



---

Symposium Article

## Fundada: La reconstrucción genética de la diversidad de linajes y del parentesco informa a la conservación *ex situ* de la cotorra cubana (*Amazona leucocephala*)

Yoamel Milián-García\*, Evelyn Jensen, Jeanette Madsen, Suleiky Álvarez Alonso, Aryamne Serrano Rodríguez, Georgina Espinosa López, and Michael Russello

Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 # 455 entre J e I, Plaza Vedado, Código Postal 10400, Ciudad de La Habana, Cuba (Milián-García y Espinosa López), Departamento de Biología, University of British Columbia, Okanagan Campus, 3333 University Way, Kelowna, V1V 1V7, British Columbia, Canadá (Milián-García, Jensen, Madsen, y Russello), Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna: Calle 42 y 514 Esq.7 Ave, Miramar, Ciudad de La Habana, Cuba (Álvarez Alonso y Serrano Rodríguez).

\*La correspondencia dirigirla a Yoamel Milián-García en la dirección antes citada o al correo: [yoamel@fbio.uh.cu](mailto:yoamel@fbio.uh.cu)

Datos depositados en Dryad: <http://dx.doi.org/doi:10.5061/dryad.802bs>

Recibido el 22 de julio del 2014; Primera decisión el 6 de octubre del 2014; Aceptado el 16 de febrero del 2015

Editor para la correspondencia: Antonio Solé-Cava

### Resumen

La cría en cautiverio constituye una estrategia de conservación extendida, sin embargo tales programas rara vez incluyen datos genéticos para evaluar las asunciones de manejo y alcanzar los objetivos de conservación. La cotorra cubana (*Amazona leucocephala*) es considerada vulnerable, y en Cuba se han establecido múltiples poblaciones en cautiverio a partir de ejemplares de ascendencia desconocida, los cuales han sido capturados en el medio natural o confiscados. En el presente trabajo, empleamos información proveniente de haplotipos mitocondriales y 9 loci microsatélites nucleares para cuantificar la magnitud y distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones cautivas de la Ciénaga de Zapata y Managua, Cuba, así como estimar índices de parentesco entre los reproductores (n=88). Empleando métodos de agrupamiento con base en la inferencia Bayesiana, detectamos 2 grupos dentro de la población de Zapata, uno de los cuales resultó ser compartido con Managua. Los individuos del grupo único de Zapata presentaron haplotipos mitocondriales relacionados con los referidos para las subespecies cubanas (*A. l. leucocephala*, *A. l. palmarum*). En el grupo compartido ocurrió de modo similar, pero este incluyó además haplotipos cercanamente relacionados con la subespecie restringida a Caimán Brac (*A. l. hesterna*). La media de parentesco global resultó ser baja dentro de cada población (-0.026 a -0.012), con 19 y 11 parejas de reproductores recomendadas para Zapata y Managua respectivamente, clasificadas de acuerdo a las medias de parentesco y el sexado molecular informado. Nuestros resultados resaltan la importancia de comprender la historia poblacional para los programas de manejo *ex situ*, mientras proveen de información genética para orientar directamente sobre la conservación de la cotorra cubana.

Áreas de estudio: Genética para la Conservación y biodiversidad; Sistemática molecular y filogenética

Palabras clave: *Amazona leucocephala*, cría en cautiverio, Cuba, media de parentesco, microsatélite

---

### Introduction

En medio de la crisis actual que enfrenta la biodiversidad, frenar la pérdida

de especies requiere estrategias de manejo integradas y multifacéticas. La cría en cautiverio está jugando un papel cada vez más importante en la

recuperación de las poblaciones naturales, a través de la reintroducción o suplementación y la creación de colonias *ex situ*, las que resultan en un seguro contra la extinción en la naturaleza (Conde et al. 2011). Sin embargo, hay un creciente reconocimiento en la comunidad científica sobre que las gestiones de los programas *ex situ* actuales, no son las adecuadas para alcanzar sus metas de conservación en virtud de las estrategias en curso (Lacy 2013). De manera tradicional, las genealogías se han utilizado para manejar las poblaciones cautivas bajo una estrategia que persigue minimizar la media de parentesco (Ballou y Lacy 1995). Aunque los estudios teóricos y empíricos han demostrado que este enfoque puede limitar efectivamente los riesgos de la deriva genética y la endogamia en poblaciones cautivas (Lacy 2000; Montgomery et al 1997), muchos de estos programas se caracterizan por una incompleta o falta de información sobre las relaciones ancestro-descendientes de sus individuos. En tales casos, se requiere para sus análisis de asunciones que implican la simplificación de la realidad y que pueden tener costos genéticos. Un ejemplo es la suposición del fundador, donde se asume a los individuos fundadores de una población cautiva como no relacionados e igualmente no consanguíneos. Cuando se viola este supuesto, el parentesco dentro de la población puede verse seriamente subestimado, y por tanto resultan sesgadas las estimaciones de las medias de parentesco y los coeficientes de endogamia en la que se basan las decisiones de manejo (Russello y Amato, 2004). El uso de marcadores moleculares puede ayudar a superar algunos de los desafíos asociados con la suposición del fundador, proporcionando herramientas para estimar empíricamente el parentesco y la identificación de individuos genéticamente importantes; permitiendo guiar las estrategias de mejoramiento (Doyle et al. 2001; Russello y Amato 2004).

