

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO INTERNACIONAL EN CONSERVACION
Y MANEJO DE VIDA SILVESTRE

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL DE LA
LAPA VERDE (*ARA AMBIGUUS*) EN COSTA RICA

Hersson Alonso Ramírez Molina

Heredia, noviembre de 2018

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador de Postgrado
de la Universidad Nacional para optar al título de Magister Scientiae
en Conservación y Manejo de Vida Silvestre

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL DE LA
LAPA VERDE (*ARA AMBIGUUS*) EN COSTA RICA

Hersson Alonso Ramírez Molina

Tesis presentada para optar al grado de Magister Scientiae en Conservación y Manejo de
Vida Silvestre. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de
Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador



Caterina Guzmán Verri, PhD.

Representante del Consejo Central de Posgrado



Luis Diego Alfaro Alvarado, PhD.

Representante del ICOMVIS



Manuel Spínola Parallada, PhD.

Tutor



M.Sc. Otto Monge Solano

Asesor



M.Sc. Carmen Hidalgo Calderón

Asesora



Hersson Alonso Ramírez Molina

Sustentante

RESUMEN

La preocupación por la conservación de muchas especies amenazadas, ha destacado la especial importancia de la información genética, y ha convertido al mantenimiento de la diversidad genética en uno de los mayores objetivos de la biología de la conservación. Uno de los usos más importantes de la genética en conservación es determinar los patrones genéticos de especies y poblaciones que sufren de perturbaciones humanas como la lapa verde (*Ara ambiguus*). Esta se encuentra en Peligro de Extinción debido principalmente a la pérdida de su hábitat y el saqueo de sus nidos. En Costa Rica, la especie antes distribuida por toda la región Caribe ahora se encuentra restringida principalmente al Caribe norte, donde se ubica el remanente de su hábitat reproductivo. Dicha disminución en su distribución en el país pudo estar acompañada de una reducción drástica en su tamaño poblacional. Esta posible disminución en el tamaño efectivo de la población, pudo traer consecuencias a su integridad genética y por ende poner en riesgo su supervivencia a largo plazo. A pesar de esto, la gran mayoría de los patrones genéticos poblacionales de la lapa verde son desconocidos en sus poblaciones silvestres. Por lo tanto, existe un vacío de información en una rama que puede aportar a su conservación y el manejo. En este estudio se analizaron los patrones de variabilidad y diferenciación genética poblacional de la lapa verde en Costa Rica. Además, se evaluó el grado de parentesco, se buscaron indicios de endogamia y de un evento reciente de cuello de botella genético. Para esto, se extrajo ADN de plumas y heces colectadas de manera no invasiva en seis localidades dentro del área de distribución de la lapa verde en Costa Rica. Se levantaron perfiles de ADN con base en siete marcadores microsátélites. Los valores de variabilidad genética observados en la lapa verde ($H_E = 0.587$ y $N_A = 4$) fueron más bajos que los de especies de guacamayas con menor categoría de amenaza, pero no tan bajos como los reportados para otras especies de guacamayas amenazadas. No se encontraron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg ni evidencia de endogamia, y se observó un bajo porcentaje de individuos emparentados. Actualmente las lapas verdes en Costa Rica pertenecen a una misma población. Se encontraron resultados contrastantes para un evento reciente de cuello de botella genético. Factores como el flujo génico, el crecimiento de la población, y la longevidad de la especie pudieron contribuir al patrón observado.

ABSTRACT

The concern for the conservation of many threatened species, has highlighted the importance of genetic information, and has transformed the maintenance of genetic diversity in one of the major goals in conservation of biology. One of the most important uses of genetics in conservation is to determine the genetic patterns of species and populations that suffer human disturbances such as the great green macaw (*Ara ambiguus*). This species is listed as Endangered (EN) due mainly to the loss of its habitat and the nest poaching. In Costa Rica, this species was distributed throughout the Caribbean region but is currently mainly restricted to the northern Caribbean, where the remnant of its reproductive habitat is found. This decrease in its distribution in the country could be accompanied by a dramatic reduction in its population size. This possible decrease in the population effective size of the great green macaw can bring consequences to its genetic integrity and therefore jeopardize its long-term survival. Despite this, most of the green macaw population genetic patterns are unknown in the wild. Therefore, there is an information gap in a branch that can contribute to the conservation and management of this species. In this study, the patterns of genetic variability and population structure of the great green macaw in Costa Rica were analyzed. In addition, relatedness and inbreeding was sought, as well as signs of a recent population genetic bottleneck event. For this, DNA was extracted from feathers and feces collected non-invasively in six localities within the distribution of the great green macaw in Costa Rica. DNA profiling were based on seven microsatellite primers. The values of genetic variability observed in the great green macaw ($H_E = 0.587$ y $N_A = 4$) were lower than those from species of macaws with lower threat category, but not as low as those reported for other threatened species of macaws. No deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium or evidence of inbreeding were found, and there was a low percentage of related individuals in the data set. Currently, the individuals of great green macaw in Costa Rica belong to the same population. Contrasting results for a recent genetic bottleneck event were found. Factors such as gene flow, population growth, and the longevity of the species could contribute to the observed pattern.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas y organizaciones que con su apoyo hicieron de esta investigación una realidad. Deseo agradecer al Centro Científico Tropical, especialmente a Alexander González, por el gran apoyo brindado para la colecta de muestras en el Refugio Nacional de Vida Silvestre Mixto Maquenque. También, agradezco enormemente a Ulises Alemán por toda su ayuda y por haber compartido su sabiduría conmigo. Agradezco también a la familia de Ulises por haberme abierto las puertas de su hogar. Externo mi agradecimiento al Área de Conservación Tortuguero y al SINAC por su colaboración en la colecta de muestras en el Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado. Agradezco a la Estación Biológica Caño Palma y a la Estación Biológica El Zota por permitirme la colecta de muestras en sus instalaciones. Deseo agradecer a Geovanny Herrera por toda su colaboración para la colecta de muestras en la finca de cacao orgánico FINMAC en Guácimo. Del mismo modo, mi agradecimiento a Cecilia Juárez por haber apoyado mi investigación al recibirme en su casa.

Deseo agradecer de todo corazón a mi querida Margarita Gil Fernández, por siempre estar ahí apoyándome de una u otra forma en cada una de las fases de mi tesis. Gracias a ella pude seguir adelante en muchas de las etapas más difíciles de esta tesis. Además, agradezco a Jaime Restrepo, Elsie Chávez, así como a los voluntarios y administradores de la Estación Biológica Caño Palma, por su valiosa ayuda en la colecta de muestras en el campo. También, agradezco a Guisselle Monge Arias por brindarme una cantidad importante de muestras para la investigación.

Por otro lado, quiero agradecer enormemente a los 57 donadores de la campaña de crowdfunding. Su aporte fue fundamental para que este proyecto pudiera ser realizado. Mi agradecimiento a todos los miembros del Laboratorio de Genética de la Conservación de la Universidad de Costa Rica, quienes de una u otra forma me ayudaron a finalizar con éxito la fase de laboratorio. Agradezco a mi comité de tesis, Manuel Spínola Parallada, Otto Monge Solano y Carmen Hidalgo Calderón, por su asesoría y su guía a través de este proceso.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mis compañeros de maestría. Cada uno de ellos me dejó enseñanzas muy valiosas para mi vida. Con ellos pasé tres de los años más maravillosos de mi vida y que no olvidaré jamás.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que me han apoyado y han creído en mí. Es gracias a ellas que he logrado llegar hasta aquí.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
La genética en la conservación de las especies.....	1
Objeto de estudio: la lapa verde (<i>Ara ambiguus</i>).....	4
Estado de conservación de la lapa verde	7
La genética en la conservación de las guacamayas.....	9
OBJETIVOS	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
ÁREA DE ESTUDIO	13
RNVSM	13
RNVSBC.....	14
EBEZ.....	15
EBCP	15
PNT.....	16
Guácimo.....	16
METODOLOGÍA.....	17
Colecta de muestras	17
Extracción de ADN.....	18

Aplicación de marcadores moleculares y perfiles de PCR.....	18
Análisis genético	20
Indicadores de variabilidad genética y parentesco	21
Diferenciación genética poblacional	22
Análisis de cuello de botella genético.....	23
RESULTADOS	24
Calidad del set de datos y de los marcadores microsatélites.....	24
Variabilidad genética y parentesco.....	27
Diferenciación genética poblacional	29
Análisis de cuello de botella genético.....	31
DISCUSIÓN.....	33
Calidad del set de datos y de los marcadores microsatélite	33
Variabilidad genética y parentesco.....	37
Diferenciación genética poblacional	40
Análisis de cuello de botella genético.....	43
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES.....	50
IMPLICACIONES PARA EL MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE ...	52
LITERATURA CITADA	54
ANEXOS.....	78

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Número de muestras de plumas y heces de *Ara ambiguus* colectadas en cada una de las seis localidades de muestreo en el Caribe norte de Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017. Entre paréntesis se indica el número de muestras de plumas y heces que fueron incluidas en el estudio según su sitio de colecta..... 25
- Cuadro 2.** Resultados de variabilidad genética de las 81 muestras de *Ara ambiguus* colectadas entre julio del 2016 y marzo del 2017 en Costa Rica y amplificadas para los siete marcadores microsatélite. Se reporta el número de muestras amplificadas por marcador (n), número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_O), esperada no sesgada (UH_E) y el coeficiente de endogamia (F_{is}). 28
- Cuadro 3.** Porcentaje de parentesco entre los 81 individuos de *Ara ambiguus* muestreados en Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017, calculado por medio del estimador TrioML de Wang (2007)..... 28
- Cuadro 4.** Resultados del análisis de cuello de botella bajo el modelo mutacional de dos fases (TPM) para los siete marcadores microsatélite utilizados en las 81 muestras de *Ara ambiguus* colectadas en Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017. Se reporta la heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva (H_{eq}), y desviación estándar (DE). Se reporta también la significancia de la prueba de Wilcoxon ($\alpha = 0.05$) para el exceso (P_E) y déficit (P_D) de heterocigosidad. 32
- Cuadro 5.** Niveles de heterocigosidad (H_e) y número promedio de alelos (N_A) reportados en estudios previos para diferentes especies de guacamayas usando marcadores microsatélites. Se reporta la categoría de amenaza para cada especie según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). LC = Preocupación Menor, VU = Vulnerable, CE = En Peligro Crítico. 38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ubicación de las seis localidades de colecta de muestras de ADN de *Ara ambiguus* en el Caribe norte de Costa Rica, visitadas durante la fase campo entre julio del 2016 y marzo del 2017. Se muestran en gris el Refugio Nacional de Vida Silvestre Mixto Maquenque (RNVSM), el Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado (RNVBC), el Parque Nacional Tortuguero (PNT) y el cantón de Guácimo. Señalados con una bandera se muestra la ubicación de la Estación Biológica El Zota (EBEZ) y la Estación Biológica Caño Palma (EBCP). Se muestra mediante puntos rojos los sitios principales de colecta de muestras en cada una de las localidades..... 14
- Figura 2.** Porcentaje de datos faltantes por marcador y por sitio de colecta de las 81 muestras de *Ara ambiguus* de Costa Rica. 26
- Figura 3.** Curva de acumulación de genotipos para las 81 muestras de *Ara ambiguus* de Costa Rica genotipadas para siete marcadores. El número de marcadores fue muestreado aleatoriamente (1 000 veces) sin reemplazo hasta alcanzar n-1 marcadores. La línea roja punteada representa el 100% de los genotipos multilocus observados..... 26
- Figura 4.** Inferencia del número de agrupamientos genéticos detectados por STRUCTURE para las 81 muestras de *Ara ambiguus* colectadas en Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017. Se muestra la variación de ΔK para $K = 2$ a $K = 9$ según Evanno et al. (2005)..... 30
- Figura 5.** Gráfico de barras de los coeficientes de membresía (Q) estimados por STRUCTURE para cada una de las 81 muestras de *Ara ambiguus* cuando $K = 1$ y $K = 2$. Los individuos se dividieron en los seis sitios de muestreo. Cada color representa una población genética hipotética distinta según Evanno et al. (2005). 31
- Figura 6.** Gráfico de distribución de las frecuencias alélicas de la prueba de cambio de moda. Se muestra la proporción de alelos para cada clase de frecuencia alélica de los siete marcadores microsatélite utilizados. 32

LISTA DE ABREVIATURAS

RNVSM = Refugio Nacional de Vida Silvestre Mixto Maquenque

RNVBC = Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado

EBEZ = Estación Biológica El Zota

EBCP = Estación Biológica Caño Palma

PNT = Parque Nacional Tortuguero

CCT = Centro Científico Tropical

STC = Sea Turtle Conservancy

EHW = Equilibrio Hardy-Weinberg

MCMC = Cadenas Markovianas de Monte Carlo

AMOVA = Análisis de Varianza Molecular

TPM = Modelo Mutacional de Dos Fases

DE = Desviación Estándar

EE = Error Estándar

P_D = Probabilidad de Identidad

H_o = Heterocigosidad Observada

UH_E = Heterocigosidad Esperada No Sesgada

H_e = Heterocigosidad Esperada

H_{eq} = Heterocigosidad Esperada Bajo Equilibrio Mutación-Deriva

F_{is} = Coeficiente de Endogamia

IC = Intervalo de Confianza

Q = Coeficiente de Membresía

UICN = Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

V = Varianza

INTRODUCCIÓN

La genética en la conservación de las especies

La definición de biodiversidad incluye no solamente la diversidad de ecosistemas, especies y poblaciones, sino también la diversidad genética (Frankham et al. 2002, Asmelash et al. 2017). Esta última es, además, el nivel más fundamental de la biodiversidad (Bálint et al. 2011). Es esencial para la selección natural, así como para la viabilidad de las poblaciones a corto y largo plazo. En el corto plazo, la diversidad genética provee un efecto amortiguador contra colapsos poblacionales en eventos de cambios ambientales drásticos. En el largo plazo, ésta compone la materia prima para la evolución y provee a las poblaciones la capacidad biológica para reaccionar a futuros cambios en el ambiente (Laikre et al. 2009). Esto, en combinación con la preocupación por la conservación de muchas especies amenazadas, ha destacado la especial importancia de la información genética para la conservación (Allendorf et al. 2013). En ese sentido, la UICN reconoce la necesidad de conservar la biodiversidad en tres niveles; diversidad genética, diversidad de especies y diversidad de ecosistemas (Frankham 2005). Eso ha convertido al mantenimiento de la diversidad genética en uno de los mayores objetivos de la biología de la conservación (Fernández et al. 2004, Laikre et al. 2010).

