de *I6S* presentaron la misma topología (ver **Anexo 9C**). En los árboles se encuentran dos grupos principales cada uno conformado por dos individuos con valores de bootstrap muy similares (BP= 100 y 99 respectivamente). (**Figura 1D**).

Los árboles de distancia estimados a partir de cinco concatenaciones distintas fueron los siguientes: A) *COI+I2S+I6S* cuyo alineamiento generó cinco secuencias de 1611 pb. B) Concatenación *COI+I2S* con siete secuencias de 1067 pb. C) Concatenación *ND2+I6S* con cuatro secuencias de 1421 pb. D) Concatenación *COI+I6S* con cinco secuencias de 1213 pb. E) Concatenación *I2S+I6S* con cinco secuencias de 942 pb. (ver **Anexo 9**).

Para la concatenación A, la secuencia AP920 fue la externa en el árbol y de la cual diverge la secuencia AP831, esta secuencia anterior es la hermana del grupo con BP=72 representado por AP303 y el ancestro del subgrupo con BP=61 conformado por las secuencias AP1079 y AP1004 (**Anexo 9A**).

La concatenación B presenta un árbol con dos agrupaciones principales. La primera correspondiente a las secuencias más distantes al resto (AP959 y AP920) y la segunda con BP=99 y conformada por cinco secuencias. Este segundo gran grupo está subdividido por el grupo con BP=58 conformado por la secuencia AP1062 y de la cual diverge otra subdivisión con BP=52 cuya secuencia es ancestro de la subdivisión con BP=59 conformada por dos secuencias (**Anexo 9B**).

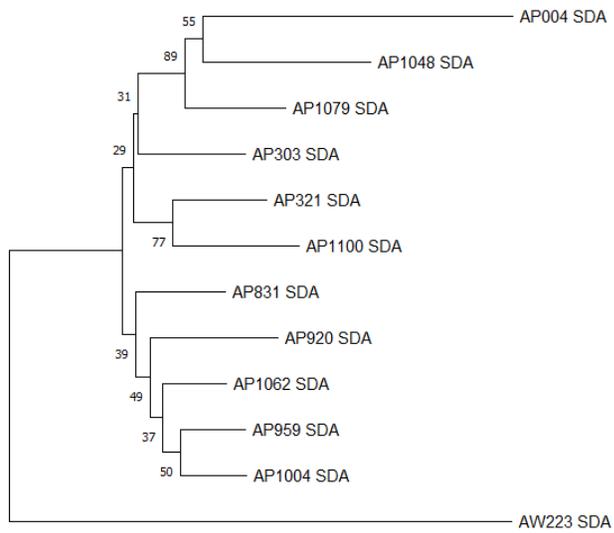
El árbol de la concatenación D tiene dos grupos mayores, uno conformado por la secuencia más distante representada por AP1079, y otro conformado por cuatro secuencias. De este anterior se forma el subgrupo con BP=52 representado por AP303 secuencia ancestral de la cual diverge otro subgrupo con BP=93 conformado por AP831 y AP920 (**Anexo 9D**).

El árbol de la concatenación E engloba dos grupos principales, el primero (concordante con el resultado de la concatenación A) representado por AP920 y el segundo constituido por cinco secuencias. Otro subgrupo divergente de la secuencia AP831 está representado por la secuencia AP1079 (BP=84). El último subgrupo con BP=50 divergió de AP1079 y está representado por AP1004 y AP303 (**Anexo 9E**).

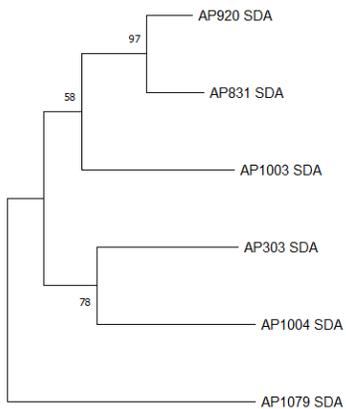
**Tabla 1.** Lista de las muestras con amplificaciones exitosas. Las primeras columnas refieren a la cuantificación por espectrofotometría posterior a la PCR para cada marcador molecular. También se encuentran las características respecto al tipo de muestra y al tipo de extracción de ADN.

| Nombre muestra | Cuantificación Post PCR (ng/ $\mu$ L) |            |            |            | Tipo de muestra |                           | Tipo de extracción |                      |
|----------------|---------------------------------------|------------|------------|------------|-----------------|---------------------------|--------------------|----------------------|
|                | <i>COI</i>                            | <i>12S</i> | <i>16S</i> | <i>ND2</i> | Sangre          | Almohadillas<br>plantares | Chelex 20%         | Fenol-<br>cloroformo |
| AP004          | 518,06                                |            |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP959          | 227,635                               | 504,542    |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP1062         | 216,656                               | 654,501    |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP1004         | 234,676                               | 309,707    | 255,077    | 222,183    | x               |                           | x                  |                      |
| AP1079         | 230,227                               | 317,857    | 272,849    |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP1038         | 469,19                                |            |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP920          | 412,671                               | 231        | 249,714    | 525,129    | x               |                           | x                  |                      |
| AP303          | 417,406                               | 454,21     | 214,498    | 479,694    | x               |                           | x                  |                      |
| AP831          | 481,75                                | 304,187    | 236,918    |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP1048         | 370,296                               |            |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| AP1100         | 446,592                               | 495,341    |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| AW223          | 236,359                               |            |            |            | x               |                           | x                  |                      |
| 1304 MPUJA     |                                       | 367,379    |            |            |                 | x                         |                    | x                    |
| 1209MPUJA      |                                       | 379,539    |            |            |                 | x                         |                    | x                    |
| AP1003         |                                       |            | 203,405    | 467,7      | x               |                           | x                  |                      |
| AP1098         |                                       | 450,849    |            |            | x               |                           | x                  |                      |