Las cotorras del género *Amazona*, un grupo de especies carismáticas y en gran medida en peligro, siguen enfrentándose a una dramática disminución de sus poblaciones, debido a la caza furtiva para el comercio de mascotas y la destrucción de su hábitat (Collar 2000). La cotorra cubana (*Amazona leucocephala*) es un ejemplo de ello. Anteriormente distribuida en gran parte de las Bahamas, Cuba y las Islas Caimán, *A. leucocephala* se limita en la actualidad a seis islas y fue catalogada en el 2012 como Vulnerable en la Lista Roja de los vertebrados cubanos (González Alonso et al. 2012). En Cuba, hay dos subespecies tradicionalmente reconocidas: *A. l. leucocephala*, encontrada en la parte oriental de la Isla; y *A. l. palmarum*, referida a la región occidental de la Isla principal y en Isla de la Juventud en la región suroccidental (Ottens-Wainwright et al. 2004). Estudios genéticos basados en el ADN mitocondrial (ADNmt) han determinado que estas subespecies no son entidades evolutivamente distintas (Russello et al. 2010).

Dado su estado de conservación, poblaciones *ex situ* de la cotorra cubana se han establecido en la Isla de Cuba por la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna (ENPFF), en la Ciénaga de Zapata, Managua, y las instalaciones de cría del Zoológico Nacional. La instalación de cría de la Ciénaga de Zapata se fundó con 10 individuos en 1982, presumiblemente de la subespecie *A. l. leucocephala*, que fueron capturados en el medio natural, Ciénaga de Zapata. Hasta 1991, 95 individuos provenientes del medio natural habían sido capturados en la Ciénaga de Zapata e incorporados al programa de cría. Hasta la fecha, la población cautiva de la Ciénaga de Zapata ha aumentado su población a 117 ejemplares, incluyendo 35 parejas de reproductores, y es manejada en la actualidad como una población cerrada. La instalación de cría de Managua fue fundada en el 2002, en gran parte utilizando individuos confiscados del comercio ilegal. Ahora consta de 20 parejas de reproductores y se cree que estos individuos se han capturado originalmente en el medio natural provenientes de la Isla de la Juventud, perteneciendo al taxón *A. l. palmarum*. Por último, las cotorras cubanas mantenidas en el programa de cría del Zoológico Nacional, son ejemplares de origen mixto y ascendencia desconocida que se mantienen en gran medida para la exhibición al público. El objetivo general del programa de la ENPFF, es proporcionar y mantener poblaciones fuentes contra la extinción de las poblaciones en el medio natural, sin embargo, en la actualidad, todas las poblaciones cautivas son manejadas en ausencia de pedigrí e información genética.

El limitado conocimiento sobre el origen y la relación de los fundadores, así como la falta de libros genealógicos precisos, son los principales desafíos para el manejo efectivo de los programas de cría en cautiverio y mantenidos en la isla para la cotorra cubana. En el presente trabajo, empleamos información haplotípica mitocondrial (ADNmt), genotípica con base en microsatélites nucleares y datos de sexado molecular para: 1) cuantificar el alcance y la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones cautivas en la Ciénaga de Zapata y Managua; 2) estimar el parentesco entre los individuos de ascendencia desconocida; y 3) proponer recomendaciones para el manejo, basadas en toda la información demográfica y genética disponible.

## Materiales y Métodos

### Muestreo

Se colectaron muestras de cotorra cubana provenientes de las poblaciones cautivas de la Ciénaga de Zapata (N 22° 27.178', W81° 08.377') y Managua (N 22° 57'04", W -82° 17'28"), las dos poblaciones de la ENPFF establecidas con el propósito expreso de mantener la integridad de los linajes. Se tomaron muestras de plumas de 64 adultos en la Ciénaga de Zapata, en agosto del 2011 y de 24 adultos de la población de Managua en febrero del 2012, las cuales fueron preservadas en etanol al 95%. Todas las muestras fueron tomadas y transportadas bajo el permiso CITES de importación # 12CA00292 / CWHO-1, y el permiso CITES de exportación # C0001456. El ADN genómico fue extraído utilizando el kit Nucleospin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo los protocolos del fabricante.

### Sexado molecular

Las cotorras del género *Amazona*, incluyendo *A. leucocephala*, son sexualmente monomórficas desde el punto de vista fenotípico. Para llenar este vacío de conocimiento, todas los individuos fueron molecularmente sexados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la prueba basada en este método que se describe en Russello y Amato (2001), para el gen ligado al sexo que determina al dominio de unión al ADN de la cromosoma-Y (CHD).

### Colecta de datos genéticos

Los datos genotípicos fueron generados para un grupo de nueve loci microsatélites (AgGT04, AgGT17, AgGT19, AgGT21, AgGT22, AgGT42, AgGT72, AgGT83 y AgGT90), desarrollados originalmente para la cotorra de San Vicente (*Amazona guildingii*, Russello et al., 2001; Russello et al. 2005), y que se han aplicado con éxito para la cotorra de Bahamas (subespecie de la cotorra cubana; Russello et al. 2010). Los loci fueron amplificados por PCR utilizando una técnica de marcaje fluorescente con M13- (Schuelke 2000) en un termociclador ABI Veriti en 12.5 µL de reacción. Las condiciones de reacción y programa de PCR fueron las descritas por Russello et al. (2010). Los amplificaciones fueron analizadas en un secuenciador automático de ADN de Applied Biosystems 3130xl. Las longitudes de los fragmentos se determinaron utilizando el software Genemapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Basándose en los resultados de los análisis de datos genotípicos (ver más abajo), para individuos únicos de la Ciénaga de Zapata (n = 8) y Managua (n = 4) se amplificó por PCR un segmento de 655 pares de bases de ADNmt, incluyendo la región de control 1, usando los cebadores LTHR y CR522Rb (Eberhard et al. 2001). Los PCR se llevaron a cabo en un termociclador ABI Veriti en 25 µl, con las condiciones de reacción y programa indicadas en Russello et al. (2010). Los productos de PCR fueron purificados usando ExoSAP-IT (USB® Productos, Santa Clara, CA, USA) y se secuenciados utilizando como terminador Big Dye 3.1 en un secuenciador de ADN ABI 3130xl (Applied Biosystems). Las secuencias fueron visualizadas y editadas usando SEQUENCHER 4,7 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, EE.UU.).