El creciente entendimiento de las consecuencias evolutivas de la pérdida de diversidad genética llevó a la aparición de la genética de la conservación. Esta se enfoca en la aplicación de la teoría y métodos genéticos para la conservación y restauración de la biodiversidad (Frankham 2003, Stockwell et al. 2003, Frankham 2010, Allendorf et al. 2013). En el campo de la genética de la conservación, se hace uso de análisis de genética molecular para dilucidar aspectos de la biología de las especies que son relevantes para el manejo y la conservación, como lo son: endogamia, diversidad genética, potencial evolutivo, deriva genética, acumulación y pérdida (purga) de mutaciones deletéreas, flujo génico, fragmentación de poblaciones, incertidumbres taxonómicas, estudios forenses, entre muchas más (Frankham 2003, Frankham et al. 2004). Dicha información producto de la genética de la conservación, en conjunto con la ecología y el manejo del hábitat, provee los fundamentos técnicos de la biología de la conservación (Woodruff 2001).

En especial, las herramientas genéticas encuentran su mayor aplicación en las etapas iniciales del ciclo de conservación, donde domina la definición de las unidades de conservación (Rodríguez-Clark et al. 2015). Por ejemplo, a través de herramientas genéticas se aportó evidencia fuerte en apoyo de la existencia de tres subespecies de *Charadrius alexandrinus* en norte (*C. a. nivosus*), sur (*C. a. occidentalis*) y el Caribe (*C. a. tenuirostris*) de América (Funk et al. 2007); las cuales fueron establecidas con anterioridad con base a diferencias en la coloración del plumaje. Sin embargo, se proponen cambios en la delimitación geográfica entre la subespecie de Norteamérica y la del Caribe. En especial, los resultados determinan que la población de Puerto Rico, antes considerada parte de la subespecie de Norteamérica, debe ser considerada como parte de la del Caribe. Además, debido a su diferenciación genética, el tamaño extremadamente pequeño de la población y la baja variación genética, se sugiere que dicha población debe tener una alta prioridad de conservación.

También, las herramientas genéticas, a través de ADN mitocondrial, han permitido identificar zonas de importancia para la conservación de *Sphyrna lewini* como lo son las zonas de cría (Quintanilla et al. 2015). Además, éstas han sido utilizadas para definir unidades de manejo en la especie amenazada *Pteronura brasiliensis* (Caballero et al. 2015) a través de la diferenciación de grupos filogeográficos (filogrupos). Esta información es especialmente importante para los proyectos de reintroducción de la especie, ya que permite definir las localidades óptimas para la liberación de individuos y para el mejoramiento de los protocolos de cría en cautiverio.

Una vez identificadas las unidades de conservación, las técnicas genéticas pueden contribuir ampliamente a una mejor comprensión de los problemas que éstas enfrentan (DeSalle & Amato 2004, Rodríguez-Clark et al. 2015). Por ejemplo, éstas han permitido dar a conocer como la fragmentación del hábitat producto de las actividades humanas han dividido la que originalmente fuera una población continua única de *Saguinus bicolor* en Manaus, Brazil (Farias et al. 2015). Las subpoblaciones actuales se encuentran confinadas en pequeños parches aislados de bosque, y han mostrado reducción de su diversidad genética, así como evidencia clara de cuello de botella genético. Los autores indican la necesidad de implementar planes enfocados a la conectividad de los fragmentos para contrarrestar dichos efectos.

En otros casos, las herramientas genéticas han aportado a la conservación de una especie en diferentes etapas. Aquí se puede mencionar el ejemplo de *Strix occidentalis*, una especie que ha sido muy importante en la conservación del bosque maduro del Pacífico Noroeste de Estados Unidos (Forsman et al. 2011). En esta especie, la genética ha permitido definir su estatus taxonómico y ha evidenciado hibridación entre subespecies. Lo anterior ha hecho posible la designación de Unidades Evolutivamente Significativas y Unidades de Manejo para las diferentes subespecies. Además, ha sido posible entender cómo la disminución en sus números debido a la pérdida de su hábitat ha afectado a sus poblaciones; encontrando poblaciones con flujo génico restringido y señales fuertes de cuello de botella. En la actualidad el trabajo está enfocado a determinar las fuentes de endogamia, examinar pedigrís, patrones de dispersión de juveniles y otros patrones poblacionales importantes (Haig et al. 2001, Funk et al. 2010, Haig et al. 2016).

La genética también ha sido muy valiosa para guiar y monitorear proyectos de reintroducción de especies amenazadas. Por ejemplo, ha ayudado en el éxito de la cría en cautiverio y las reintroducciones de *Gymnogyps californianus* (Ralls & Ballou 2004, Walters et al. 2010, D'Elia et al. 2016). Además, análisis de pedigrí han permitido monitorear el estado de una población reintroducida de *Falco punctatus* (Ewing et al. 2008). Los resultados mostraron que la población ha ido acumulando endogamia desde su reintroducción, así como ha ido perdiendo diversidad genética. Los autores recomiendan implementar estrategias para reducir el impacto de estos factores en la especie.

En particular, la proliferación en las últimas décadas de tecnologías genéticas, más precisas y baratas, ha sido un factor clave en la integración de la genética en la biología de la conservación (DeYoung & Honeycutt 2005, Kinnison et al. 2007, Bertorelle et al. 2009). Cuatro métodos, el uso de polimorfismo de longitud amplificada (AFLPS), secuenciación de ADN, análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNP) y los microsatélites son las técnicas más usadas en la genética de la conservación en la actualidad (DeSalle & Amato 2004). En especial, los marcadores moleculares microsatélite han resultado enormemente útiles. Los microsatélites son un tipo de marcador molecular que tiene la ventaja de poder ser amplificado vía PCR, por lo que no requiere grandes cantidades de ADN (Faria & Miyaki 2006). Son ampliamente utilizados en la caracterización de poblaciones debido a que son codominantes, multialélicos,

altamente polimórficos. Además de por la facilidad técnica con la que se pueden analizar usando marcadores específicos complementarios a las secuencias únicas que lo flanquean (Ojeda et al. 2012).

Sumado a las ventajas mencionadas, los microsatélites poseen una característica que les proporciona un valor agregado; la posibilidad de utilizar los marcadores desarrollados para una especie en otras emparentadas a diferentes niveles. Este hecho disminuye el esfuerzo temporal y económico que involucra la construcción de marcadores específicos, a través de la elaboración de librerías genéticas (Ojeda et al. 2012). Sin embargo, la aplicación de los marcadores moleculares en conservación no se limita solo a esto. Además, pueden contribuir de manera fundamental al entendimiento de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies en peligro (Godoy 2009).

En este sentido, uno de los usos más importantes de los marcadores moleculares es determinar la variabilidad genética de especies y poblaciones que sufren de perturbaciones humanas. Entre los que se pueden mencionar a los miembros de la familia Psittacidae (Aves: Psittaciformes). Estos pertenecen a uno de los grupos de aves más amenazados del mundo. Alrededor del 30% de las especies de esta familia están en peligro o vulnerables. De éstas, se puede contar a nueve especies de guacamayas en alguna categoría de amenaza (Guedes 2004, Faria & Miyaki 2006). Entre ellas, se encuentra la especie objeto de la presente investigación.

Objeto de estudio: la lapa verde (*Ara ambiguus*)

La lapa verde (*A. ambiguus*), es la especie de guacamaya más grande de las dos que existen en Costa Rica, y el segundo psitácido más grande del nuevo mundo. Solamente es superada por el guacamayo jacinto (*Anodorhynchus hyacinthinus*; Abramson et al. 1996). Esta especie se distribuye desde el este de Honduras hasta el norte de Colombia, con un par de poblaciones aisladas en Ecuador. En la literatura se reconoce que su población está fragmentada en siete poblaciones aisladas a lo largo de toda su distribución debido a la pérdida de hábitat, las cuales son: Chongón-Colonche (Ecuador), Esmeraldas (Ecuador), Darien-Kuna Yala (Colombia-Panamá), Cerro Hoya (Panamá), Donoso-Bocas del Toro-Talamanca (Panamá-Costa Rica), Maquenque-Indio Maíz (Costa Rica-Nicaragua), y Bosawas-Mosquitia hondureña (Nicaragua-Honduras; Monge et al. 2009). Además, se reconocen 5 áreas principales de su distribución: la

frontera entre Honduras y Nicaragua, la frontera entre Nicaragua y Costa Rica, la región del Darién de Panamá y Colombia, y 2 poblaciones muy pequeñas en Ecuador (Chassot et al. 2004, Hardman 2011).

La lapa verde ha sido dividida en dos subespecies (*A. a. ambiguus* y *A. a. guayaquilensis*) debido a diferencias morfológicas. La denominada subespecie *A. a. ambiguus*, ocurre desde Honduras hasta el noroeste de Colombia, mientras que *A. a. guayaquilensis* ocurre en el oeste de Ecuador (Forshaw 2010). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que genéticamente esta especie no presenta subespecies (Eberhard et al. 2015). En cuanto a su tamaño poblacional, se estima que existen menos de 2 500 individuos maduros (menos de 3 700 con juveniles incluidos). No obstante, su tamaño poblacional real aún no se encuentra claro (USFWS 2015). Se cree que la población de *A. a. guayaquilensis* está compuesta por alrededor de 100 individuos, ubicados en dos áreas de Ecuador (Parr & Juniper 2010).

Específicamente en Costa Rica, el tamaño poblacional estimado en 2009 fue de 302 individuos (Monge et al. 2010). Estudios ecológicos subrayan que es muy probable que la población costarricense constituya una metapoblación en conjunto con la población reproductiva que anida al sureste de Nicaragua. Se ha estimado que la metapoblación conformada por ambas subpoblaciones estaría compuesta por aproximadamente 871 individuos (Chassot et al. 2004, Monge et al. 2010). Aunque aún no se ha determinado la edad a la cual los individuos de esta especie comienzan a reproducirse en vida silvestre, se sabe que en cautiverio su reproducción comienza a los cinco o seis años de edad (Chassot et al. 2004). En la lapa verde, los individuos forman parejas de por vida. Realiza sus nidos en cavidades naturales de árboles (principalmente de almendro). Se ha observado que pueden ser fieles a la misma cavidad de anidamiento por muchos años si esta permanece sin alteración; aunque también pueden alternar entre sitios de anidamiento cada año (Chun 2008, Villate et al. 2009, Parr & Juniper 2010).

A lo largo de su distribución, la lapa verde habita las tierras bajas principalmente del bosque tropical húmedo del Atlántico. Aunque, en ocasiones se le puede encontrar en bosques deciduos, y en áreas relativamente abiertas o parcialmente deforestadas. Se distribuye desde el nivel del mar hasta generalmente los 600 m. Sin embargo, puede llegar a ser observada hasta los 1 000 m o 1 500 m sobre el nivel del mar, dependiendo de la disponibilidad de su hábitat. El hábitat idóneo para esta especie está determinado por la presencia de almendro (*Dipteryx panamensis*), el cual es un árbol emergente del

dosel del bosque lluvioso, endémico de las tierras bajas del atlántico de América Central. En Costa Rica, se ha observado una relación muy cercana de la lapa verde con este árbol, ya que el 90% de los nidos los realiza en esta especie, y entre el 80% y el 90% de su dieta se basa en el fruto del almendro (Chassot et al. 2004, Chun 2008, Hanson et al. 2008, Eberhard et al. 2015).