**A).** Árbol para el marcador *COI*.



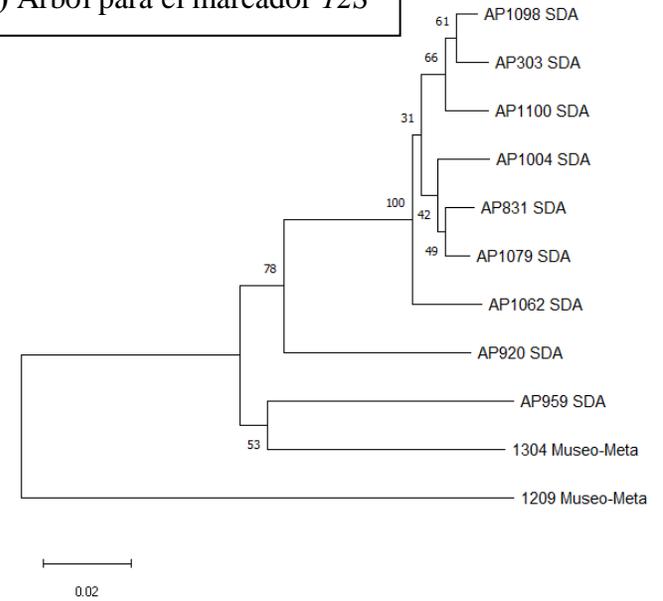
0.02



0.01

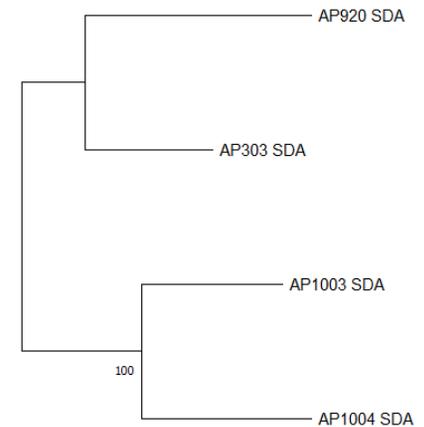
**C)** Árbol para el marcador *16S*

**B)** Árbol para el marcador *12S*



0.02

**Figura 1.** Árboles de distancias por NJ para cada marcador mitocondrial realizados en MEGA. Los valores asociados a los nodos corresponden a los valores del bootstrap (BP).



0.01

**D)** Árbol para el marcador *ND2*

## Discusión

### *Extracción de ADN y estandarización condiciones de la PCR*

La concentración de ADN por microlitro de extraído (ng/ $\mu$ L) y la pureza de este pueden cuantificarse mediante espectrofotometría, esta metodología se basa en la capacidad de absorción de un compuesto en solución frente a una longitud de onda determinada (Boesenberg-Smith et al., 2012; Denovix, 2019). Para ácidos nucleicos la relación de absorbancia 260/280 es estable y considera que valores dentro del rango 1.8-2 expresan pureza, valores aceptables de pureza deben tener valores  $\geq 1.6$ , valores  $\leq 1.6$  indican contaminación por compuestos aromáticos como fenoles o proteínas, valores superiores a 2.1 indican contaminación por ARN (Denovix, 2019). La relación 260/230 considera valores de pureza altos a los encontrados en el rango 1.8-2.2, valores  $\leq 1.5$  pueden significar presencia de carbohidratos y sales provenientes de agentes caotrópicos como trazas de guanidinas (Boesenberg-Smith et al., 2012; Denovix, 2019). Tal como puede verificarse con los extraídos AP831 y AP303, que obtuvieron valores dentro o cercanos a los rangos óptimos de pureza generaron amplificadores exitosos contrario a los extraídos con valores fuera y lejanos al rango lo que pudo significar que esta impureza comprometió la amplificación.

### **(Anexo 3)**

Otro factor que se suma a lo anteriormente mencionado es la metodología de extracción escogida, dado que para este estudio más del 80% de las muestras fueron extraídas con el método inorgánico. El chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) es una resina quelante cuyo principio es realizar un intercambio iónico de iones de metales en transición como el  $Mg^{+2}$ . Lo que ocurre en el proceso de extracción es que el medio alcalino generado y el proceso de hervir las muestras en agua es la que permite que estos agentes quelantes se asocien a componentes celulares evitando la degradación del ADN, sin embargo, en el caso de muestras sanguíneas el chelex puede asociarse con otros componentes de la sangre, como también pueden mantenerse metales iónicos como el hierro, entre otros conocidos compuestos inhibidores en la PCR (Sepp et al., 1994; Kuffel et al., 2021; Phillips et al., 2012).

Igualmente otra variable que pudo incidir en el bajo éxito de la amplificación de los extraídos provenientes de colecciones biológicas es la antigüedad de muestra, aunque una serie de artículos reportan amplificaciones exitosas provenientes de ejemplares de museos y colecciones biológicas (Martínková & Searle, 2006; Mundy et al., 1997), estudios como el de Töpfer y colaboradores (2011) muestra una correspondencia entre la fecha de colecta de los ejemplares con el desempeño de la PCR, donde los ejemplares de mayor antigüedad obtenían desempeños más bajos e incluso ejemplares con una antigüedad entre los 70 a 100 años fue imposible su amplificación. Esto sería una explicación provisional

al menos para los extraídos empleados en este estudio que fueron colectados entre 1940 y 1950, algo que en relación con el único par de ejemplares de museo que logro amplificarse para el gen *I2S* son de muestras mucho más recientes (2006 y 2007). Esto no significa que sea definitivo que, a este tipo de muestras de ADN, les sea imposible generar amplificadas exitosas ya que los procesos de degradación del ADN ocurren a tasas particulares en cada espécimen y relacionado a su historia, es decir, toda la intervención que ha tenido un ejemplar desde el tratamiento de las pieles en campo, condiciones de transporte, almacenamiento, curaduría entre otros pueden influir en la calidad del ADN (Töpfer et al., 2011).