### Archivo de datos

Los datos primarios que subyacen a estos análisis han sido depositados en GenBank (KP453974, KP453975, KP453976, KP453977, KP453978 y

#### Variación genotípica y diferenciación de la población

Los genotipos generados a partir de los nueve loci microsatélites se comprobaron para determinar la presencia de alelos nulos, usando el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout et al. 2004). Las pruebas de desequilibrio de ligamiento entre pares de loci y las pruebas para la desviación del equilibrio genético de Hardy-Weinberg (HWE) se implementaron en el programa GENEPOP 3,3 (Raymond y Rousset 1995). Los niveles de significación fueron ajustados para comparaciones múltiples utilizando la prueba secuencial de Bonferroni (Rice 1989). La diversidad alélica, heterocigosidad observada y esperada, así como el número de alelos privados se calcularon para cada población en cautiverio usando el paquete estadístico GenAlEx 6,5 (Peakall y Smouse 2012). La media del índice de relación de la población se estimó mediante el método propuesto por Queller y Goodnight (1989) e implementado en GenAlEx 6,5 (Peakall y Smouse 2012). Los coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) se calcularon utilizando el programa GENETIX (Belkhir et al. 2004).

Para determinar la posible existencia de estructura genética dentro en la muestra, se implementó el método Bayesiano descrito por Pritchard et al. (2000), en el programa STRUCTUR 2.3.4. Las corridas se realizaron con ajuste a 500.000 réplicas MCMC, después de un período de inicial de 500.000 y usando frecuencias alélicas correlacionadas, bajo un modelo de mezcla. El número de grupos (K) fue variado de 1 a 8 con 20 iteraciones por cada valor de K. El número más probable de grupos se determinó mediante la representación del logaritmo de la probabilidad de los datos ( $\ln Pr(X|K)$ ) en toda la gama de valores de K probados y la selección de la K más probable se realizó donde el valor del  $\ln Pr(X|K)$  alcanzó la estacionalidad (Evanno et al 2005). **De manera adicional se determinaron los valores de  $\Delta K$  tal como se ha implementado en la plataforma STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2011).** Las 20 iteraciones para el valor de K seleccionado, se promediaron utilizando el programa CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg 2007) para producir un único resultado. Los niveles de significación para la diferenciación poblacional se determinaron utilizando el estimador de Weir y Cockerham (1984),  $\theta$ , como se aplica en FSTAT (Goudet 2001).

#### Análisis de parentesco

Los índices de parentesco por pares de individuos se calcularon en el programa SPAGeDi (Hardy y Vekemans 2002). A partir de estos valores se calculó un valor medio del índice de parentesco para cada individuo y las parejas de reproductores potenciales se sugirieron siguiendo el método de clasificación acorde a las medias de parentesco como se describen Ivy y Lacy (2012). La media de parentesco poblacional fue calculada como la media aritmética de todas las medias de parentesco individuales.

#### Análisis filogenéticos

Las secuencias generadas en este estudio ( $n = 12$ ) se combinaron con las obtenidas previamente por Russello et al. (2010,  $n = 34$ ), agrupando a un conjunto de datos que contó con representantes de las cinco subespecies de *A. leucocephala* y dos grupos externos: *A. ventralis* y *A. vittata*. Las secuencias fueron alineadas inequívocamente utilizando al algoritmo MUSCLE implementado en Geneious 6,1 (Biomatters Ltd., San Francisco, CA, EE.UU.), con la configuración predeterminada. Un árbol Bayesiano fue reconstruido utilizando MrBayes 3,1 (Ronquist y Huelsenbeck 2003) y el modelo HKY + I + G de sustitución nucleotídica, este último seleccionado de acuerdo con el criterio de información de Akaike como se aplica en Modeltest v.3.06 (Posada y Crandall 1998). El análisis se llevó a cabo utilizando cuatro cadenas para  $1.1 \times 10^6$  generaciones después de un período inicial de  $1.0 \times 10^4$ , salvando un árbol cada 200 generaciones. Los primeros árboles fueron descartados (25%), y se generó un árbol consenso asumiendo un umbral de probabilidad para el soporte de los nodos del 50%.

## Resultados

#### Variación genotípica y diferenciación de la población

Dos de los nueve loci (AgGT42 y AgGT83) resultaron positivos al análisis de alelos nulos en la Ciénaga de Zapata, pero no en Managua. En la Ciénaga de Zapata, se encontraron cuatro loci con desviaciones del equilibrio genético de HW, mientras que ningún loci mostró una desviación significativa del equilibrio genético de HW en Managua. Evidencias de desequilibrio de ligamiento se encontraron en 28 de 36 comparaciones por pares de loci en la Ciénaga de Zapata, pero sólo en una comparación (AgGT19 / AgGT72) en Managua. Cuando se reevaluaron las pruebas de desequilibrio de ligamiento teniendo en cuenta el análisis de estructura genética revelado en la población cautiva Ciénaga de Zapata (ver más abajo), sólo 1 de 36 y 7 de 36 comparaciones por pares de loci fueron significativas en Zapata  $\alpha$  y Zapata  $\beta$ , respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados y el hecho de que el desequilibrio de ligamiento no ha sido identificado anteriormente en estos mismos loci en las poblaciones naturales y cautivas de múltiples especies de cotorras del género *Amazona* (Leite et al. 2008; Russello y Amato 2004; Wright et al., 2005), incluyendo la cotorra de Bahamas (subespecie de la cotorra cubana; Russello et al. 2010), es probable que estas asociaciones significativas sean un artefacto, resultado de cómo la población cautiva Ciénaga de Zapata fue fundada a través de la captura oportunista de los individuos, especialmente a la luz de la constatación de que los reproductores se asignan a múltiples linajes divergentes (véase más adelante). En consecuencia, todos los análisis posteriores se basaron en los datos genotípicos con los nueve loci microsatélites. El conjunto de datos final contuvo <1% de datos faltantes.