En Costa Rica, la lapa verde presenta un patrón de migraciones temporales altitudinales entre su zona de anidamiento y su zona de post anidamiento. Durante los meses de diciembre a junio los individuos se reproducen en las llanuras del Caribe norte. Se estima que cada pareja utiliza un área de acción promedio de 550 ha durante las diferentes fases de su reproducción. Una vez que los polluelos están listos para volar, la mayoría de las parejas y sus crías se unen en grupos de hasta 20 individuos y se trasladan hacia otras zonas, principalmente en las faldas norteñas de la Cordillera Volcánica Central. Ahí pasarán los meses entre mayo y noviembre, para luego regresar a la zona de reproducción (Chassot et al. 2004, Chun 2008).

Se ha observado que la migración de la lapa verde fuera del área de anidamiento coincide con la reducción de la disponibilidad de frutos de almendro. De acuerdo con esto, los expertos asumen que dicha migración corresponde a la búsqueda de sitios con árboles de otras especies que presenten una mayor oferta de alimento y que no se encuentran en el hábitat reproductivo. En Costa Rica, se han reportado hasta 35 especies de las cuales se ha observado alimentarse a la lapa verde en pequeñas cantidades. Entre ellas, se destaca el árbol de titor (*Sacoglottis trichogyna*) como una importante fuente de alimento alternativa al almendro (Chassot et al. 2004).

Actualmente, la lapa verde se encuentra catalogada como en Peligro de Extinción (EN), tanto por la lista roja de la IUCN (International Union for Conservation of Nature, BirdLife International 2013), como por el acta de especies amenazadas (ESA) del servicio de pesca y vida silvestre de Estados Unidos. Además, se encuentra listada en el apéndice I de CITES (USFWS 2015). A nivel de Costa Rica, se incluye dentro de la Ley de Conservación de la Vida Silvestre como una especie en peligro de extinción (Reglamento a la Ley de Vida Silvestre 2005).

Estado de conservación de la lapa verde

En la actualidad, la lapa verde enfrenta amenazas que la han puesto en el estado de preocupación que se encuentra actualmente. Estas ponen en riesgo su supervivencia a largo plazo, tanto en Costa Rica como a lo largo de su distribución geográfica. Una de las más importantes es la pérdida de hábitat. Esta especie ha sufrido una pérdida y fragmentación drástica de su hábitat producto de las actividades humanas. Se estima que en el periodo 1940-1977 su hábitat en el país se redujo en un 42%. Para el año 1977, el bosque correspondiente a su hábitat abarcaría solo un 45% de su extensión original (Vaughan 2011). En la actualidad, se ha estimado que en Costa Rica la zona histórica de reproducción de la especie ya se ha reducido en un 90% (Chassot et al. 2004). El remanente actual de su hábitat reproductivo se estima en unas 67 000 ha (Chun 2008).

En especial, la desaparición de los árboles de almendro es de gran preocupación para mantener la supervivencia de la lapa, debido a la dependencia que ésta tiene de dicho árbol. La madera de almendro es altamente valorada debido a su calidad y a los diferentes usos que se le da, por lo que alcanza precios muy altos en los mercados de la región. En Costa Rica, es una de las especies más cotizadas en el mercado de maderas. Esto ha causado que el almendro haya sido fuertemente extraído de los bosques, lo que lo ha puesto en riesgo a lo largo de su distribución (Hanson 2006, Hanson et al. 2008, Schmidt 2009).

El robo de pichones de los nidos para ser comercializados como mascotas es otra amenaza especialmente preocupante en el grupo de los psitácidos. Dicha actividad se reporta como la segunda causa de amenaza para el grupo, solo después de la pérdida de hábitat a causa de la expansión agrícola. Además, se reporta como la amenaza más estrechamente asociada con el decrecimiento de las poblaciones (Berkunsky et al. 2017). Solamente en Costa Rica, se ha estimado que el 18.1% de los hogares poseen algún psitácido como mascota (Drews 2001). En el caso de la lapa verde, el saqueo de los nidos ha sido reportado como presente (Chassot 2009, Monge et al. 2009). De hecho, junto con la pérdida de su hábitat, dicha actividad ha sido mencionada como una de las mayores amenazas para la especie en el país (Gómez-Figueroa 2009).

Esta amenaza se agrava para las especies de loros como la lapa verde. Estas exhiben rasgos que se asocian con un mayor riesgo de extinción: por ejemplo, poseen bajas tasas reproductivas, tamaños de puesta pequeños, una nidada por año, edad tardía para la primera reproducción, alta proporción de adultos no reproductivos, y

requerimientos de anidamiento muy restrictivos. El bajo reclutamiento de juveniles resultante del saqueo de los nidos afectará la habilidad de la especie para reponerse de la reducción en el tamaño poblacional a causa de otras perturbaciones antropogénicas. Además, el elevado precio que tienen en el mercado los individuos de especies raras continuará fomentando el saqueo de los nidos, causando que las poblaciones disminuyan más de lo que lo harían si sólo estuvieran expuestas a la pérdida del hábitat (Wright et al. 2001, Olah et al. 2016).

Al igual que en otras especies de psitácidos, la pérdida de hábitat y el saqueo de los nidos han sido señaladas como causantes de una reducción en el tamaño de las poblaciones de la lapa verde a lo largo de su distribución (Wright et al. 2001, Berg et al. 2007, Gómez-Figueroa 2009, Parr & Juniper 2010, Fraixedas et al. 2014, Eberhard et al. 2015). En el caso de Costa Rica, Holland (1910) reportó que, aunque no abundantemente, la lapa verde se distribuía a lo largo de la totalidad de las tierras bajas del Caribe. Además, Stiles & Skutch (1989) mencionan que históricamente la especie anidaba a lo largo de los bosques de las tierras bajas del Caribe del país. Observaciones entre 1975-1979 también ubican a la especie a lo largo de toda la vertiente atlántica de Costa Rica (Vaughan 2011). Sin embargo, actualmente la distribución natural de la lapa verde en el país se restringe principalmente al Caribe norte, donde se ubica el remanente de su hábitat reproductivo mencionado anteriormente (Chassot et al. 2001, Chassot et al. 2004). En regiones como la zona sur del país, en los alrededores del Refugio Nacional de Vida Silvestre Gandoca-Manzanillo, la especie se reportaba como residente de la región. Sin embargo, actividades humanas iniciadas en la década de los 80, como la tala del almendro, la cacería de los adultos, y el saqueo de los nidos, fueron reportados como los factores más probables que llevaron a su desaparición en el área (Fraixedas et al. 2014).

Dicha disminución en su distribución en el país pudo estar acompañada de una reducción drástica en su tamaño poblacional. En ese sentido, basándose en la disponibilidad de hábitat, Vaughan (2011) estimó para 1977 números poblacionales de hasta 698 individuos en algunas regiones del país. Valores mucho más elevados que los estimados en la actualidad. Esta posible disminución en el tamaño de la población producto de factores antropogénicos pudo traer consecuencias negativas a la integridad genética de la especie y por ende pone en riesgo su supervivencia a largo plazo. Esto debido a que, una reducción en el tamaño poblacional, también conocida como cuello de botella poblacional, puede producir un aumento en la endogamia y una reducción en la

variabilidad genética. Estos a su vez, pueden reducir la habilidad de la población para adaptarse a desafíos ecológicos (Amos & Balmford 2001, Frankham 2005, Willi et al. 2006, Bouzat 2010, Allendorf et al. 2013, Hoffmann et al. 2017). Así mismo, se señala que en poblaciones pequeñas factores genéticos como la depresión endogámica y la deriva genética serán más acentuados que en aquellas de mayor tamaño, lo que puede conducir a la especie hacia un vórtice de extinción (Amos & Balmford 2001, Brook et al. 2002, Fagan & Holmes 2006, Bouzat 2010, Jamieson 2015). Por otro lado, la pérdida y fragmentación de su hábitat puede provocar cambios en la estructura de las poblaciones de una especie, así como el aislamiento de las mismas. Un bajo flujo genético entre las poblaciones contribuye a una mayor endogamia y pérdida de variabilidad genética, elevando el riesgo de extinción (Keller & Waller 2002, Keyghobadi 2007, Frankham et al. 2017).

A pesar de esta inminente amenaza, la gran mayoría de los patrones genéticos son desconocidos en las poblaciones silvestres de la lapa verde. Por lo tanto, existe un vacío enorme de información en una rama que puede aportar a la conservación y manejo de esta especie amenazada. En especial, porque el aporte más importante de la genética a la conservación de las especies, proviene de su habilidad para ayudar a evaluar de mejor manera los patrones y procesos de las especies amenazadas. Específicamente, permite una descripción más precisa y un mejor entendimiento de aquellos procesos que llevaron a una población o especie a su estado actual de amenaza. Esto en particular, a través de la cuantificación de parámetros biológicos clave como: flujo genético, estructura poblacional, diversidad genética, movimientos, entre otros. Dichos parámetros permiten mediciones específicas y comparables de procesos que afectan a poblaciones o especies en riesgo, a la vez que crea un marco de referencia para guiar los esfuerzos de conservación, monitoreo, mitigación y manejo (DeSalle & Amato 2004, Schwartz et al. 2007, Segelbacher 2010, Steiner et al. 2013, Barnes & Turner 2016).

La genética en la conservación de las guacamayas

A la fecha, existen varias investigaciones que han aportado con conocimiento genético valioso a la conservación de diferentes especies de guacamayas, principalmente en Suramérica. Por ejemplo, se han llevado a cabo varios estudios moleculares para examinar la genética del guacamayo jacinto. Esta especie es altamente especializada en lo que se refiere a su dieta y a las especies de árboles en las que anida. Además, es una especie que se encuentra Vulnerable (VU) debido a la disminución de su población por la

pérdida de hábitat y el robo de pichones de los nidos (Faria & Miyaki 2006, Faria et al. 2008, Presti et al. 2015). En dichos estudios, se encontró que la especie presenta una baja variabilidad genética y posee estructura poblacional formada por 4 poblaciones con diferenciación genética. Tales resultados, fueron atribuidos por los autores a las amenazas previamente mencionadas que presenta la especie.

En otro trabajo, se comparó la variabilidad genética de 5 especies de guacamayos, 3 con una alta amenaza: el guacamayo de Spix, *Cyanopsitta spixii*, en Peligro Crítico (CR), el guacamayo de Lear, *Anodorhynchus leari*, en Peligro de Extinción (EN), y el guacamayo jacinto, *A. hyacinthinus*, Vulnerable (VU), y las otras 2 con baja amenaza: la lapa roja, *Ara macao*, y el guacamayo aliverde, *Ara chloropterus*, ambos en Preocupación Menor (LC). Los autores argumentan que las especies amenazadas, usualmente con tamaños poblacionales pequeños, son más vulnerables a la pérdida de variabilidad genética a causa de procesos como deriva genética y endogamia. Así, es de esperar que en especies amenazadas los niveles de variabilidad sean más bajos que en aquellas sin amenaza. Esto fue corroborado con los resultados obtenidos por ellos, donde las 3 especies de guacamayos amenazados mostraron una variabilidad genética más baja que las 2 especies de guacamayos con baja amenaza (Presti et al. 2011). Otra investigación similar, en la que se evaluó la variabilidad genética de 5 especies de la familia Psittacidae (*A. hyacinthinus*, *Amazona brasiliensis*, *Amazona pretrei*, *Ara ararauna* y *A. chloropterus*), los investigadores descubrieron que entre más amenazada se encontraba una especie, menor era su variabilidad genética (Faria & Miyaki 2006).

Por otro lado, en Costa Rica se han analizado los patrones genéticos de *A. macao* (Monge et al. 2016). En concordancia con los estudios previamente mencionados, los autores encontraron que la especie presenta una variabilidad genética moderadamente alta. Ellos adjudican este resultado al relativamente gran tamaño poblacional que goza la especie, así como a su capacidad de dispersión, y a su longevidad. También, los autores encontraron que la especie en el Pacífico de Costa Rica muestra dos poblaciones diferenciadas, las cuales presentan estructuración genética. Ambas poblaciones presentaron variabilidad en el rango moderado-alto, pero la población más sujeta a alteraciones antropogénicas exhibió desviaciones a los equilibrios genéticos esperados. Concluyen que estas disimilitudes se deben a diferencias en el estado de conservación del hábitat de cada una de las poblaciones, y de cómo la población que se encuentra en la zona con un mayor impacto antropogénico presenta una integridad genética menor.

Este hecho demuestra como la alteración y pérdida del hábitat puede influir en la estabilidad genética de la población de una especie de psitácido.

En la Selva Maya, también se analizaron los patrones de variación genética de *A. macao* (Schmidt 2013). Se encontraron altos niveles de variabilidad genética y una buena integridad genética de la población. La autora también atribuye dichos resultados a las características antes mencionadas de la especie, las cuales sirven como amortiguador contra la pérdida de variación genética que puede venir con los impactos provocados por el ser humano.