Indistintamente de la imposibilidad de obtener amplificadas exitosas en la mayoría de las muestras de especímenes de colecciones, los resultados apoyan lo reportado en otras investigaciones respecto al tejido del que se obtiene la muestra para la extracción, las almohadillas plantares siendo este un lugar que no compromete de forma significativa al ejemplar y genera concentraciones de ADN suficientes para la posterior amplificación por PCR (Mundy et al., 1997; Töpfer et al., 2011). En este caso particular, aunque no era un objetivo comparar la concentración de los extraídos de las almohadillas frente a otros tejidos (uñas en este caso) si se observa que en general las almohadillas tuvieron mayor cantidad de ADN frente a las uñas (alrededor de 1000 ng/ $\mu$ L frente a 35 ng/ $\mu$ L respectivamente). Esto puede deberse a que en principio las almohadillas presenten menos ADN degradado frente a otros tejidos, pero tampoco puede excluirse la posibilidad de que en las uñas simplemente exista una menor cantidad de células en comparación a las almohadillas (Töpfer et al., 2011).

Teniendo en cuenta todo lo referente al proceso de extracción, sería ideal realizar una estandarización de la extracción de ADN de las muestras de museos, algo que en este estudio no fue posible ya que la cantidad de muestra obtenida fue consumida absolutamente en el proceso de extracción. Cada vez más proyectos investigativos implementan técnicas que buscan aumentar el rendimiento de la extracción de ADN a partir de muestras degradadas al igual que buscan metodologías no destructivas para este material tan valioso depositado en los museos (Nakahama, 2021). No obstante, este valor de los museos también se ve reflejado en su uso (en este caso estudios moleculares), en este sentido, las colecciones biológicas son mucho más que únicamente las pieles y estas pueden trascender a biorepositorios materializados ya sea en colecciones de tejidos en líquido, tejidos congelados, plumas, huesos entre otros materiales que enriquecen las colecciones (Nakahama, 2021; Rohland et al., 2010; Casas-Marce et al., 2010). En concordancia con Payne y Sorenson, se sugiere que se considere la importancia de los especímenes de museo como recursos genéticos primarios, equilibrando los puntos de vista entorno al uso en la genética

molecular como "muestreo destructivo" versus ciencia que otorga un "valor agregado" a estos especímenes (2002).

Sobre las condiciones de amplificación, la temperatura de anillamiento es uno de los elementos más determinantes en la PCR, generalmente esta temperatura se encuentra 5°C por debajo de la temperatura melting ( $T_m$ ) de los primers, dicha temperatura puede ser calculada en distintos programas no obstante es necesario el ensayo en laboratorio de distintas temperaturas cercanas a la  $T_m$  para determinar la temperatura optima de la reacción (Beltrán-Torres et al., 2013). Se estandarizó la amplificación de los marcadores *COI*, *12S* y *16S* ya que las temperaturas de anillamiento elegidas fueron distintas de las reportadas en literatura (Ribas & Miyaki, 2004; Padilla-Jacobo et al., 2016; Jaramillo-Castaño, 2020; Pabón-Viteri, 2016) (**Anexo 8**). Esta diferencia de las temperaturas elegidas y reportadas puede deberse a múltiples factores, uno de ellos es que las condiciones trabajadas en estas investigaciones no fueron específicas para *E.pertinax* sino para otros grupos de psitácidos. También puede deberse al uso diferencial de reactivos, equipos como otras variables y consideraciones relacionadas a los protocolos particulares de cada laboratorio para llevar a cabo las PCRs (Freed & Cann, 2003; Lynch, 2002). Para el gen *ND2* se validó su amplificación dada su concordancia con lo reportado por Jaramillo-Castaño (2020).

Se validan los cebadores utilizados para los cuatro marcadores empleados para especímenes de *E.pertinax* con distribución en Colombia. A pesar de que los primers empleados en este estudio no fueron diseñados particularmente para *E.pertinax* de acuerdo con la longitud del fragmento obtenido frente al teórico reportado por los autores se obtuvieron longitudes mayores para *COI*, *12S* y *16S*, algo de gran importancia ya que obtener más sitios informativos puede permitir diferenciar no solo subespecies sino incluso individuos mediante polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) (Urantowka et al., 2017; Peterson et al., 2012). Estas diferencias entre el fragmento esperado frente al obtenido pueden deberse entre otras cosas a la calidad de la secuenciación realizada como al método de alineamiento de secuencias. Las longitudes presentadas por los autores como de este estudio corresponden a la longitud luego del proceso de alineamiento corte y edición de las secuencias que mejor se ajustó a su respectivo conjunto de datos.

#### *Análisis de distancias*

Dado a que la gran mayoría de muestras secuenciadas pertenecen a individuos provenientes de centros de recepción de fauna del cual se desconoce tanto el origen geográfico como descripción de la subespecie por parte del personal y ya que únicamente dos individuos provenientes de las colecciones lograron secuenciarse para el marcador *12S* los alcances para identificar subespecies para esta clase de muestras

es limitado ya que no hay una representación de todas las subespecies. Teniendo en cuenta que las muestras de museo 1304 y 1209 fueron colectadas en el Meta y ya que la secuencia AP920 se agrupa con una de ellas, lo más factible es que estas pertenezcan a la subespecie *E. p. lehmanni* puesto que esta localidad se encuentra dentro del rango de distribución histórico descrito para la subespecie reportan Rodríguez-Mahecha y Hernández-Camacho (2002).

Un aspecto importante para tener en cuenta son los valores del bootstrap arrojado. Esta metodología es la que mediante el remuestreo, mide la consistencia interna de un conjunto de datos moleculares al analizar si pequeñas modificaciones en los alineamientos dan como resultado los mismos clados (Russo & Selvatti, 2018). Ya que estos valores son los que dan soporte y robustez a una hipótesis propuesta, generalmente valores <50% no soportan a un clado o agrupamiento, valores entre el 50% y el 85% indican un soporte bajo-medio del agrupamiento y valores >85% demuestran un soporte alto (Felsenstein, 2004). De todos modos, incluso si algunos nodos en los árboles de este estudio tienen valores de BP < 50%, las topologías sugeridas por esta metodología son las más plausibles en referencia al conjunto de datos analizado (Russo & Selvatti, 2018). Generalmente, estos valores no soportados pueden deberse a distintos motivos incluyendo conflicto de señales o baja señal del conjunto de los datos, alineamientos erróneos, que los genes elegidos no sean informativos para el grupo de estudio entre otros (Urantowka et al., 2017).