El número más probable de grupos en el análisis de agrupamiento Bayesiano fue  $K = 2$  ( $\Delta K = 133,2$ ; Figura 1). El punto de corte para la asignación completa a un clúster se ajustó a 0,8; donde los individuos con un grado de pertenencia por debajo de este umbral, se consideraron de origen mixto ( $n = 6$ ; Figura 1). Los individuos con dicho origen se excluyeron de los nuevos análisis, con el fin de evaluar la diversidad dentro de los linajes en cada instalación, lo que resultó en un conjunto de datos ajustado a 82 individuos. En todos los nuevos análisis, las muestras se trataron como tres poblaciones: Zapata  $\alpha$  ( $n = 18$ ); B Zapata ( $n = 40$ ); y Managua  $\beta$  ( $n = 24$ ) en función de su asignación en el análisis de estructura genética. Hubo diferenciación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas las comparaciones por pares  $\theta$  entre los tres grupos; el linaje  $\beta$  en Zapata y Managua mostró el valor más bajo (0,043), con mayores niveles detectados para Zapata  $\alpha$  y Managua  $\beta$  (0,181), y Zapata  $\alpha$  y Zapata  $\beta$  (0,166). Sin embargo, un gran número de alelos resultaron privados a cada una de las poblaciones  $\beta$  (Tabla 1). El grupo Zapata  $\alpha$  presentó menores niveles de heterocigosidad (0,64) y número de alelos efectivos (2,1) que los dos grupos  $\beta$ , los cuales exhibieron niveles similares de diversidad para estos índices ( $H_o = 0,75-0,77$ ,  $A_e = 4,3$  a  $4,4$ ; Tabla 1). La media de los índices de relación fue baja en cada grupo, variando desde -0,059 hasta -0,026 (Tabla 1). Managua  $\beta$  mostró el nivel más alto consanguinidad, aunque bastante bajo aun y no significativamente diferente de cero (0,03; Tabla 1). Los dos grupos encontrados en Zapata exhibieron coeficientes de consanguinidad negativos (Tabla 1).

#### Análisis de parentesco

Las medias poblacionales de los índices de parentesco fueron bajas en cada uno de los tres grupos (-0,026 a -0,012), aunque el intervalo de valores dentro de cada grupo fue grande (Tabla 1). Las parejas potenciales de reproductores se establecieron sobre la base de datos de sexado molecular (Tabla Suplementaria 1) y el método clasificación atendiendo a las medias de parentesco, MK (Ivy y Lacy 2012) (Tabla Suplementaria 2). Las parejas de reproductores de alta prioridad, con coeficientes de endogamia por debajo de la media de parentesco poblacional fueron identificadas dentro de los tres grupos (Tabla 1, Tabla Suplementaria 1).