Otras investigaciones han utilizado la genética de las especies para guiar programas de reintroducción o liberación. Por ejemplo, en un estudio basado en la estructura genética mitocondrial del guacamayo azulamarillo (*A. ararauna*), varios individuos confiscados pudieron ser identificados como candidatos para ser liberados. Se determinó que éstos podían ser liberados en el noroeste de Goiás en Brasil debido a su similitud genética con los individuos de dicha zona (Fernandes & Caparroz 2013). En Costa Rica también se han efectuado análisis genéticos a individuos en cautiverio de programas de reintroducción, tanto *A. macao* (Nader et al. 1999) como de *A. ambiguus* (Herrero 2006). En ambos casos, se han encontrado altos niveles de variabilidad genética entre los individuos tanto los criados en cautiverio, como los decomisados.

Una revisión bibliográfica fue elaborada con el fin de recopilar las investigaciones llevadas a cabo desde el 2004 pertinentes a estimaciones de variabilidad genética, basadas en marcadores de microsatélites en especies de loros (loros, pericos, guacamayas, etc.). En dicha revisión se encontraron 34 artículos, que englobaban a 29 especies. Entre los documentos hallados, 19 incluían el desarrollo de loci microsatélites o pruebas de loci heterólogos, y algunos de ellos también comparaban la variabilidad genética entre especies filogenéticamente relacionadas. Los 15 artículos restantes, se enfocaban a elucidar la estructura genética de la población, verificar la existencia de especies crípticas, correlacionar la estructura genética poblacional con dialectos vocales, probar la eficiencia de muestras de ADN no invasivas, verificar la existencia de cópula extra pareja a través de sistemas de análisis de apareamiento, estimar índices de parentesco para asistir en los programas de cría en cautiverio, y comprobar las consecuencias del manejo de poblaciones naturales. Los autores argumentan, que al haber 374 especies en la familia Psittacidae, el número de publicaciones encontradas resulta muy reducido para el grupo (Presti & Wasko 2014).

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar los niveles de variabilidad y diferenciación genética poblacional de la lapa verde (*Ara ambiguus*) en Costa Rica

Objetivos específicos

1. Examinar los niveles de variabilidad genética y parentesco de los individuos de lapa verde en Costa Rica.
2. Comprobar la ocurrencia de un evento reciente de cuello de botella genético en la lapa verde en Costa Rica.
3. Determinar el grado de diferenciación genética poblacional de la lapa verde en Costa Rica.

ÁREA DE ESTUDIO

La investigación se llevó a cabo en seis localidades principales dentro del área de distribución actual de la lapa verde en Costa Rica (Figura 1): el Refugio Nacional de Vida Silvestre Mixto Maquenque (RNVSM), el Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado (RNVBC), la Estación Biológica El Zota (EBEZ), la Estación Biológica Caño Palma (EBCP), el Parque Nacional Tortuguero (PNT), y el cantón de Guácimo. Esto debido a que la especie realiza largas migraciones a través de su ciclo anual, entre su zona de anidamiento en las llanuras del norte del Caribe costarricense y sus diferentes zonas de post-anidamiento (Chassot et al. 2004). Por lo anterior, fue pertinente seleccionar diferentes áreas para la colecta de muestras que cubran lo mejor posible dicho movimiento anual. De las localidades seleccionadas, una abarcó el área principal de reproducción de la especie (RNVSM) en el país, mientras que las otras cinco (RNVBC, EBEZ, EBCP, PNT y Guácimo) cubrieron el área no reproductiva.

RNVSM

El RNVSM se ubica al norte de las provincias de Alajuela y Heredia ($10^{\circ}41'10''$ N, $84^{\circ}10'50''$ O), abarcando los cantones de San Carlos y Sarapiquí; entre los 50 m y los 100 m sobre el nivel del mar (Zamora & Solano 2006, Arias et al. 2010). Dicho refugio, tiene una extensión de 52 000 ha, en donde predomina el bosque tropical muy húmedo. La temperatura promedio de la región ronda los 27°C , y la precipitación anual oscila entre los 2 300 y 2 800 mm (Monge 2013).

Esta zona, además, alberga un ecosistema único que se caracteriza por una alta densidad de almendro (hasta 4 árboles por ha), el cual como ya se mencionó, es el árbol preferido para la alimentación y anidamiento de la lapa verde (Gómez-Figueroa 2009, Schmidt 2009). Esto hace que el área del RNVSM Maquenque y sus alrededores, sea el hábitat principal de anidamiento de la lapa verde en Costa Rica (Chassot et al. 2004).

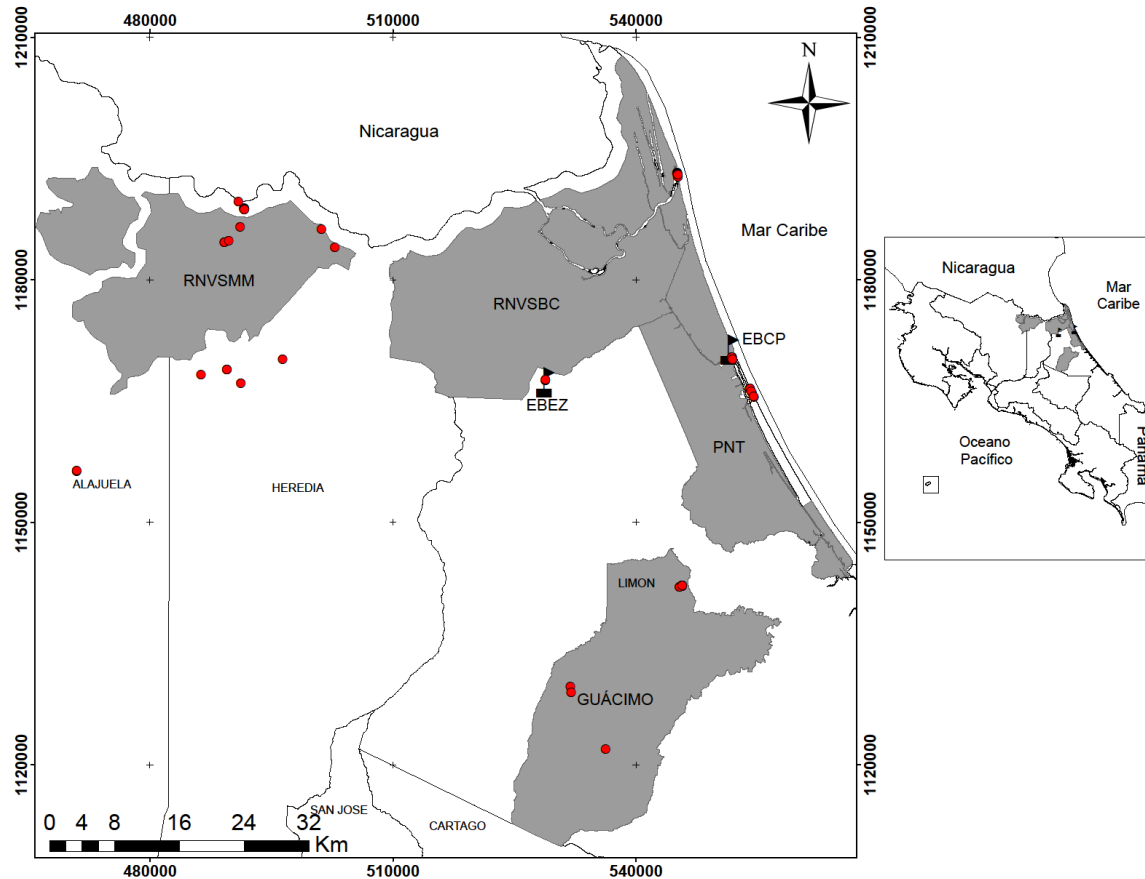


Figura 1. Ubicación de las seis localidades de colecta de muestras de ADN de *Ara ambiguus* en el Caribe norte de Costa Rica, visitadas durante la fase campo entre julio del 2016 y marzo del 2017. Se muestran en gris el Refugio Nacional de Vida Silvestre Mixto Maquenque (RNVSMM), el Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado (RNVSBC), el Parque Nacional Tortuguero (PNT) y el cantón de Guácimo. Señalados con una bandera se muestra la ubicación de la Estación Biológica El Zota (EBEZ) y la Estación Biológica Caño Palma (EBCP). Se muestra mediante puntos rojos los sitios principales de colecta de muestras en cada una de las localidades.

RNVSBC

El RNVSBC se encuentra ubicado al norte de la provincia de Limón, en el Caribe de Costa Rica ($10^{\circ}46'16''$ N, $83^{\circ}35'48''$ O), en el límite de la frontera con Nicaragua. Posee una extensión de 81 177 ha terrestres, compuestos por gran cantidad de canales, lagunas, ríos, islas fluviales, bosques, pantanos, bosques inundados, yolillales y bosques

de pequeñas colinas que no superan los 219 metros sobre el nivel del mar. En el refugio se reconocen dos zonas de vida, bosque muy húmedo tropical y Bosque pluvial premontano transición a basal. Posee una temperatura promedio de aproximadamente 27°C, y una precipitación de 5 124 mm al año (MINAE 2012).

Por otro lado, cabe destacar que el RVSBC está conectado físicamente al norte con la Reserva Indio Maíz (Nicaragua), y al sur con el Parque Nacional Tortuguero (Costa Rica). Esto convierte a Barra del Colorado en un corredor entre estas dos áreas protegidas, las cuales, a su vez, son zonas importantes dentro del área de distribución de la lapa verde en la región.

EBEZ

La EBEZ se ubica en las tierras bajas del noreste de Costa Rica (10°57'6" N, 83°75'9" O), muy cerca del PNT, RNVSBC, y del gran bloque de bosque ubicado al sur de Nicaragua (Lindshield 2006). La estación está conformada por 1 000 ha de una combinación entre bosque intacto y hábitats perturbados y fragmentados. La mayor parte del área corresponde a bosque primario húmedo y pantanoso (700 ha), seguido de plantaciones de árboles nativos y no nativos (270 ha), así como de pastizales originalmente usados para ganadería (30 ha; Lockett et al. 2004). La región cuenta con una precipitación promedio anual de 4 000 mm (Senf 2009). La lapa verde es destacada como una especie notable de la fauna de la estación (Pruetz y LaDuke 2001, Lockett et al. 2004, Senf 2009). Además, se ha reportado al almendro como una especie común dentro de los límites de la misma (Lockett et al. 2004).

EBCP

La EBCP se encuentra al sur del RNVSBC (10°35' N, 83°32' O), a 8 km al norte del pueblo de Tortuguero (Vonhof et al. 2004, Graham et al. 2013). La región exhibe temperaturas medias diarias de 26°C, con una humedad relativa de 70% y 5 000 mm de precipitación anual (Lewis et al. 2010). A pesar de que los límites de la estación comprenden 40 ha, toda la región denominada Caño Palma está conformada por aproximadamente 8 000 ha (Lewis et al. 2010, Bonilla-Murillo et al. 2013). La elevación va desde el nivel del mar hasta alrededor de los 30 m. La zona de vida que se observa en la

región es el Bosque Tropical Húmedo, conformado por bosques estacionalmente inundados que intercalan entre bosque siempre verde y bosque pantanoso de palmas (Vonhof et al. 2004, Graham et al. 2013). Entre las especies de vegetación comunes en la región, se encuentran varias que son utilizadas como alimento por la lapa verde: *Raphia taedigera* (yolillo), *Vochysia ferruginea* (bota rama), *Pentaclethra macroloba* (gavilán); y el ya mencionado *S. trichogyne* (titor; Madriz 2004, Lewis et al. 2010, Bonilla-Murillo et al. 2013). La presencia de estas especies, convierte a esta región en una zona de alimentación importante para la lapa verde.

PNT

El PNT se encuentra ubicado en la costa Caribe noreste de Costa Rica (10°32'28" N, 83°30'08" O), y comprende un total de 76 316 ha (37% terrestre y 63% marina). La zona de vida predominante es el bosque tropical húmedo, y consiste en un complejo sistema ribereño, así como una sierra de baja altitud. Posee elevaciones entre los 0 m y los 311 m sobre el nivel del mar. La temperatura media anual varía desde los 25°C hasta los 30°C, con una precipitación anual de 6 000 mm (Arroyo-Arce & Salom-Pérez 2014, Arroyo-Arce et al. 2014).

El PNT, ha sido reportado como uno de los sitios de mayor avistamiento de lapa verde en Costa Rica (Monge 2013). Esto sumado a las características biofísicas que presenta, y su cercanía con dos de las áreas contempladas en este estudio (RNVSM Maquenque y RVSBC), hacen de este parque una zona importante para el estudio de la especie.