Los árboles generados mediante las distintas concatenaciones de secuencias de los genes generaron topologías distintas a las de los árboles de los genes individuales (a excepción de la topología del árbol ND2+16S), algo que también está determinado por el hecho de que en algunos marcadores se amplificaron más muestras que en otros. De forma general, son resultados preliminares respecto a cómo se comporta la topología del árbol según la concatenación realizada. Por ejemplo, lo que ocurre con las secuencias de los individuos AP303 y AP1079, cuando se utilizan tres marcadores las secuencias AP303 y la AP1079 están relacionadas, pero cuando se concatenan *COI+12S* estas mismas secuencias se encuentra incluso más relacionadas que cuando se concatenan tres marcadores (ver **Anexo 9**). Todos los árboles producto de las concatenaciones se encuentran dentro del límite de soporte del bootstrap donde todos los agrupamientos fueron  $\geq 50$ . Estos resultados sugieren que la concatenación de las secuencias de múltiples marcadores moleculares puede generar árboles con topologías y clados con mayor soporte y robustez (Gadagkar et al., 2011). Es necesario obtener más secuencias georreferenciadas amplificadas para todos los marcadores mitocondriales empleados y así determinar si para diferenciar molecularmente a las subespecies basta un solo marcador o con varios de ellos (Gadagkar et al., 2011).

## **Conclusiones**

Se estandarizaron las condiciones de amplificación por PCR de los marcadores mitocondriales *COI*, *12S*, *16S* y *ND2* para el Laboratorio de Genética de Poblaciones Molecular y Biología Evolutiva (LGPBME) para individuos con distribución en Colombia de *E. pertinax*. El método de extracción inorgánico por resina chelex fue exitoso para las muestras de sangre más no lo fue para las muestras provenientes de museos y colecciones biológicas, por lo que se sugiere una revisión respecto a todos los elementos que puedan incidir en los resultados del desempeño de la PCR. Se validan los primers empelados para *E. pertinax* ya que estos generaron longitudes de fragmentos mayores que los reportadas para tres marcadores. El alcance de la información que brindan los análisis de distancias es limitado dadas las características de las muestras por lo que se sugiere obtener las secuencias de más muestras georreferenciadas para todos los marcadores moleculares empleados y así tener secuencias de referencia para un posterior contraste.

## **Agradecimientos**

A mis padres, hermano y abuela por su amor y apoyo sin condición. A Cherry que espero me acompañe muchos años más. A las amistades por su afecto. Agradezco inmensamente a mi directora Myreya Pinedo por su paciencia, acompañamiento y enseñanzas durante todo el proceso. A mis compañeros de laboratorio Jacobo y Javier por hacer de esto una grandiosa experiencia. Finalmente agradezco a los curadores del Museo de Ciencias Naturales de La Salle y al Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana por su colaboración para la obtención de muestras.

## **Referencias**

- Acevedo C (2019) Estandarización y validación de microsátélites por amplificación cruzada para Psitácidos de Colombia. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Astrin, J. J., Zhou, X., & Misof, B. (2013). The importance of biobanking in molecular taxonomy, with proposed definitions for vouchers in a molecular context. *ZooKeys*, (365), 67.
- Beltrán-Torres G, Otálora K, Ledy Angélica Daza Hernández-Fernández J. (2013) PCR Standardization to amplify the mito-chondrial genome of nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) in the Colombian Caribbean. *Revis-ta Mutis*. vol. 3 (2) pag. 21-30

- Berkunsky, I., Quillfeldt, P., Brightsmith, D. J., Abbud, M. C., Aguilar, J. M. R. E., Alemán-Zelaya, U., ... & Masello, J. F. (2017). Current threats faced by Neotropical parrot populations. *Biological Conservation*, 214, 278-287.
- Bosnjak, J., Stevanov-Pavlovic, M., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Simeunovic, P., Resanovic, R., & Stanimirovic, Z. (2013). Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(3).
- Botero-Delgadillo E, Páez C (2011) Estado actual del conocimiento y conservación de los loros amenazados de Colombia. *Conservación Colombiana* 14:86-151.
- Casas-Marce, M., Revilla, E., & Godoy, J. A. (2010). Searching for DNA in museum specimens: a comparison of sources in a mammal species. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 502-507.
- Clements, J. F. (2007). *Clements checklist of birds of the world*. Comstock Pub. Associates/Cornell University Press.
- DeNovix (2022). *Absorbance and Fluorescence Quantification*. DeNovix Inc Wilmington, USA.
- Dugand, A. (1943). Dos nuevas aves de Colombia. *Caldasia*, 191-198.
- Eberhard, J. R., & Bermingham, E. (2004). Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. *The Auk*, 121(2), 318-332.
- Edwards, S. V., Birks, S., Brumfield, R. T., Hanner, R., & Zink, R. M. (2005). Future of avian genetic resources collections: archives of evolutionary and environmental history. *The Auk*, 122(3), 979-984.
- Escobar-Guzmán, L.F. (2020). Evaluación de microsatélites para estudios genéticos en psitácidos (Psittacidae) de Colombia. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Felsenstein J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sunderland, MA, U.S.A.: Sinauer Associates Inc.
- Forshaw, J. M. (1989). *Parrots of the world*. Lansdowne Editions, Sidney, Australia.
- Freed, L. A., & Cann, R. L. (2003). On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds. *Journal of Parasitology*, 89(6), 1261-1264.
- Funk, V. A. (2018). Collections-based science in the 21st century. *Journal of Systematics and Evolution*, 56(3), 175-193.

- Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., & Kumar, S. (2005). Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304(1), 64-74.
- Habel, J. C., Husemann, M., Finger, A., Danley, P. D., & Zachos, F. E. (2014). The relevance of time series in molecular ecology and conservation biology. *Biological Reviews*, 89(2), 484-492.
- Hahn, M. W. (2007). Bias in phylogenetic tree reconciliation methods: implications for vertebrate genome evolution. *Genome biology*, 8(7), 1-9.
- Jaramillo-Castaño, M. J. (2020). 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. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Jiménez I, Cadena C (2004). Porque no liberar animales silvestres decomisados. *Ornitología Colombiana* No2 :53-57.
- Kuffel, A., Gray, A., & Daeid, N. N. (2021). Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency. *International journal of legal medicine*, 135(1), 63-72.
- Lamprea Maldonado, S. M., Ochoa Duarte, J. C., Castillo Sánchez, A., Zárrate Charry, D., Jiménez Alvarado, J. S., & González Maya, J. F. (2019). Guía técnica para manejo de fauna silvestre. – CAV. Convenio de Asociación no. 1838 de 2017 suscrito entre la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR y Proyecto de Conservación de Aguas y Tierras ProCAT Colombia. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR y Proyecto de Conservación de Aguas y Tierras ProCAT Colombia. Bogotá, Colombia.
- Lynch, M. (2002). Protocols, practices, and the reproduction of technique in molecular biology. *The British Journal of Sociology*, 53(2), 203-220.
- Martínková, N., & Searle, J. B. (2006). Amplification success rate of DNA from museum skin collections: a case study of stoats from 18 museums. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 1014-1017.
- Mundy, N. I., Unitt, P., & Woodruff, D. S. (1997). Skin from feet of museum specimens as a non-destructive source of DNA for avian genotyping. *The Auk*, 114(1), 126-129.
- Nakahama, N. (2021). Museum specimens: An overlooked and valuable material for conservation genetics. *Ecological Research*, 36(1), 13-23.

- Pabón-Viteri, L.A. (2016). Validación de marcadores moleculares nucleares para el sexaje y verificación molecular de especies de géneros de psitácidos de Colombia. Tesis de pregrado Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Padilla-Jacobo, G., Monterrubio-Rico, T. C., Camacho, H. C., & Zavala-Páramo, M. G. (2016). Use of phylogenetic analysis to identify evolutionarily significant units for the Orange-fronted Parakeet (*Eupsittula canicularis*) in Mexico. *Ornitología Neotropical*, 26(4), 325-335.
- Payne, R. B., & Sorenson, M. D. (2002). Museum collections as sources of genetic data. *Bonner Zoologische Beiträge*, 51, 97-104.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE* 7(5): e37135
- Pinedo-Castro MO (2017) 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.
- Restrepo-Roda D, Pulgarín-Restrepo P (2017) Dinámicas de los loros en cautiverio en Colombia: tráfico, mortalidad y liberación. *Ornitología Colombiana*, 16: eA06-1.
- Rodas, J. Á., Serna, C. M., & Giraldo, A. G. (2016). Conservación de especies amenazadas de la familia Psittacidae desde la Institución Universitaria Pascual Bravo. *Cuaderno Activa*, 8, 87-99.
- Rodríguez-Mahecha, J., & Hernández-camacho, J. (2002). Loros de Colombia. *Conservation international, serie de guias tropicales de campo 3*. Bogotá: Colombia
- Rohland, N., Siedel, H., & Hofreiter, M. (2010). A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Molecular ecology resources*, 10(4), 677-683.
- Russo, C. A. D. M., & Selvatti, A. P. (2018). Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2327-2333.

- Sambrook J, E. Fritsch, T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 2nd edition. V1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sepp, R., Szabo, I., Uda, H., & Sakamoto, H. (1994). Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *Journal of clinical pathology*, 47(4), 318-323.
- Schindel, D. E., Stoeckle, M. Y., Milensky, C., Trizna, M., Schmidt, B., Gebhard, C., & Graves, G. (2011). Project description: DNA barcodes of bird species in the national museum of natural history, smithsonian institution, USA. *ZooKeys*, (152), 87.
- Tamura K, Stecher G, and Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027.
- Tavares, E. S., Baker, A. J., Pereira, S. L., & Miyaki, C. Y. (2006). Phylogenetic relationships and historical biogeography of neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Biology*, 55(3), 454-470.
- Töpfer, T., Gamauf, A., & Haring, E. (2011). Utility of arsenic-treated bird skins for DNA extraction. *BMC research notes*, 4(1), 1-8.
- Urantowka, A. D., Krocak, A., & Mackiewicz, P. (2017). The influence of molecular markers and methods on inferring the phylogenetic relationships between the representatives of the Arini (parrots, Psittaciformes), determined on the basis of their complete mitochondrial genomes. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 1-26.
- Walsh, P.S, D. A. Metzger & R. Higuchi. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 1991; 10: 506-513.
- Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14