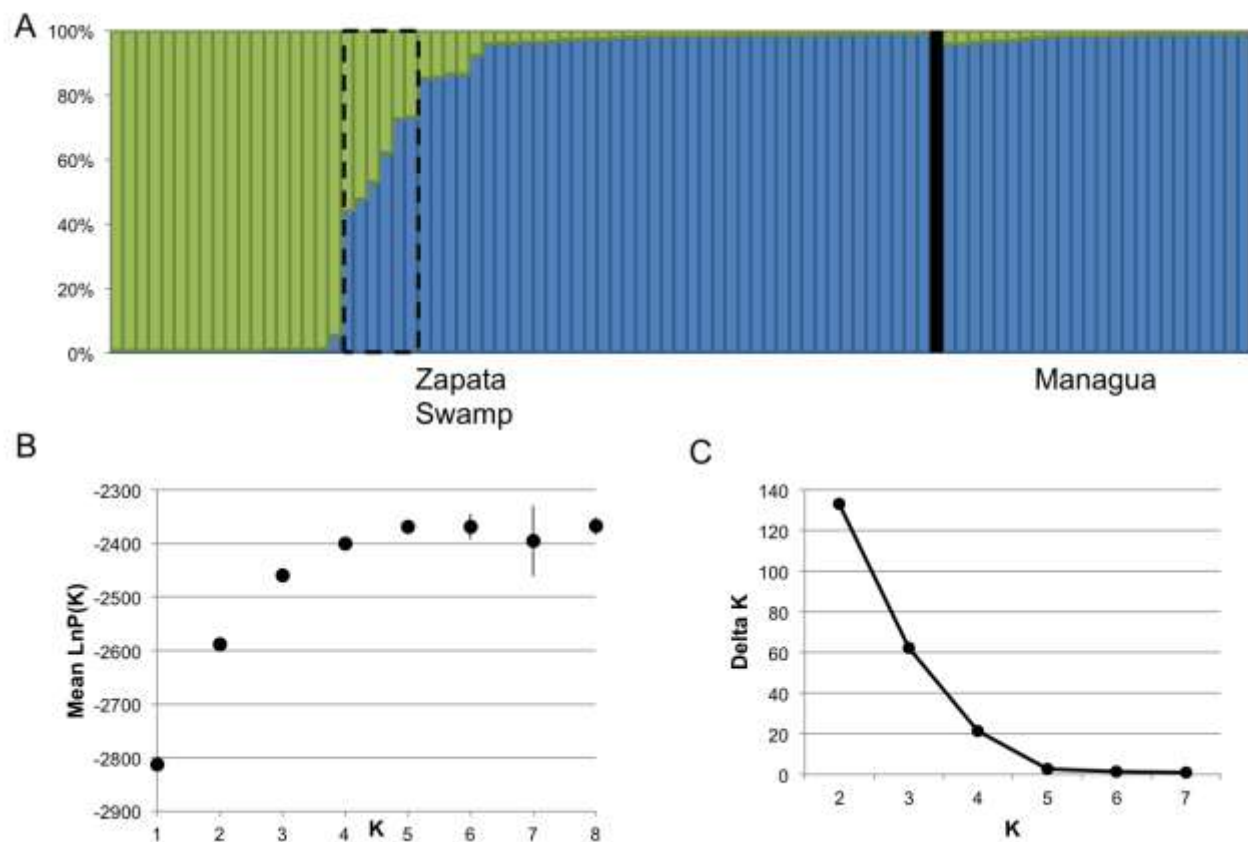


Figure 1. Agrupamiento basado en inferencia Bayesiana de acuerdo al método de Pritchard et al. (2000) e implementado en STRUCTURE. (A) Gráfico de barras mostrando los resultados para el inferido número de grupos,  $K = 2$ . Cada color representa a cada clúster genético inferido (en verde se indica al clúster  $\alpha$ , azul representa al  $\beta$ ); cada barra sobre el eje de las x axis representa a un individuo, con el eje de las y mostrando el porcentaje de pertenencia de cada individuos al cada clúster genético. (B) Representación del correspondiente valor del  $\ln P(K)$  para cada valor of  $K$ . (C) Representación de  $\Delta K$  (Evanno et al. 2005) para detectar el número de  $K$  de mejor ajuste a los datos.

Table 1. Índices de diversidad de las parejas de reproductores para cada uno de los grupos genéticos de *A. I. leucocephala* en los dos programas de cría en cautiverio. Junto a la media de parentesco (MK) se indica el menor y mayor valor de este estimador dentro de la población en cuestión.

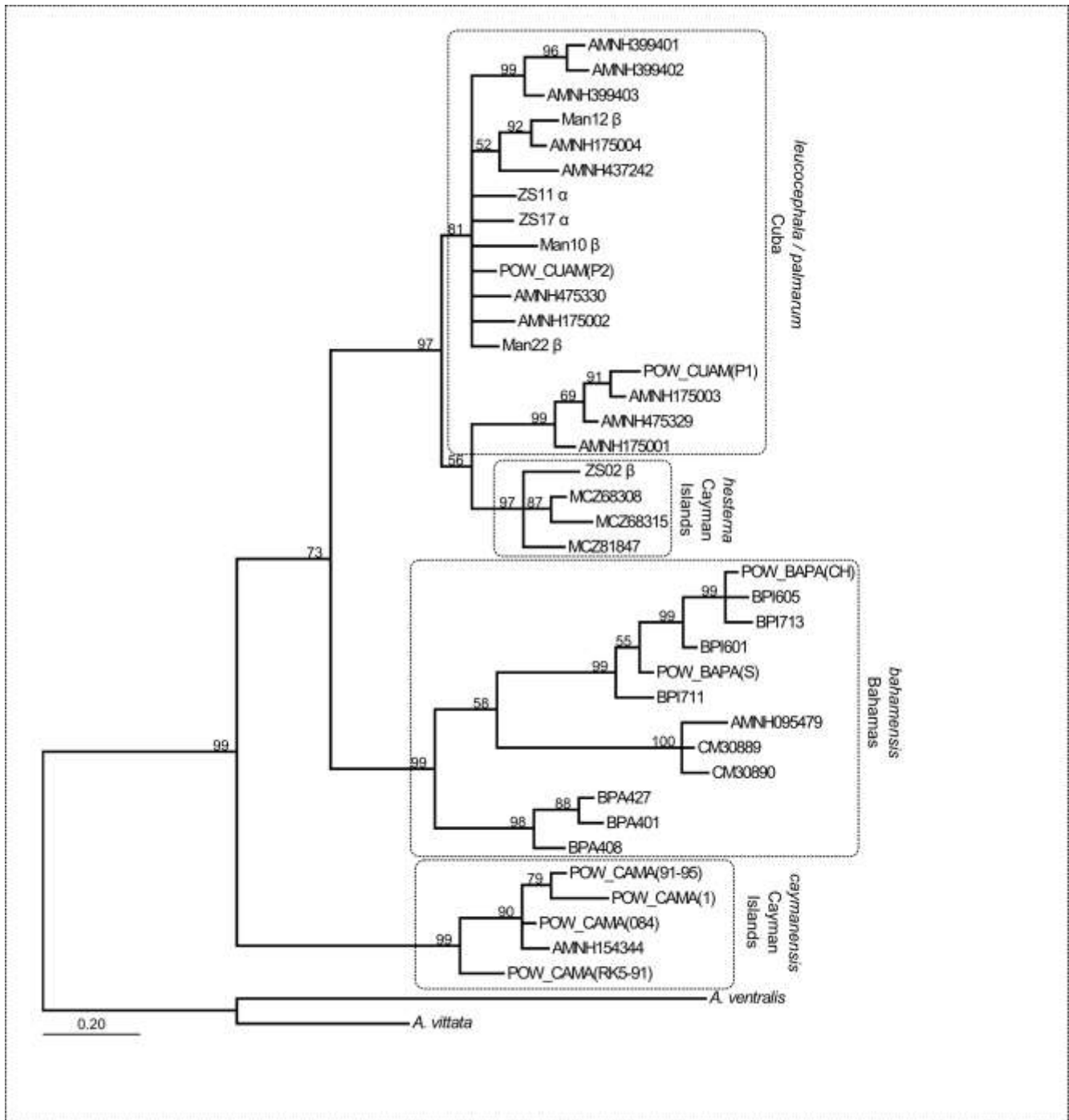
	$N$	$BP$	$H_o$	$H_e$	$P_A$	$A_e$	$MK$ (Intervalo)	$R_{O\&G}$	$F_{IS}$
<b>Zapata <math>\alpha</math></b>	18	8 (5)	0,64	0,50	1	2,1	-0,026 (-0,317, 0,555)	-0,059	-0,24
<b>Zapata <math>\beta</math></b>	40	19 (14)	0,77	0,75	19	4,3	-0,012 (-0,129, 0,317)	-0,026	0,03
<b>Managua <math>\beta</math></b>	24	12 (11)	0,75	0,75	16	4,4	-0,022 (-0,129, 0,222)	-0,043	-0,02