Guácimo

El cantón de Guácimo está ubicado en el Caribe de Costa Rica, en la provincia de Limón (10°12'13" N y 83°37'30" O). Tiene una superficie de 576.48 Km² (57 648 ha; Campos-Rodríguez & Soto-Córdoba 2014). Tiene una altitud media de 79.5 msnm, donde la zona de vida predominante es el bosque húmedo premontano. Posee una precipitación anual de 3464 mm y una temperatura media anual de aproximadamente 25.1°C (Fonseca et al. 2008, Ramírez-Alán et al. 2011). Por otro lado, en la finca de cacao orgánico FINMAC en la zona de Pueblo Nuevo de Guácimo, pobladores locales han observado a la lapa verde alimentarse del árbol de titor (Arias & Campregher 2010).

METODOLOGÍA

Colecta de muestras

La fase de colecta de muestras abarcó del 5 de julio del 2016 al 25 de marzo del 2017. Las seis localidades de muestreo fueron visitadas de la siguiente manera: el PNT del 5 al 11 de julio de 2016, el cantón de Guácimo del 18 al 24 de julio de 2016, las instalaciones del SINAC en el RNVSBBC del 21 al 26 de agosto de 2016, la EBCP del 11 al 19 de octubre de 2016, la EBEZ del 1 al 3 de diciembre de 2016; y, por último, el RNVSMC en tres ocasiones, el 21 de febrero de 2017, del 8 al 10 de marzo de 2017 y del 18 al 25 de marzo de 2017.

En cada una de las localidades, se identificaron los sitios donde existiera presencia frecuente de lapas verdes, ya fuera por alimentación, descanso o anidamiento. En dichos sitios, se colectaron de manera no invasiva muestras de plumas y de heces. Las plumas fueron colectadas directamente del suelo en cada uno de los sitios. Para asegurar que el ADN fuera de calidad, solo se colectaron aquellas plumas que tuvieran el cálamo en buen estado. Para la colecta de las muestras de heces, se utilizaron mantas de plástico que cubrieran el suelo debajo de los sitios donde las aves se encontraban. Esto, para facilitar su colecta y evitar la contaminación del ADN. Además, se colectaron las heces que cayeran sobre hojas o en alguna superficie que evitara su contaminación. Debido a que las condiciones ambientales pueden acelerar la degradación del ADN en las heces (Regnaut et al. 2006), todas las heces fueron colectadas inmediatamente después de ser excretadas por las aves.

Para mantenerlas protegidas de la humedad, las plumas fueron guardadas en sobres de manila o bolsas con cierre hermético. Las muestras de heces, se depositaron en papel filtro y se guardaron en viales con gel de sílice que fueron mantenidos en refrigeración. Una vez en el laboratorio, todas las muestras se almacenaron en un congelador a -80°C.

Adicionalmente, se incorporaron muestras colectadas por Ulises Alemán del Centro Científico Tropical (CCT) en el RNVSMC, Jaime Restrepo del Sea Turtle Conservancy (STC) en el PNT, voluntarios y administradores de la EBCP y Elsie Chávez de Guácimo. Estas fueron agregadas al tamaño de muestra de cada localidad. Por último, se incluyeron muestras colectadas por el CCT en el 2010 pertenecientes al RNVSMC.

Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras tomadas en el campo (plumas y heces), se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética de la Conservación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. Para las plumas, el ADN se extrajo de tres partes del cálamo: la punta o base del cálamo, el ombligo superior que contiene un coágulo de sangre (Horváth et al. 2005), y el tejido mesenquimal dentro del cálamo; aunque este último no se encuentra presente en todas las plumas. Las tres partes fueron cortadas en trozos lo más pequeños posible y su ADN se extrajo mediante el Kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen®. Se siguieron las modificaciones para plumas de muda hechas por Gebhardt et al. (2009). En el caso de las heces, se utilizó una cantidad aproximada de 200 mg de la muestra que fue cortada en trozos lo más finamente posible para facilitar el proceso de extracción. Se utilizó el Kit de extracción QIAamp® DNA Stool Mini Kit, siguiendo el protocolo con modificaciones de Chaves et al. (2010). Todas las extracciones de ADN fueron preservadas a -20°C. Además, la calidad y la concentración del ADN extraído de cada muestra se verificó a través de un espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

Aplicación de marcadores moleculares y perfiles de PCR

Al no existir estudios de genética poblacional previos en la lapa verde, no fue posible conocer de antemano la aplicabilidad de los marcadores moleculares desarrollados para otros psitácidos sobre dicha especie. Sin embargo, al ser una característica de los microsatélites la amplificación heteróloga (Lobo & Morales 2014), no se consideró un obstáculo amplificar por primera vez para la especie la mayoría de los microsatélites utilizados. Se probaron 10 marcadores originalmente diseñados para *Amazona guildingii* (AgGT19, AgGT42, AgGT90, AgGT17, AgGT21; Russello et al. 2001, 2005) y *Ara ararauna* (UnaCT74, UnaCT21, UnaCT32, UnaCT41, UnaCT43; Caparroz et al. 2003), y que fueron modificados por Gebhardt & Waits (2008) para amplificar fragmentos cortos de ADN (<250bp) y trabajar en PCR Multiplex de mejor manera. Esto, con la intención de aumentar su éxito de amplificación al usar muestras de ADN de fuentes no invasivas. Los marcadores fueron divididos en tres grupos Multiplex para ser corridos en el PCR. El Multiplex A contenía los marcadores UnaCT21, UnaCT43, UnaCT74 y UnaCT32. El Multiplex B contenía los marcadores UnaCT41, AgGT17, AgGT21 y AgGT90. Por último, el Multiplex C contenía los marcadores AgGT19 y AgGT42.

Se empleó el Kit Multiplex PCR de Qiagen® para las reacciones de PCR. Los volúmenes utilizados fueron: 0.625 µl de cada par de marcadores, 3.125 µl de Master Mix con solución Q, y 1.25 µl de agua libre de nucleasas. A este volumen se le añadieron 3 µl de ADN extraído (~20 ng/µl), para un volumen final de 8 µl. Las concentraciones finales de cada marcador en los tubos PCR fueron: UnaCT21 (0.576 µM), UnaCT43 (0.432 µM), UnaCT74 (0.72 µM), UnaCT32 (0.5 µM), UnaCT41 (0.864 µM), AgGT17 (0.432 µM), AgGT21 (0.432 µM), AgGT90 (0.8 µM), AgGT19 (0.432 µM) y AgGT42 (0.8 µM).

Se tomó como base el protocolo de Gebhardt & Waits (2008) para realizar las reacciones de cada Multiplex *touchdown*, las cuales se detallan a continuación: Para el Multiplex A, una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min seguido de un ciclo *touchdown* de 14 repeticiones con una desnaturalización a 95°C por 30 seg, anillamiento a 60°C por 30 seg (con disminución de 0.5°C por ciclo) y extensión a 72°C por 1 min; seguidamente un ciclo de 26 repeticiones con las mismas condiciones, pero con una temperatura de anillamiento fija de 53°C; y por último, una extensión final a 72°C por 3 min. Para el Multiplex B y C, una desnaturalización inicial de 94°C por 15 min seguido de un ciclo *touchdown* de seis repeticiones con desnaturalización a 94°C por 30 seg, anillamiento a 60°C por 1 min (con disminución de 0.5°C por ciclo) y extensión a 72°C por 1 min; posteriormente un ciclo de 28 repeticiones con las mismas condiciones anteriores, pero con una temperatura de anillamiento fija a 57°C; por último, una extensión final a 60°C por 15 min. El genotipado de los fragmentos de ADN se realizó en un Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems). Posteriormente, los alelos fueron analizados en el programa GENEMARKER v2.4.2 (Soft Genetics LLC, State College, PA). Todas las muestras fueron corridas mediante PCR un mínimo de dos veces para todos los marcadores, y así obtener un genotipo consenso. Aquellos marcadores que no pudieron ser confirmados en las muestras, fueron corridos nuevamente hasta un máximo de cuatro veces.

El presente proyecto se encontró debidamente inscrito y aprobado para su ejecución por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, con el código 111-B7-198. Además, se obtuvieron los permisos para el acceso a los elementos y recursos genéticos necesarios para la realización de este proyecto a través de la Comisión Institucional de Biodiversidad de la Universidad de Costa Rica (VI-388-2017).

Análisis genético

Antes de iniciar cualquier análisis, se detectaron los genotipos idénticos a través del programa GIMLET v. 1.3.3 (Valière 2002), los cuales fueron excluidos de los posteriores análisis. Se analizó el porcentaje de datos de alelos faltantes tanto por locus como por sitio de muestreo a través de la función *info_table* del paquete de R *Poppr* (Kamvar et al. 2014b). Se elaboró una curva de acumulación de genotipos para el total de las muestras. Esto con el fin de determinar si la cantidad de marcadores utilizados en el estudio fue suficiente para diferenciar entre genotipos distintos. Para ello, se usó la función *genotype_curve* presente en el paquete de R *Poppr* (Kamvar et al. 2014b). Dicha función, muestrea de manera aleatoria y sin reemplazo un número determinado de loci y cuenta la cantidad de genotipos multilocus observados hasta n-1 marcadores (Kamvar et al. 2015). Se estableció un número de remuestreos de 1 000.

Para complementar la curva de acumulación de genotipos, se estimó la probabilidad de identidad (P_{ID}). Dicho estimado permite determinar el número de marcadores necesarios para identificar individuos al estimar la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar posean el mismo genotipo. Se estableció que valores de P_{ID} de 0.001–0.0001 son suficientemente bajos para obtener una estimación adecuada (Waits et al. 2001). Se comparó el resultado de ambos análisis, con el fin de evaluar de mejor manera la exactitud de los marcadores utilizados. El P_{ID} fue calculado en el programa GENALEX v6.502 (Peakall & Smouse 2012).

Se buscó por la presencia de errores de genotipado (alelos fantasmas, alelos nulos y alelos ausentes) en los marcadores microsatélite utilizados, por medio del programa MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Se estableció en el programa un intervalo de confianza al 95% y 1 000 aleatorizaciones. También, se buscó por desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), déficit y exceso de heterocigotos, así como desequilibrio de ligamiento; para lo cual se utilizó el programa GENEPOP v4.7 (Rousset 2008). Los parámetros para cada uno de los análisis se establecieron en 10 000 desmemorizaciones, 20 *batches* y 5 000 iteraciones por *batch*. Se implementó la prueba completa de enumeración para aquellos loci con menos de cinco alelos. Se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni a los valores de p de las pruebas efectuadas. Esta corrección es empleada para ajustar los valores de probabilidad (p) cuando se hacen múltiples análisis simultáneos de un mismo set de datos; con el fin de disminuir la probabilidad de detectar falsos positivos (error tipo I; Oliveira et al. 2008, Armstrong 2014).

Para complementar el análisis de desequilibrio de ligamiento, se ejecutó un análisis de desequilibrio de ligamiento multilocus. En este, se evalúa si el desequilibrio de ligamiento que se llegara a encontrar para uno o más pares de loci se refleja significativamente a nivel de todos los genotipos y loci considerados. Para ello, se aplicó el índice de asociación (I_A ; Brown et al. 1980) a través de la estandarización (\bar{r}_d) propuesta por Agapow y Burt (2001). Dicha estandarización le permite al índice ser independiente de la cantidad de loci usados; va de 0 si los alelos se están recombinando en la población (sin desequilibrio de ligamiento) a 1 (sin recombinación; Morgan et al. 2007, Karchani-Balma et al. 2008). El análisis fue realizado con la función *ia* del paquete de R *Poppr* (Kamvar et al. 2014b), estableciendo 999 permutaciones.

Indicadores de variabilidad genética y parentesco

Para el cálculo de frecuencias alélicas, riqueza alélica, cantidad de alelos privados, y heterocigosidad observada (H_o) y esperada no sesgada (UH_E), en cada locus microsatélite, se utilizó el software GENALEX v6.502 (Peakall & Smouse 2012). Se seleccionó la UH_E en lugar de la heterocigosidad convencional ya que presenta mayor exactitud y precisión en tamaños de muestra pequeños (Pruett & Winker 2008). Con el fin de determinar el grado de parentesco entre los individuos, se realizó un análisis para calcular la relación entre todos los pares de individuos. Para esto, se utilizó el estimador de probabilidad triádico (TrioML; Wang 2007) del programa COANCESTRY. Los emparejamientos entre los individuos se asignaron a cuatro categorías según el resultado del estimado de relación, de la siguiente manera: 0 = No Relacionados, 0.125 = Primos, 0.25 = Medios Hermanos, 0.5 = Hermanos/Padre-Hijo. Para complementar el análisis de parentesco, se determinó la endogamia dentro de la población o poblaciones de lapa verde a través del coeficiente de endogamia (F_{is}); con el método de Weir & Cockerham (1984). El F_{is} fue calculado con el programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 2001). Valores positivos de este coeficiente representan exceso de homocigotos mientras que valores negativos un déficit de estos. Además, se calcularon los coeficientes de endogamia F -Ritland (Ritland 1996) y F -LynchRd (Lynch & Ritland 1999) a través del programa COANCESTRY v1.0.1.5 (Wang 2011). Se establecieron en 1000 las réplicas para el Bootstrap, con intervalos de confianza al 95%.