## Anexos

### Anexo 1. Información sobre el origen de las muestras provenientes de museos y colecciones biológicas.

| Colección biológica  | No. Catálogo | Fecha de colección | Especie                    | Subespecie        | Sexo   | Departamento | Municipio          | Localidad                   | Latitud decimal | Longitud decimal |
|--|--------------|--------------------|----------------------------|-------------------|--------|--------------|--------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|
| Colección de aves del Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana | MPUJ:651     | 19/01/1951         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Aeruginosa</i> | Macho  | La Guajira   | San Juan Del Cesar |                             | 10,784701       | -72,996567       |
| Colección de aves del Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana | MPUJ:1304    | 22/10/2006         | <i>Eupsittula pertinax</i> |                   | Hembra | Meta         | San Martín         | Montebello, Finca Tocancipá | 3,661139        | -73,610750       |
| Colección de aves del Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana | MPUJ:1209    | 10/04/2007         | <i>Eupsittula pertinax</i> |                   | Macho  | Meta         | San Martín         | Montebello, Finca Tocancipá | 3,661139        | -73,610750       |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1085         | 20/12/1942         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Macho  | Meta         | Villavicencio      |                             | 4.1533333       | -73.635          |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1086         | 26/12/1945         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Macho  | Meta         | Villavicencio      |                             | 4.1533333       | -73.635          |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1087         | 30/12/1945         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Macho  | Meta         | Villavicencio      |                             | 4.1533333       | -73.635          |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1089         | 21/12/1949         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Hembra | Meta         | Restrepo           |                             | 4.2686111       | -73.5561111      |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1090         | 2/02/1950          | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Hembra | Meta         | Villavicencio      |                             |                 |                  |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1091         | 18/05/1950         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Hembra | Meta         | Villavicencio      |                             | 4.1533333       | -73.635          |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 1092         | 27/03/1953         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Lehmanni</i>   | Hembra | Meta         | Villavicencio      |                             | 4.1533333       | -73.635          |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 7903         | 3/02/1966          | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Aeruginosa</i> | Macho  | Córdoba      | Montería           |                             | 8.715814        | -75.787354       |
| Colección de Omitología - Museo de Ciencias Naturales de La Salle                      | 8029         | 22/10/1967         | <i>Eupsittula pertinax</i> | <i>Aeruginosa</i> | Hembra | Atlántico    | Barranquilla       |                             | 10.9616667      | -74.7816667      |

**Anexo 2.** Información complementaria sobre muestras de sangre provenientes de la SDA.

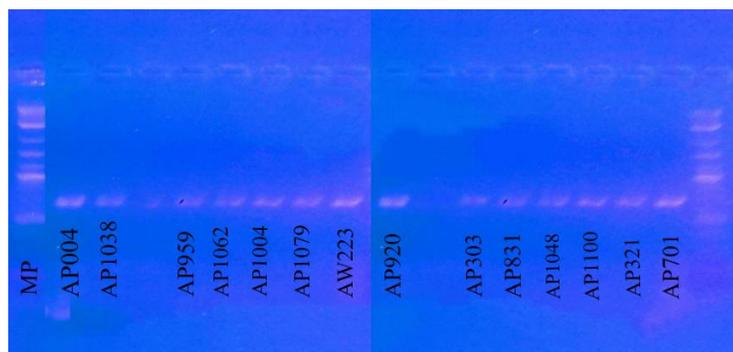
| Intitución   | Nombre muestra | Año  | Código asignado    | Sub especie                         |
|--|----------------|------|--------------------|-------------------------------------|
| Centro de recepción y rehabilitación de Fauna Silvestre (CRRFS) Secretaria Distrital de Ambiente (SDA) Bogotá, D.C | AP920          | 2014 | 38AV/920/SDA 093   | No reportado                        |
|  | AP701          |      | 38AV/701/SDA 0661  |                                     |
|  | AP831          |      | 38AV/831/SDA 091   |                                     |
|  | AP1003         |      | 38AV/1003          |                                     |
|  | AP303          |      | 38AV/303           |                                     |
|  | AP004          |      | 38AV/004/SDA 1142  |                                     |
|  | AP1038         |      | 38AV/1038/ SDA 094 |                                     |
|  | AP959          |      | 38AV/959/SDA 067   |                                     |
|  | AP748          |      | 38AV/748           |                                     |
|  | AP1062         |      | 38AV/1062/SDA 062  |                                     |
|  | AP1004         |      | 38AV/1004          |                                     |
|  | AP1100         |      | 38AV/1100/SDA 005  |                                     |
|  | AP1098         |      | 38AV/1098/SDA 070  |                                     |
|  | AP1079         |      | 38AV/1079/ SDA 042 |                                     |
|  | AP065          |      | 38AV/1144/SDA 065  |                                     |
|  | AP857          |      | 38AV/857/SDA 057   |                                     |
|  | AP321          |      | 38AV/321/SDA 008   |                                     |
|  | 2734 SDA       |      | 2022               |                                     |
|  | 2597 SDA       | NA   |                    |                                     |
|  | 163 SDA        | NA   |                    | <i>Eupsittula pertinax lehmanni</i> |
| 2764 SDA   | NA             |      |                    |                                     |
| Hogar de paso de la Universidad de la Amazonia   | AW223          | 2015 | NA                 | No reportado                        |

**Anexo 3.** Cuantificación de ADN por espectrofotometría después de culminado el proceso de extracción para 38 extraídos de individuos de *E.pertinax*. Cabe aclarar que, aunque el tamaño muestral del estudio es igual a 33 individuos, para algunos especímenes se obtuvieron muestras de dos tipos de tejidos distintos (ej. Almohadillas y uñas) por lo que el protocolo de procesamiento en laboratorio fue independiente resultando en más de un extraído para un mismo espécimen.