$N$  tamaño de muestra,  $BP$  número de parejas de reproductores con alta prioridad indicada entre paréntesis,  $H_o$  heterocigosidad observada,  $H_e$  heterocigosidad esperada,  $P_A$  alelos privados,  $A_e$  número de alelos efectivos,  $MK$  media de parentesco,  $R_{O\&G}$  media de relación poblacional,  $F_{IS}$  coeficiente de consanguinidad

#### Variación haplotípica y análisis filogenético

Para identificar el origen de los linajes, 12 individuos fueron secuenciados (cuatro de cada uno de los grupos Zapata  $\alpha$ , Zapata  $\beta$  y Managua  $\beta$  cuyos coeficientes de pertenencia al clúster correspondiente según STRUCTURE fueron  $> 0.98$ ) para un fragmento de ADN mitocondrial de 655bp, equivalente al obtenido en estudio previo sobre filogeografía del complejo de cotorras cubanas (Russello et al. 2010). En el presente trabajo, detectamos seis haplotipos, ninguno de los cuales fueron muestreados en estudios previos del complejo (Russello et al. 2010). Cinco de los haplotipos recuperados pertenecen al clado *leucocephala/palmarum* previamente

identificado por Russello et al. (2010), mientras que el otro haplotipo está estrechamente relacionado con los haplotipos publicados en muestras provenientes de la subespecie *hesterna* de las Islas Caimán (Figura 2). Todos los individuos secuenciados y provenientes de los grupos reconocidos en STRUCTURE como Managua  $\beta$  y Zapata  $\alpha$ , se agruparon dentro del clado *leucocephala/palmarum*, mientras que todos los individuos reconocidos como Zapata  $\beta$  se lo hicieron con *hesterna* (Figuras 1 y 2).



**Figure 2.** Árbol basado en inferencia Bayesiana generado a partir de la región de control mitocondrial, tomando información de Russello et al. (2010), mostrando las relaciones entre los haplotipos de *Amazona leucocephala* y la posición de los nuevos individuos secuenciados en este estudio. Los símbolos próximos a los haplotipos provenientes de las poblaciones de Zapata (ZS) y Managua (Man) se corresponden a su agrupamiento atendiendo al grupo genético inferido a partir de los microsatélites ( $\alpha$  or  $\beta$ ) e identificados en el análisis de STRUCTURE. Sobre las ramas se indican las probabilidades bayesianas *a posteriori* (>50%).

**Discusión**

Con la disminución de las poblaciones de la fauna silvestre en todo el mundo, los programas de cría en cautiverio manejados científicamente y los de reintroducción, siguen constituyendo un componente importante en las estrategias de conservación integradas. En condiciones ideales, los fundadores de las poblaciones cautivas son seleccionados en base a sus características genéticas individuales, de manera que la población *ex situ* sea representativa de la magnitud de la diversidad genética *in situ* (Witzenberger y Hochkirch 2011). En muchos casos, sin embargo, los fundadores de poblaciones cautivas se colectan de forma oportunista y con

origen desconocido. Tal fue el caso de los fundadores de las poblaciones cautivas para la cotorra cubana mantenidas en Managua (individuos confiscados del comercio de mascotas) y en la Ciénaga de Zapata (capturados en el medio natural sin evaluación genética previa). Hasta la fecha, las actividades del programa de cría en cautiverio se han dirigido hacia el manejo de las subespecies de cotorras cubanas históricamente reconocidas, manteniéndolas por separado en los diferentes sitios (*A. l. leucocephala* en la Ciénaga de Zapata, *A. l. palmarum* en Managua). Nuestros resultados genéticos, considerados de conjunto con los obtenidos en estudio previo sobre filogeografía de la cotorra cubana

(Russello et al. 2010), revelaron una historia totalmente diferente. La población cautiva de la Ciénaga de Zapata se puede dividir en al menos dos linajes distintos en función de los datos genotípicos, con cuatro individuos con un haplotipo del ADNmt formando un clado bien soportado estadísticamente con los muestreados a partir de ejemplares identificados como la tercera subespecie de cotorra cubana restringida a Cayman Brac (*hesterna*, Figura 2). Los restantes individuos secuenciados en las poblaciones cautivas de la Ciénaga de Zapata y Managua se encontraron intercalados dentro del clado *leucocephala/palmarum*, pero no hay evidencia genética de que estas subespecies sean entidades distintas (Russello et al. 2010). Por otra parte, el mantenimiento (y reproducción) de individuos provenientes de poblaciones naturales distintas puede haber contribuido con cierta probabilidad a nuestros resultados de desequilibrio de ligamiento dentro de la población cautiva de la Ciénaga de Zapata, como predice la teoría de la genética poblacional para las poblaciones subdivididas con contacto reciente (Nei y Li 1973).