Diferenciación genética poblacional

Para determinar el grado de diferenciación genética poblacional, primero, se procedió a estimar el índice F_{st} para cada uno de los sitios de muestreo. El F_{st} comprende un valor entre 0 (cuando la población tiene las mismas frecuencias alélicas) y 1 (cuando en la población se fijan alelos diferentes), y es una medida de diferenciación genética entre poblaciones (Wright 1951). Dicho índice se calculó con el programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 2001). Además, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992) para determinar la partición de la varianza de la variabilidad genética basado en la estimación pareada del F_{st} (Weir & Cockerham 1984) a tres niveles: dentro de los individuos, entre individuos, y entre poblaciones. El AMOVA fue calculado en GENALEX v6.502 (Peakall & Smouse 2012) con 9999 permutaciones.

Para complementar el análisis de diferenciación genética poblacional, se evaluó la estructura poblacional del set de datos al estimar el número más probable de grupos genéticos (K) mediante el algoritmo Bayesiano descrito por Pritchard et al. (2000). Este se encuentra implementado en el programa STRUCTURE v2.3.4 (Falush et al. 2003). Los parámetros del programa fueron establecidos adaptando los utilizados en otros estudios de guacamayas (Monge et al. 2016, Rivera-Ortíz et al. 2017). Se empleó el modelo de mezcla con las frecuencias alélicas correlacionadas sin información previa de localidad, una duración del periodo de quema de 500 000 y un número de repeticiones Cadenas Markovianas de Monte Carlo (MCMC) de 1 000 000. Se estableció un rango de K de 1 a 10 para la inferencia de K , con un total de 10 iteraciones por cada K . La información de los coeficientes de membresía individuales (Q), fue utilizada para implementar y visualizar la tasa de cambio de la función de máxima verosimilitud con respecto a K (ΔK ; Evanno et al. 2005), la verosimilitud promedio de K ($\ln \Pr(X|K)$; Pritchard et al. 2000), y el gráfico de barras correspondiente a cada valor de K estimado, por medio del programa en línea STRUCTURE HARVESTER (Earl & VonHoldt 2012). Las tres aproximaciones anteriormente mencionadas, fueron usadas en conjunto para determinar el valor más probable de K en el set de datos. El análisis de STRUCTURE se efectuó tanto separando las muestras por sitio de colecta como agrupándolas en un solo conjunto.

Análisis de cuello de botella genético

Con el fin de determinar si existió una reducción en el número de individuos de la especie en Costa Rica que causara un evento reciente de cuello de botella genético, se utilizó el programa BOTTLENECK v1.2.02 (Piry et al. 1999). Dicho programa computa la distribución de la heterocigosidad esperada según el número de alelos para cada muestra de la población (o poblaciones) y para cada locus, bajo el supuesto de equilibrio mutación-deriva. Un exceso significativo de la heterocigosidad es indicador de un cuello de botella genético reciente. Se utilizó el modelo mutacional de dos fases (TPM), ya que se considera el más apropiado para su uso con microsatélites (Di Rienzo et al. 1994). Los parámetros del modelo se establecieron en 10 000 iteraciones, con una varianza de 12 y una probabilidad de 90%. Los resultados de la prueba se evaluaron con la prueba de Wilcoxon, debido a que en general presenta más robustez estadística incluso en presencia de pocos marcadores (<20 y mínimo cuatro; Ağaoğlu & Ertuğrul 2012).

Para complementar el análisis de cuello de botella, se corrió la prueba de cambio de moda en la distribución de las frecuencias alélicas. La prueba examina las frecuencias alélicas en la población y las compara con aquellas esperadas en equilibrio mutación-deriva. Se espera que en las poblaciones en equilibrio los alelos raros sean más frecuentes, y que la distribución de las frecuencias alélicas muestre una forma de “L” característica (Cristescu et al. 2010). Dicho análisis también fue llevado a cabo a través del programa BOTTLENECK v1.2.02.

También, para detectar un evento reciente de cuello de botella genético, se calculó el *M*-Ratio. Este mide el número de estados alélicos potenciales sin ocupar, o el tamaño promedio de los vacíos entre el alelo de mayor tamaño y el de menor tamaño presentes en la muestra. Se espera que, seguido de una reducción en el tamaño poblacional, la deriva genética tenderá a producir mayor cantidad de vacíos, haciendo que el valor de *M* disminuya (Garza & Williamson 2001). El valor promedio del *M*-Ratio obtenido se comparó con los valores críticos propuestos por Garza & Williamson (2001). Valores por encima de 0.82 corresponderían a poblaciones que no han sufrido una reducción en tamaño, mientras que aquellos por debajo de 0.68 corresponden a poblaciones que han sufrido un cuello de botella genético. Para el cálculo del *M*-Ratio se utilizó la función *mRatio* del paquete de R *strataG* (Archer et al. 2017).

RESULTADOS

Calidad del set de datos y de los marcadores microsatélites

Se colectaron 147 muestras de plumas y heces en las seis localidades de muestreo (Cuadro 1). Se logró extraer ADN de todas ellas (Promedio = 32.992 ng/ μ l, DE = 52.536). Sin embargo, no todas las muestras tuvieron una amplificación adecuada de los marcadores empleados.

De los 10 marcadores probados, tres tuvieron que ser descartados. Dos de ellos (AgGT90 y AgGT42) debido a que mostraron poco éxito de amplificación, mientras que un tercero (UnaCT41) resultó ser monomórfico para la especie. Por lo tanto, para los correspondientes análisis se trabajó con un total de siete marcadores.

Se seleccionaron *a priori* aquellas muestras en las que amplificaron como mínimo cinco de los siete marcadores utilizados. Se conformó un set de datos con las 101 muestras que poseían dicho mínimo de loci confirmados. De estas, se eliminaron las muestras cuyo genotipo coincidía en un 100% (7/7 marcadores) con otras muestras dentro del set de datos (individuos repetidos). Para los genotipos con coincidencia del 86% (6/7 marcadores), incluidos aquellos con algún marcador faltante, se procedió a revisar los electroferogramas nuevamente con el fin de descartar que provinieran del mismo individuo.

Al final, 20 muestras fueron eliminadas del set de datos. Por lo tanto, se utilizaron 81 muestras para los diferentes análisis de genética poblacional, provenientes de las seis localidades de colecta (Cuadro 1). De estas, seis carecían de amplificación para un marcador y solo dos poseían datos ausentes en dos de sus siete marcadores.

Cuadro 1. Número de muestras de plumas y heces de *Ara ambiguus* colectadas en cada una de las seis localidades de muestreo en el Caribe norte de Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017. Entre paréntesis se indica el número de muestras de plumas y heces que fueron incluidas en el estudio según su sitio de colecta.

Localidad	Plumas	Heces	Total
RNVSM	40 (21)	12 (10)	52 (31)
RNVSB	7 (2)	7 (3)	14 (5)
EBEZ	0 (0)	10 (5)	10 (5)
EBCP	25 (13)	8 (4)	33 (17)
PNT	9 (4)	5 (4)	14 (8)
Guácimo	8 (5)	16 (10)	24 (15)
Total	89 (45)	58 (36)	147 (81)

En general, el conjunto de muestras poseía un bajo porcentaje de datos faltantes, solo 1.76% (Figura 2). El porcentaje por marcador no superó el 5%, siendo el más alto AgGT19 con 4.94%. Por sitio el porcentaje también resultó ser bajo. Solamente el sitio EBEZ presentó un porcentaje bastante más alto que los demás (8.57%), debido a la presencia de alelos faltantes en dos de sus cinco muestras.

Al observar que la curva de acumulación de genotipos alcanzó la asíntota, fue posible determinar que la cantidad mínima de microsatélites necesarios para diferenciar el 100% de los genotipos multilocus únicos fue de seis (Figura 3). El estimado de P_D también estableció en seis el número mínimo de marcadores para distinguir entre individuos de manera confiable ($P_D = 0.0003$). Esto indica que los siete marcadores utilizados son más que suficientes para diferenciar entre individuos distintos en la mayoría del conjunto de datos. Solamente las dos muestras con cinco marcadores amplificados no cumplieron con este requisito. Sin embargo, no fue necesario excluirlas ya que al revisarlas detenidamente se pudo confirmar que no pertenecían a genotipos ya presentes en el set de datos.

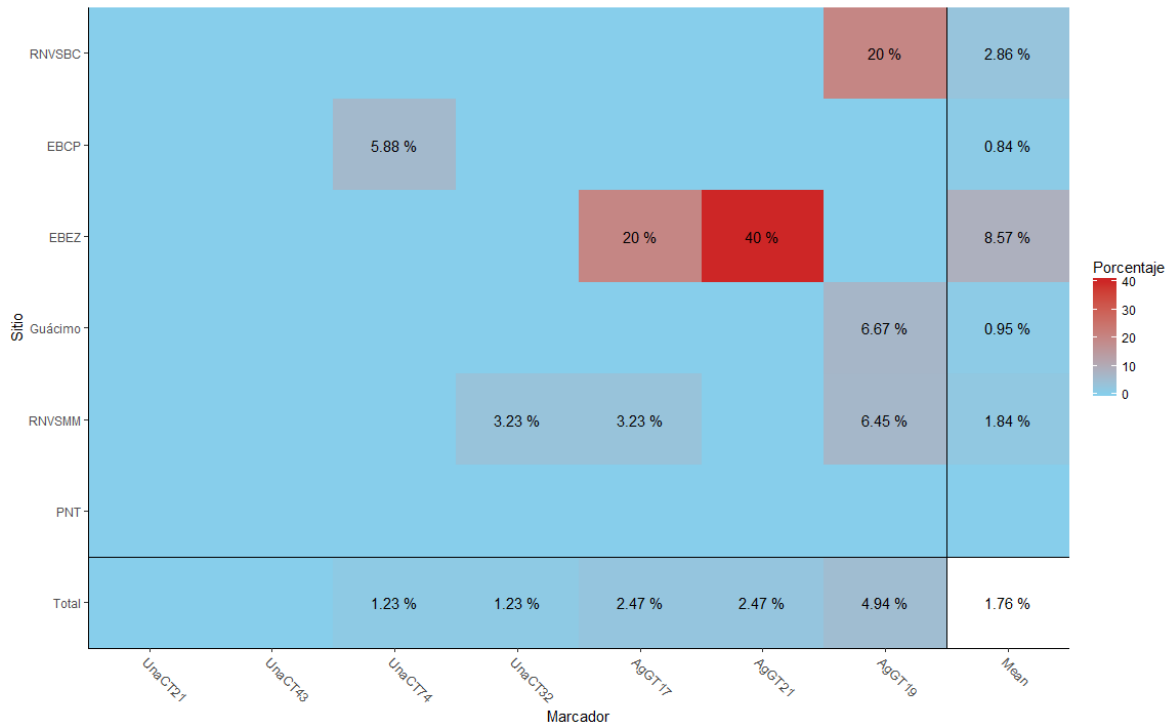


Figura 2. Porcentaje de datos faltantes por marcador y por sitio de colecta de las 81 muestras de *Ara ambiguus* de Costa Rica.

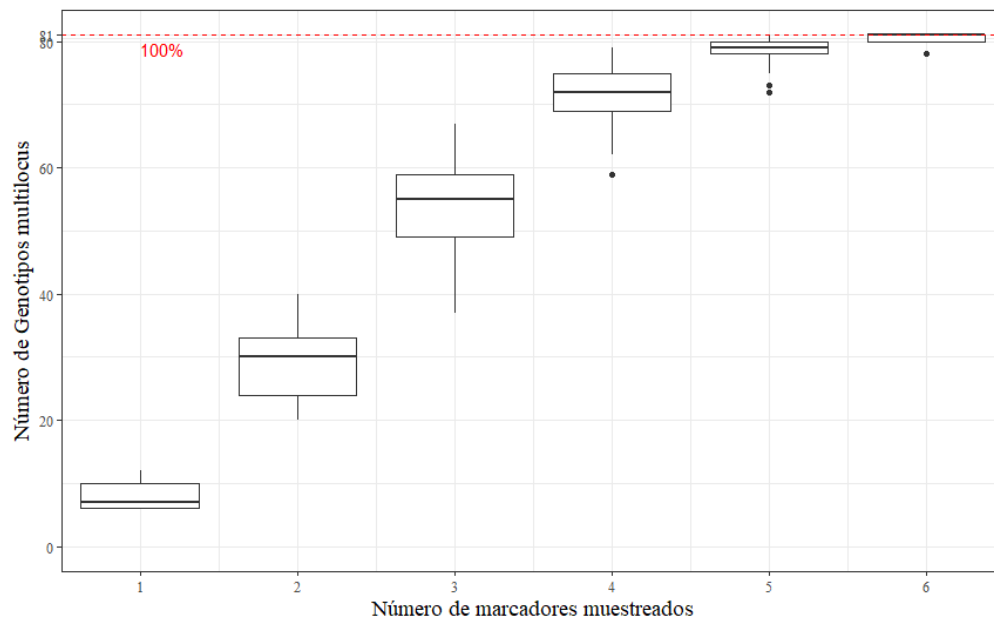


Figura 3. Curva de acumulación de genotipos para las 81 muestras de *Ara ambiguus* de Costa Rica genotipadas para siete marcadores. El número de marcadores fue muestreado aleatoriamente (1 000 veces) sin reemplazo hasta alcanzar $n-1$ marcadores. La línea roja punteada representa el 100% de los genotipos multilocus observados.