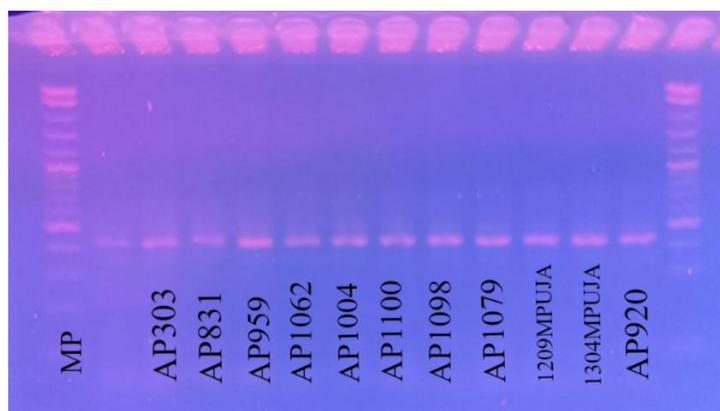
| Nombre muestra | Tipo de muestra        | Tipo de extracción | Concentración (ng/μl) | Relación 260/230 | Relación 260/280 | Amplificación      |
|----------------|------------------------|--------------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------------|
| AP920          | Sangre                 | Chelex al 20%      | 116,843               | 0,53             | 1,66             | Si                 |
| AP701          |                        |                    | 45,958                | 0,32             | 1,55             | No                 |
| AP831          |                        |                    | 113,153               | 0,68             | 1,72             | Si                 |
| AP1003         |                        |                    | 127,013               | 0,5              | 1,74             | Si                 |
| A303           |                        |                    | 201,167               | 0,83             | 1,87             | Si                 |
| AP004          |                        |                    | 36,999                | 0,49             | 1,55             | Si                 |
| AP1038         |                        |                    | 8,166                 | 0,24             | 1,21             | Si-Resecuenciación |
| AP959          |                        |                    | 36,558                | 0,44             | 1,56             | Si                 |
| AP748          |                        |                    | 10,805                | 0,22             | 1,3              | No                 |
| AP1062         |                        |                    | 24,16                 | 0,57             | 1,38             | Si                 |
| AP1004         |                        |                    | 29,782                | 0,37             | 1,5              | Si                 |
| AP1100         |                        |                    | 28,446                | 1,03             | 3,27             | Si                 |
| AP1098         |                        |                    | 206,35                | 0,49             | 1,67             | Si                 |
| AP1079         |                        |                    | 42,344                | 0,48             | 1,65             | Si                 |
| AP065          |                        |                    | 7,189                 | 0,27             | 1,13             | No                 |
| AP857          |                        |                    | 4,051                 | 0,14             | 0,84             | No                 |
| AP321          |                        |                    | 38,287                | 0,19             | 1,22             | Si                 |
| 2734SDA        |                        |                    | 89,324                | 0,17             | 1,26             | No                 |
| 2597SDA        |                        |                    | 59,363                | 0,11             | 1,1              | No                 |
| 163SDA         |                        |                    | 56,195                | 0,22             | 1,5              | No                 |
| 2764SDA        | 55,009                 | 0,11               | 1,05                  | No               |                  |                    |
| 1304MPUJA      | Almohadillas plantares | Fenol-cloroformo   | 22,375                | -0,07            | -0,63            | Si                 |
| 651MPJUA       |                        |                    | 433,976               | -0,97            | 3,2              | No                 |
| 1209MPUJA      |                        |                    | 63,335                | -0,13            | 2,38             | Si                 |
| 1085Salle      |                        | Chelex al 20%      | 1026,63               | 0,32             | 0,7              | No                 |
| 1086Salle      |                        |                    | 964,972               | 0,32             | 0,75             | No                 |
| 1087Salle      |                        |                    | 1,328,476             | 0,37             | 0,89             | No                 |

|              |     |               |           |      |      |    |
|--------------|-----|---------------|-----------|------|------|----|
| 1089Salle    |     |               | 1,359,265 | 0,36 | 0,85 | No |
| 1090Salle    |     |               | 1,041,729 | 0,33 | 0,75 | No |
| 1091Salle    |     |               | 261,195   | 0,31 | 0,8  | No |
| 1092Salle    |     |               | 1,217,607 | 0,33 | 0,8  | No |
| 7903Salle    |     |               | 1,622,732 | 0,38 | 0,81 | No |
| 8029Salle    |     |               | 1,481,855 | 0,36 | 0,79 | No |
| 1304MPUJU-E1 | Uña | Kit           | 1,063,225 | 0,35 | 1,02 | No |
| 1304MPUJU-E2 |     |               | 35,618    | 0,2  | 0,69 | No |
| 651MPUJU-E1  |     |               | 37,743    | 0,25 | 0,81 | No |
| 651MPUJU-E2  |     |               | 5,51      | 0,1  | 0,33 | No |
| 1209MPUJU    |     | Chelex al 20% | 693,451   | 0,23 | 0,64 | No |

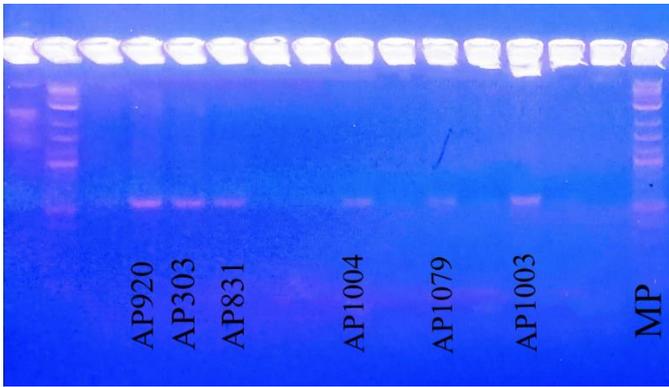
**Anexo 4.** Gel de agarosa con amplificados del gen *COI*. Cada pozo correspondió a una muestra distinta. MP refiere al marcador de peso molecular.



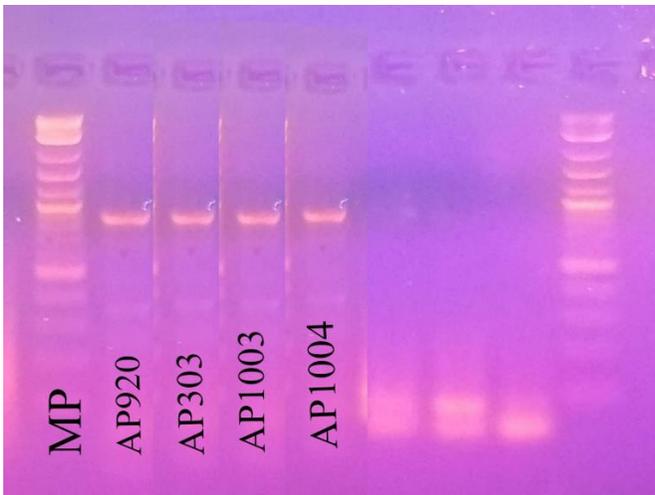
**Anexo 5.** Gel de agarosa con amplificados de gen *12S*. MP refiere al marcador de peso molecular.