Debido a la carencia de libros genealógicos oficiales y a los limitados registros asociados con estos programas, es difícil interpretar estos patrones. El personal de la institución responsable del programa de cría en la Ciénaga de Zapata ha indicado que aves confiscadas de origen desconocido se han introducido en la población (Álvarez Alonso, observación personal). En consecuencia, es posible que individuos de la subespecie *hesterna* endémicas de Cayman Brac hayan sido involuntariamente incluidos en el grupo de reproductores. Sin embargo, los resultados de los análisis de agrupamiento Bayesiano basados en datos de microsatélites no son congruentes con este patrón. Los individuos de la Ciénaga de Zapata con afinidad al clado *hesterna* son miembros del clúster  $\beta$ , el cual se comparte con Managua y con los individuos que forman parte del clado *leucocephala/palmarum* en el árbol basado en el ADNmt. Sin embargo, la falta de datos genotípicos de individuos de referencia para *hesterna*, limita nuestra capacidad para inferir con precisión una contribución genética de esta subespecie de cotorras no presente en Cuba. Estudios adicionales de las poblaciones naturales de todo el complejo de cotorra cubana, combinando ADN mitocondrial y datos de ADN nuclear con evaluaciones morfológicas, serán necesarios para desentrañar las relaciones entre estos taxones reconocidos formalmente, y para evaluar aún más sus contribuciones relativas a las poblaciones cautivas en la isla de Cuba.

En general, los programas de cría en cautiverio se esfuerzan por preservar los linajes evolutivamente distintos para maximizar la diversidad de adaptación y minimizar el potencial de depresión exogámica. En el caso de las cotorras cubanas, las subespecies no se corresponden a los linajes detectados, basado en los datos de los microsatélites. En cambio, hay un linaje que se encuentra en ambas instalaciones de cría, y uno que es único en la Ciénaga de Zapata, con una base geográfica incierta. Hasta que estudios en poblaciones naturales puedan confirmar la subestructura detectada en este estudio, se recomienda seguir el principio de precaución y recomendar sólo establecer parejas de reproductores entre individuos del mismo linaje (Edmands 2007) y la eliminación de los individuos mezclados de los programas de cría. Esta estrategia reduce el tamaño del grupo de reproductores para cada linaje, lo que puede tener efectos a largo plazo sobre los niveles de endogamia y la diversidad genética. Ha habido una amplia discusión sobre los impactos de la formación de agrupaciones y la división taxones en peligro de extinción, potencialmente resultando en extinciones innecesarias (Frankham et al. 2012, 2014; Russello y Amato

2014). Sin embargo, los grupos  $\beta$  en Zapata y Managua se caracterizan actualmente por niveles razonablemente altos de heterocigosidad, bajos niveles de los índices de relación y consanguinidad, y no muestran indicios de disminución de la población (datos no mostrados). Del mismo modo, el grupo  $\alpha$  en la instalación de la Ciénaga de Zapata, aunque posee bajos niveles de diversidad alélica (Tabla 1), todavía mantiene bajos niveles de la media de los índices de relación y niveles de endogamia.

Teniendo en cuenta las recomendaciones para la preservación de la integridad de estos linajes, será especialmente importante para los criadores, tomar decisiones de cría científicamente fundamentadas para reducir al mínimo las consecuencias genéticas del pequeño tamaño de la población. En este sentido, el presente trabajo aporta de manera combinada información de sexado molecular con el método de clasificación acorde a la media de parentesco MK (Ivy y Lacy 2012) para el diseño de parejas de reproductores en cada instalación que mantengan los linajes genéticos, y minimicen las medias de parentesco (Tabla Suplementaria 2). Siguiendo este esquema de formación de parejas, se debe minimizar la endogamia y la diversidad genética retenida debe maximizarse. Debido a que las medias de parentesco y el ordenamiento asociado a estas para la formación de parejas son relativos, en la medida en que se incorporen nuevos individuos al grupo de reproductores, todas las parejas tendrán que ser reevaluadas.

### Conclusiones

Este estudio pone de manifiesto la utilidad de los enfoques moleculares en los aspectos aplicados al manejo de los programas de cría en cautiverio, tanto a corto plazo como a largo plazo. En un nivel muy práctico, identificando correctamente el sexo de los individuos y por lo tanto el establecimiento de parejas de reproductores adecuadas aumentará el éxito inmediato del programa de cría. A largo plazo, el diseño de parejas de reproductores que minimicen la media de parentesco y preserven los distintos linajes ayudará a mantener la diversidad genética de los fundadores, con la reducción de las consecuencias genéticas que conlleva el mantenimiento de pequeñas poblaciones en cautiverio. Debido a que el manejo sobre la base de información genética y demográfica de las poblaciones cautivas demanda de un enfoque continuo y regularizado, se requieren evaluaciones periódicas, sobre todo si se incorporan nuevos fundadores al programa. En el menor de los casos, los conocimientos adquiridos en cuanto a la relación entre los reproductores actuales se pueden utilizar para informar en los futuros enfoques basados en el pedigrí para minimizar las medias de parentesco.

Programas de cría *ex situ* científicamente manejados son más eficaces cuando se integran directamente con las estrategias de conservación y estudio exhaustivo de las poblaciones naturales. En este caso, nuestra falta de conocimiento sobre la extensión y la distribución de la variación genética *in situ* limitó nuestra capacidad para identificar el origen de los múltiples linajes detectados *ex situ*, con la reducción del acervo genético de los reproductores óptimos en cautiverio y limitando potencialmente el reconocimiento de diversidad críptica en la naturaleza. En consecuencia, futuros estudios de las poblaciones naturales de la cotorra cubana son de crítica importancia para llevar a cabo de modo interactivo un enfoque de manejo de la población *in situ/ex situ* que ayude a mantener la viabilidad de esta especie con importancia de conservación nacional e internacional.

entre la Universidad de British Columbia y la Universidad de La Habana (YMG). La financiación para la investigación estuvo a cargo de la Sociedad de Conservación de Vida Silvestre y el Consejo de Investigación de Ciencias Naturales e Ingeniería de Canadá.