Entre los errores de genotipeo en el conjunto de datos, solo se detectó la posible presencia de alelos nulos en dos de los marcadores (UnaCT21 y AgGT17). Lo anterior, es sugerido por un exceso de homocigotos observado para la mayoría de las clases de tamaños de alelos en dichos loci. En respuesta a esto, los análisis se corrieron con y sin dichos marcadores con el fin de asegurarse de que éstos no estuvieran afectando los resultados obtenidos. No hubo diferencias en las conclusiones a las que se llegaron con los resultados en ambos casos.

Ninguno de los marcadores mostró una desviación significativa del EHW, tampoco exceso ni déficit de heterocigotos. Sin embargo, fue posible observar desequilibrio de ligamiento entre el par de marcadores CT43 y CT74 ($P = 0.012$, $\alpha = 0.05$). A pesar de esto, el estimado de desequilibrio de ligamiento multilocus fue muy bajo ($\bar{r}_d = 0.011$) y estadísticamente no significativo ($P = 0.204$, $\alpha = 0.05$). Lo anterior sugiere que, aunque se haya encontrado asociación no aleatoria entre un par de loci, no es significativo a nivel de todos los loci considerados; donde según el resultado, sí se observa recombinación entre ellos. Nuevamente, los análisis fueron corridos omitiendo alguno de los dos loci sin cambios importantes en los resultados.

Variabilidad genética y parentesco

La heterocigosidad observada a través de los 7 marcadores varió de 0.383 a 0.696, con una media de 0.54 (EE = 0.045) para la población (Cuadro 2). Por su parte, la heterocigosidad esperada varió de 0.488 a 0.699, donde el promedio fue de 0.587 (EE = 0.030). El número de alelos observado fue bajo y bastante similar entre los marcadores, con una media de 4 (Cuadro 2). Por otro lado, el análisis de parentesco determinó que Sin Relación fue la relación más probable de la mayoría (87.061%) de los emparejamientos entre los individuos del conjunto de datos. Las otras tres categorías, que indicaban algún nivel de parentesco entre los individuos, solo representaron un 12.938% (Cuadro 3). Además, el valor del estimado de endogamia fue bastante cercano a cero ($F_{is} = 0.058$, EE = 0.040; Cuadro 2) y no estadísticamente significativo al no diferir estadísticamente de cero (IC 95%: -0.008 – 0.138). Los coeficientes de endogamia de COANCESTRY siguieron esta misma tendencia. Tanto el F -LynchRd ($F = 0.031$, $V = 0.058$) como el F -Ritland ($F = 0.050$, $V = 0.096$) fueron cercanos a cero y no estadísticamente significativos (F -LynchRd = IC 95%: -0.346 – 0.544, F -Ritland = IC 95%: -0.254 – 0.420).

Cuadro 2. Resultados de variabilidad genética de las 81 muestras de *Ara ambiguus* colectadas entre julio del 2016 y marzo del 2017 en Costa Rica y amplificadas para los siete marcadores microsatélite. Se reporta el número de muestras amplificadas por marcador (n), número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_o), esperada no sesgada (U_{H_E}) y el coeficiente de endogamia (F_{is}).

Marcador	n	N_A	H_o	U_{H_E}	F_{is}
UnaCT21	81	3	0.383	0.488	0.206
UnaCT43	81	4	0.593	0.578	-0.006
UnaCT74	80	4	0.575	0.538	-0.075
UnaCT32	80	4	0.513	0.558	0.094
AgGT17	79	3	0.418	0.542	0.220
AgGT21	79	4	0.696	0.679	-0.007
AgGT19	77	6	0.662	0.699	0.025
Promedio		4	0.548	0.587	0.058
Error estándar		0.378	0.045	0.030	0.040

Cuadro 3. Porcentaje de parentesco entre los 81 individuos de *Ara ambiguus* muestreados en Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017, calculado por medio del estimador TrioML de Wang (2007).

Categoría	Porcentaje de Relación (%)
Sin Relación	87.061
Primos	1.059
Medios Hermanos	1.394
Hermanos/Padre-Hijo	10.485

Diferenciación genética poblacional

El resultado del índice F_{st} arrojó un valor general de diferenciación genética poblacional muy bajo ($F_{st} = 0.009$, $EE = 0.005$) y no estadísticamente significativo (IC 95%: 0.000 – 0.018). La AMOVA, por su parte, fue concordante con los pocos indicios de diferenciación poblacional encontrados con el análisis anterior. En esta, se pudo observar que solo el 1% de la variación genética ocurrió entre los sitios, con 9% entre individuos dentro de un mismo sitio. La mayoría de la variación genética (90%) ocurrió dentro de los individuos.

Además, con el análisis de agrupamiento bayesiano fue posible establecer en $K = 1$ el número de agrupamientos genéticos (poblaciones) más probable para las lapas verdes de Costa Rica. Si bien el ΔK fue mayor para $K = 2$ (4.733; Figura 4), el valor promedio de verosimilitud apoyó a $K = 1$ como la división poblacional más probable (-1217.240). A esto se le suma que en los gráficos de barras no hubo indicio de división genética en ninguno de los 10 agrupamientos evaluados. En ellos, todos los individuos fueron asignados a cada agrupamiento con la misma probabilidad (e.g., $K = 2$, Figura 5). Tampoco fue posible encontrar alelos privados dentro del set de datos. Por lo tanto, se concluye que realmente no existe estructura genética poblacional.

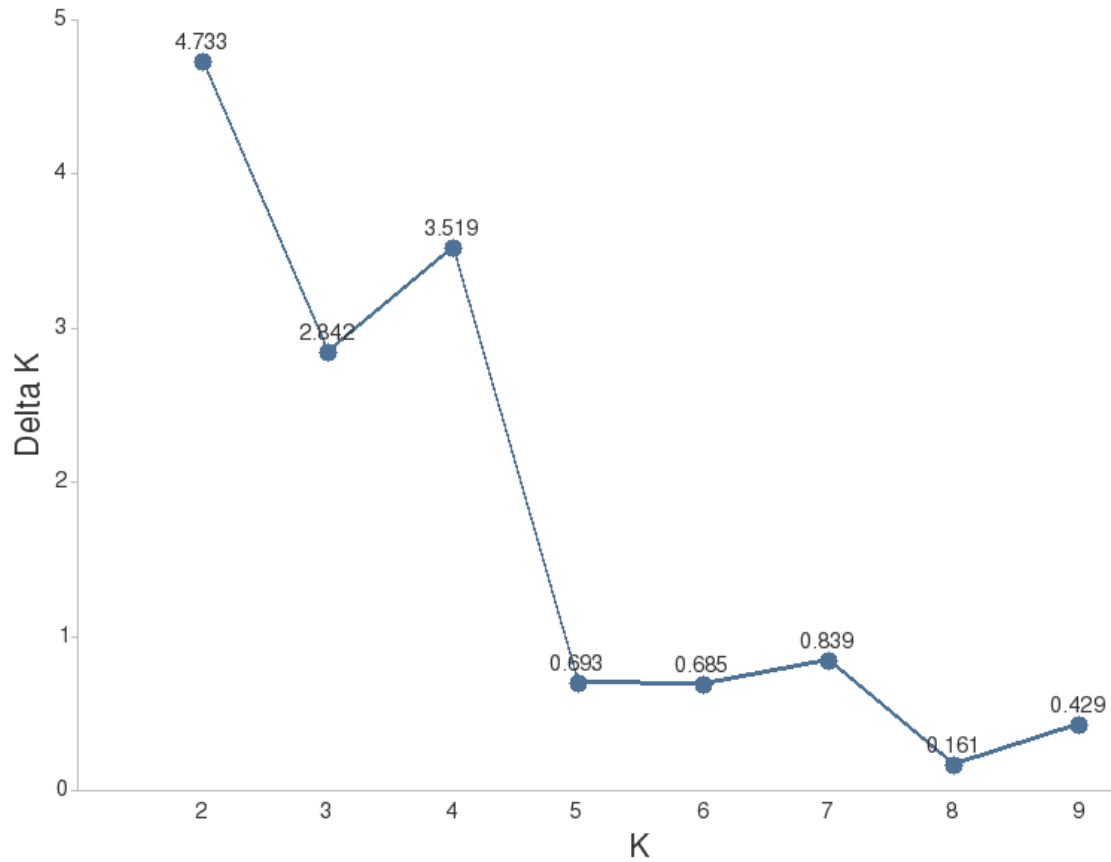


Figura 4. Inferencia del número de agrupamientos genéticos detectados por STRUCTURE para las 81 muestras de *Ara ambiguus* colectadas en Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017. Se muestra la variación de ΔK para $K = 2$ a $K = 9$ según Evanno et al. (2005). Los valores sobre los puntos corresponden al valor exacto de ΔK obtenido para cada K .

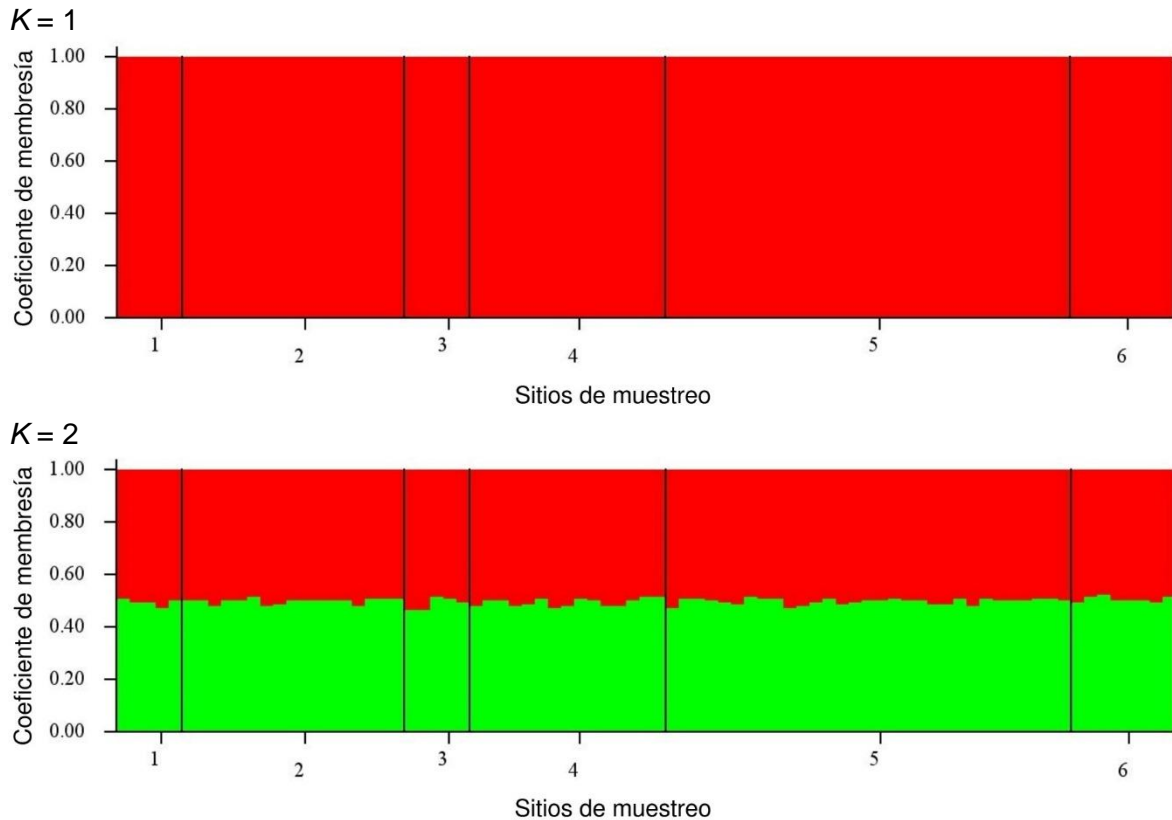


Figura 5. Gráfico de barras de los coeficientes de membresía (Q) estimados por STRUCTURE para cada una de las 81 muestras de *Ara ambiguus* cuando $K = 1$ y $K = 2$. Los individuos se dividieron en los seis sitios de muestreo. Cada color representa una población genética hipotética distinta según Evanno et al. (2005).