**Anexo 6.** Gel de agarosa con amplificados del gen 16S. MP refiere al marcador de peso molecular.



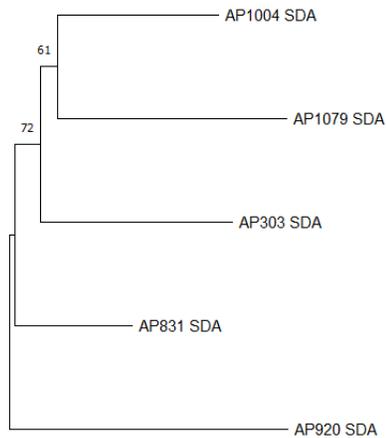
**Anexo 7.** Gel de agarosa con amplificados del gen ND2. MP refiere al marcador de peso molecular.



**Anexo 8.** Tabla síntesis con los aspectos más relevantes respecto a las condiciones y resultados de la amplificación por PCR para cada marcador molecular.

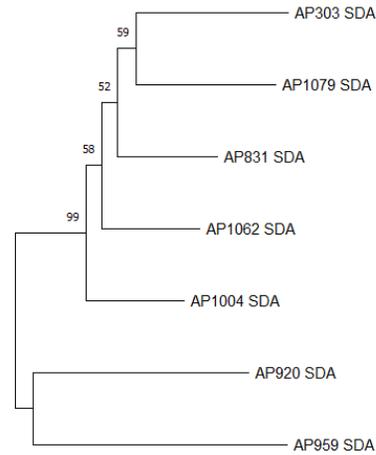
|   | <i>COI</i>  | <i>12S</i>  | <i>16S</i>  | <i>ND2</i>   |
|---|---|---|---|--|
| Ciclo de amplificación por PCR  | Desnaturalización: 95°C por 5 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s; Anillamiento a 60°C por 30s, extensión a 72°C por 30s, extensión final a 72°C por 7 min | Desnaturalización: 95°C 5 min seguido de 30 ciclos a 95 °C por 1 min; Anillamiento a 56.2°C por 40 s, extensión 72 °C por 40 s, Extensión final a 72° por 5 min | Desnaturalización: 95°C por 5 min seguido de 30 ciclos a 95 °C por 1 min; Anillamiento a 52°C por 40 s, extensión 72 °C por 40 s, Extensión final a 72° por 5 min | Desnaturalización: 95°C por 5 min seguido de 34 ciclos a 95 °C por 30s ; Anillamiento a 52°C por 40 s, extensión 72 °C por 40 s, Extensión final a 72° por 5 min |
| Marcador estandarizado o validado                                     | Estandarizado   | Estandarizado   | Estandarizado   | Validado   |
| Gradiente de temperaturas de anillamiento (°C)                        | 45, 50, 51, 52, 55, 56, 56.2 y 60   | 53, 53.2, 53.7, 54.4, 55.2, 55.8, 56.2 y 56.5   | 52, 52.6, 53, 53.7, 55.5, 57.5 ,59.2 , 60.3 y 61  | 52, 52.5, 53.3, 54.7, 56.3, 57.6 , 58.5 y 59   |
| Rango de concentración del extraído para visualización bandas (ng/μL) | 24,16 - 72,48   | 201,167-502,9175  | 201,167-1,408,169   | 29,782-148,91  |
| Rango cantidades de ADN agregado a la PCR                             | 1-3 μL  | 1-2,5 μL  | 1-7 μL  | 1-5μL  |
| Longitud fragmento teorico/obtenido (pb)                              | 652 / 669   | 295 / 398   | 461 / 544   | >800 / 868   |
| Referencias   | Pinedo-Castro 2017; Jaramillo-Castaño, 2020; Pabón-Viteri, 2016; Padilla-Jacobo et al., 2016  | Ribas & Miyaki 2004   | Ribas & Miyaki 2004   | Eberhard & Bermingham 2004; Pinedo-Castro 2017; Jaramillo-Castaño, 2020  |

### A. Concatenación *COI+12S+ 16S*.



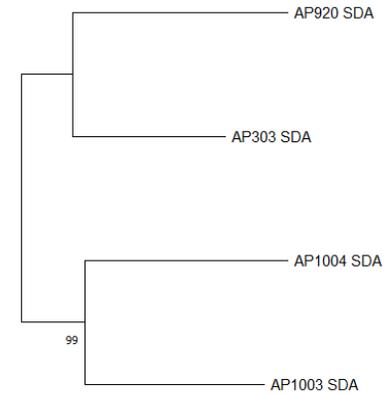
0.01

### B. Concatenación *COI+12S*



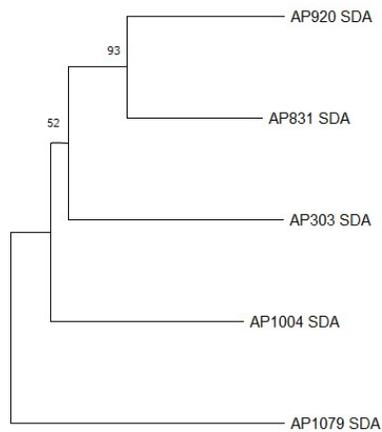
0.01

### C. Concatenación *ND2+16S*.



0.01

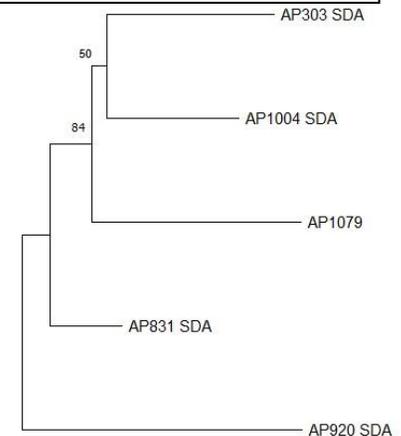
### D. Concatenación *COI+16S*



0.01

**Anexo 9.** Árboles de distancias a partir de concatenación de secuencias. Solo se realizaron las concatenaciones en los casos que mínimo cuatro secuencias hubiesen amplificado para más de un marcador ya que la prueba Bootstrap en MEGA requiere este mínimo.

### E. Concatenación *12S+16S*



0.01