### Agradecimientos

Agradecemos a los trabajadores de los criaderos de la Ciénaga de Zapata y Managua, en particular a Gustavo Sosa Rodríguez, Roberto Ramos Targarona y Gabriel Brull de la Empresa Nacional para la Protección de la

### Material Suplementario

El material Suplementario se puede encontrar en <http://www.jhered.-oxfordjournals.org/>

### Financiamiento

El Departamento de Asuntos Exteriores y Comercio Internacional de Canadá y la Oficina Canadiense para la Educación Internacional proporcionó fondos a través del Programa de Líderes Emergentes en las Américas que apoyaron la colaboración y el intercambio de estudiantes

Flora y la Fauna de Cuba, por el apoyo durante el muestreo. Maikel Cañizares Morera y Jessy Castellanos-Gell amablemente revisaron una versión previa de este manuscrito. También reconocemos a la Red de Genética para la Conservación (ReGeneC) por sus importantes contribuciones a la formación de conservacionistas en América Latina.

## Referencias

- Ballou JD, Lacy RC. 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. In: Ballou JD, Gilpin M, Foose TJ, editors. *Population Management for Survival and Recovery*. New York: Columbia University Press.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Collar NJ. 2000. Globally threatened parrots: criteria, characteristics and cures. *Int Zoo Yearb*. 37:21-35.
- Conde DA, Flesness N, Colchero F, Jones OR, Scheuerlein A. 2011. An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science*. 331:1390-1391.
- Doyle RW, Perez-Enriquez R, Takagi M, Taniguchi N. 2001. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica*. 111:291-304.
- Earl DA, Vonholdt BM. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Res*. 4:359-361.
- Eberhard JR, Wright TF, Bermingham E. 2001. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular biology and evolution*. 18:1330-1342.
- Edmands S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol Ecol*. 16:463-475.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 14:2611-2620.
- Frankham R, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MDB, Fenster CB, Lacy RC, Mendelson JR, Porton IJ, Ralls K, Ryder OA. 2012. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*. 153:25-31.
- Frankham R, Lacy RC, Ballou JD, Dudash MR, Eldridge MDB, Fenster CB, Mendelson JR, Iii, Porton IJ, Ralls K, Ryder OA. 2014. Species concepts for conservation - Reply to Russello and Amato. *Biological Conservation*. 170:334-335.
- González Alonso H, Rodríguez Schettino L, Rodríguez A, Mancina CA, Ramos García I. 2012. Libro rojo de los vertebrados de Cuba. pp. 304. Editorial Academia, La Habana.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hardy OJ, Vekemans X. 2002. SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes*. 2:618-620.
- Ivy JA, Lacy RC. 2012. A comparison of strategies for selecting breeding pairs to maximize genetic diversity retention in managed populations. *Journal of Heredity*. 103:186-196.
- Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinforma*. 23:1801-1806.
- Lacy RC. 2000. Should we select genetic alleles in our conservation breeding programs? *Zoo Biol*. 19:279-282.
- Lacy RC. 2013. Achieving true sustainability of zoo populations. *Zoo Biol*. 32:19-26.
- Leite KCE, Seixas GHF, Berkunsky I, Collevatti RG, Caparroz R. 2008. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. *Genetics and Molecular Research*. 7:819-829.
- Montgomery ME, Ballou JD, Nurthen RK, England PR, Briscoe DA, Frankham R. 1997. Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biol*. 16:377-389.
- Nei M, Li WH. 1973. Linkage disequilibrium in subdivided populations. *Genetics*. 75:213-219.
- Ottens-Wainright P, Halanych KM, Eberhard JR, Burke RI, Wiley JW, Gnam RS, Aquilera XG. 2004. Independent geographic origin of the genus *Amazona* in the West Indies. *J Caribbean Ornithol*. 17:23-49.
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAIX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinforma*. 28:2537-2539.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinforma*. 14:817-818.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945-959.
- Queller DC, Goodnight KF. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*. 43:258-275.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 86:248-249.
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinforma*. 19:1572-1574.
- Russello M, Calcagnotto D, Desalle R, Amato G. 2001. Characterization of microsatellite loci in the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Mol Ecol Notes*. 1:162-164.
- Russello MA, Amato G. 2001. Application of a noninvasive, PCR-based test for sex identification in an endangered parrot, *Amazona guildingii*. *Zoo Biology*. 20:41-45.
- Russello MA, Amato G. 2004. *Ex situ* population management in the absence of pedigree information. *Molecular ecology*. 13:2829-2840.
- Russello MA, Amato G. 2014. Operationalism matters in conservation: Comments on Frankham et al. (2012). *Biological Conservation*. 170:332-333.
- Russello MA, Lin K, Amato G, Caccone A. 2005. Additional microsatellite loci for the endangered St. Vincent Parrot, *Amazona guildingii*. *Conserv Genet*. 6:643-645.
- Russello MA, Stahala C, Lalonde D, Schmidt KL, Amato G. 2010. Cryptic diversity and conservation units in the Bahama parrot. *Conserv Genet*. 11:1809-1821.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnol*. 18:233-234.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4:535-538.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*. 38:1358-1370.
- Witzenberger KA, Hochkirch A. 2011. *Ex situ* conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodivers Conserv*. 20:1843-1861.
- Wright TF, Rodriguez AM, Fleischer RC. 2005. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona aurocollariata*. *Mol Ecol*. 14:1197-1205.