Análisis de cuello de botella genético

En el análisis de cuello de botella genético, la prueba de TPM evidenció un exceso de heterocigosidad significativo ($P = 0.007$, $\alpha = 0.05$) con respecto al equilibrio mutación-deriva. Esto se considera como indicativo de que la población ha sufrido un evento reciente de cuello de botella genético. La mayoría de los marcadores mostró dicho exceso (Cuadro 4). Solo el marcador UnaCT74 se mostró ligeramente por debajo de su heterocigosidad esperada bajo el equilibrio mutación-deriva. Sin embargo, se destaca que en la prueba de distribución de las frecuencias alélicas no se detectó indicio de cuello de botella genético, ya que la distribución presentó una forma de “L” característica de una población en equilibrio mutación-deriva (Figura 6). Por último, el valor promedio del M -Ratio observado fue de 0.612 (DE = 0.269). Dicho resultado apoyaría la existencia de un evento reciente cuello de botella genético al situarse por debajo del umbral crítico de 0.68.

Cuadro 4. Resultados del análisis de cuello de botella bajo el modelo mutacional de dos fases (TPM) para los siete marcadores microsatélite utilizados en las 81 muestras de *Ara ambiguus* colectadas en Costa Rica entre julio del 2016 y marzo del 2017. Se reporta la heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva (H_{eq}), y desviación estándar (DE). Se reporta también la significancia de la prueba de Wilcoxon ($\alpha = 0.05$) para el exceso (P_E) y déficit (P_D) de heterocigosidad.

Locus	H_e	H_{eq}	DE
UnaCT21	0.491	0.413	0.157
UnaCT43	0.581	0.540	0.129
UnaCT74	0.541	0.542	0.128
UnaCT32	0.562	0.538	0.129
AgGT17	0.545	0.414	0.158
AgGT21	0.683	0.538	0.130
AgGT19	0.703	0.686	0.087
$P_E = 0.007$			
$P_D = 0.996$			

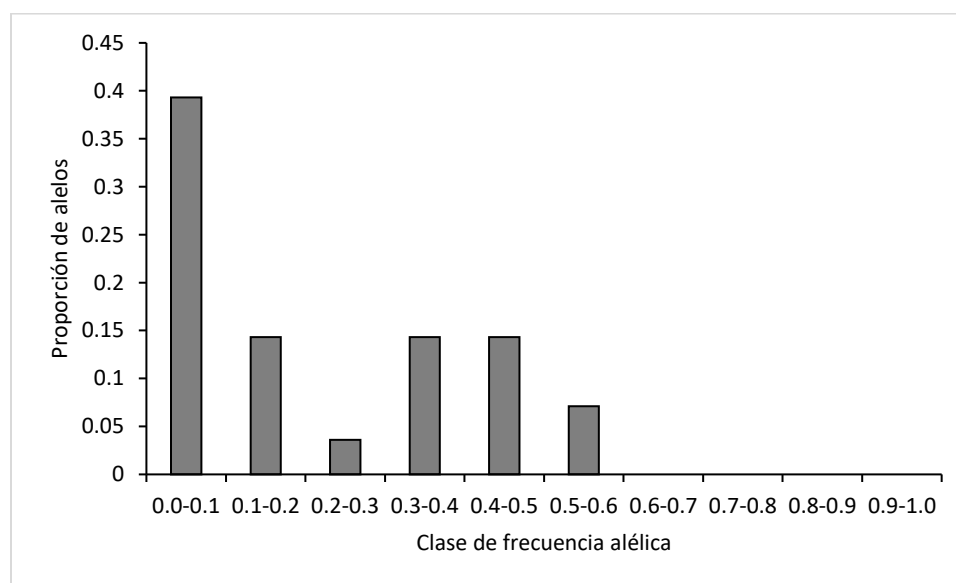


Figura 6. Gráfico de distribución de las frecuencias alélicas de la prueba de cambio de moda. Se muestra la proporción de alelos para cada clase de frecuencia alélica de los siete marcadores microsatélite utilizados.

DISCUSIÓN

Calidad del set de datos y de los marcadores microsatélite

Debido a que no existen investigaciones previas sobre la genética de las poblaciones silvestres de la lapa verde, aún no existen marcadores diseñados para esta especie. Tampoco se contó con mucho precedente del éxito de amplificación cruzada de marcadores diseñados para otras especies. Lo anterior es algo común en los psitácidos, donde a pesar de la gran cantidad de especies, el número de investigaciones con marcadores microsatélite es bajo (Presti & Wasko 2014). El único antecedente que se tuvo del uso de microsatélites en la lapa verde, fue el estudio de tesis de Herrero (2006) en individuos en cautiverio. En el cual se utilizaron con éxito cuatro marcadores, tres de los cuales (UnaCT43, UnaCT21, UnaCT74) fueron usados en este trabajo.

En esta investigación se usaron marcadores heterólogos, debido al costo económico y de tiempo que puede conllevar el diseño de marcadores para una especie (Caparroz et al. 2007, White et al. 2009). De los marcadores que tuvieron que ser descartados, dos (AgGT90 y AgGT42) fue a causa de problemas con la amplificación y la determinación de los alelos. Esto pudo deberse a mutaciones específicas en las regiones de anillamiento de los marcadores, lo cual causa una no homología que se reporta con frecuencia en la amplificación cruzada (Primmer et al. 2005, Silva et al. 2015). En este caso, lo anterior pudo deberse a que ambos marcadores pertenecen al grupo que fue diseñado originalmente para una especie del género *Amazona* (*A. guildingii*). En ese sentido, se ha observado un éxito de amplificación cruzada mucho menor entre especies de diferentes géneros que entre aquellas del mismo género (Barbará et al. 2007). Esto parece haberse presentado en este trabajo, ya que dentro del grupo de marcadores usados provenientes de *A. ararauna* todos amplificaron. Cabe destacar que Schmidt (2013) reportó problemas similares con AgGT90 y AgGT42 al probarlos en *A. macao*, por lo que también tuvo que descartarlos.

A pesar de que todos los marcadores originalmente diseñados para *A. ararauna* amplificaron con la lapa verde, uno (UnaCT41) presentó monomorfismo. Al igual que con la amplificación, el nivel de polimorfismo de un marcador también aumenta con la cercanía filogenética entre las especies (Galbusera et al. 2000, Primmer et al. 2005, Barbará et al. 2007, Dawson et al. 2010). En este caso, debido a la cercanía de las especies (pertenecientes al mismo género), es probable que el fenómeno observado

responda más a un fenómeno locus específico que a distancia filogenética (Harr et al. 1998, Küpper et al. 2008). Diferentes tasas y patrones de mutación pueden mostrarse en los microsatélites entre especies (Ellegren 2004). Por lo tanto, haciendo que el polimorfismo también varíe entre ellas (Küpper et al. 2008). Por ejemplo, en algunas especies se presentan variaciones de base única que reducen el número de repeticiones contiguas. Esas variaciones, así como un bajo número de repeticiones seguidas, ralentizan los eventos de mutación y fomentan el monomorfismo (Blanquer-Maumont & Crouau-Roy 1995). Sainudiin et al. (2004) encontraron que interrupciones en los microsatélites de incluso una única mutación puntual disminuye considerablemente su tasa de mutación en comparación con repeticiones puras.

Un ejemplo de esas variaciones de polimorfismo entre especies cercanas se puede observar en el trabajo de Gebhardt & Waits (2008a); quienes, además de rediseñar los marcadores, los probaron en cinco especies de guacamayas. Al hacerlo, encontraron que varios de los marcadores resultaron monomórficos en alguna de las especies, pero polimórficos en las demás. Tres de los cuatro marcadores que resultaron monomórficos en alguna de las especies en ese trabajo fueron polimórficos aquí para la lapa verde (AgGT17, AgGT21 y AgGT32). Excepto por UnaCT41, que fue monomórfico tanto para *Ara severus* como lo fue para la lapa verde en este trabajo.

La presencia de marcadores con datos faltantes suele ser común en genotipos provenientes de muestras no invasivas (Macbeth et al. 2011). Esto, debido a factores como el bajo contenido de ADN y las condiciones adversas que pueden degradar el ADN en el campo como humedad, calor y radiación ultravioleta (Morin et al. 2001, McKelvey & Schwartz 2004, Macbeth et al. 2011). Bajo éxito de amplificación se ha reportado incluso en muestras con concentraciones aparentemente buenas de ADN provenientes de fuentes no invasivas (Hausknecht et al. 2010). Dicha tendencia fue observada en el presente estudio, donde en una parte de las muestras no fue posible confirmar el 100% de los loci.

Con frecuencia, los estudios que utilizan muestras no invasivas incluyen genotipos con cierta cantidad de marcadores ausentes (Paetkau 2003, Smith et al. 2006, Arrendal et al. 2007, Mondol et al. 2009, Pérez et al. 2009, Jacob et al. 2010); aunque rara vez mencionan en que porcentaje están presentes en el set de datos (Peel et al. 2013). La inclusión de tales muestras debe manejarse con cuidado, ya que al contener menos información que los genotipos completos pueden dificultar la distinción entre individuos

distintos (Paetkau 2003). Esto puede causar sesgos en la estimación de diferentes parámetros genéticos, como por ejemplo las inferencias de estructura poblacional (Reeves et al. 2016). En este trabajo se incorporaron muestras con datos ausentes, pero se utilizaron las estimaciones de la curva de acumulación de genotipos y el P_D para evaluar con cuidado la capacidad del conjunto de loci de diferenciar entre genotipos distintos. De esta manera, se aseguró que solo se usaran las muestras con la cantidad mínima de loci para discernir entre ellas adecuadamente.

Por otro lado, aunque existan datos faltantes en el set de datos, si estos se mantienen en una cantidad baja probablemente tendrán poco efecto sobre los estimados (Peel et al. 2013). En ese sentido, Reeves et al. (2016) recomiendan que, para una adecuada inferencia de la estructura poblacional, el porcentaje de datos faltantes en la matriz no debe exceder el 2% del total. A pesar de que se usaron muestras con genotipos incompletos en los análisis, el porcentaje de valores faltantes en el conjunto de datos fue bastante bajo (1.76%). Esto permitió asegurar que el aumento en el tamaño de muestra que se logró al incorporar dichas muestras no pusiera en riesgo la confiabilidad de los análisis genéticos.

Por otro lado, debido a que los errores de genotipado tienden a ser más frecuentes en muestras no invasivas (McKelvey & Schwartz 2004), éstos se evaluaron con detenimiento en el conjunto de datos. Esto es importante, ya que su presencia puede sesgar los diferentes análisis genéticos poblacionales, y, por lo tanto, influenciar las conclusiones biológicas de un estudio (Van Oosterhout et al. 2004, Pompanon et al. 2005, Dąbrowski et al. 2014). El análisis de MICRO-CHECKER sugirió la existencia de alelos nulos en dos de los loci (UnaCT21 y AgGT17), basado en un aparente exceso de individuos homocigotos. Los alelos nulos, son alelos que consistentemente fallan en amplificar en el PCR, y por lo tanto no pueden ser detectados. Individuos heterocigotos para un alelo nulo son registrados erróneamente como homocigotos para el alelo visible (Dakin & Avise 2004, Hall et al. 2012). Esto puede llevar a un exceso de homocigotos, que puede afectar diferentes análisis como los de variabilidad genética, estructura poblacional, y endogamia (Caparroz et al. 2007, Chapuis & Estoup 2007, Hall et al. 2012). Por ejemplo, el estimado F_{st} y la distancia genética se pueden ver sobreestimados al reducirse la variabilidad genética por alelos nulos (Chapuis & Estoup 2007).

Los alelos nulos (así como los otros errores de genotipo) pueden ser detectados en estudios poblacionales al evaluar con cuidado el EHW, principalmente a través de la prueba de déficits de heterocigotos (Van Oosterhout et al. 2004, Chapuis & Estoup 2007, Dharmarajan & Rhodes 2013). Por esta razón, la evaluación del EHW se ha vuelto un primer paso obligatorio para los análisis genéticos (Dharmarajan & Rhodes 2013). Basándose en los resultados de estos análisis, se determina si es conveniente incluir un marcador en los análisis subsecuentes o no (Shama et al. 2011, Dharmarajan & Rhodes 2013). En ese sentido, al no encontrarse desviaciones del EHW ni déficit de heterocigotos con respecto al EHW en ninguno de los loci, se consideró que los efectos de la presencia de alelos nulos en el set de datos eran mínimos. Además, al correr los análisis sin UnaCT21 y AgGT17 no hubo gran cambio en los resultados obtenidos. Por consiguiente, se procedió a reportar los resultados de los análisis con todos los marcadores.

Por otro lado, el enfoque conservativo de descartar marcadores inicialmente porque se desvían de los esperados de EHW puede llevar a la exclusión de marcadores informativos ecológicamente. Por lo tanto, se recomienda considerar alternativas biológicas antes de descartar marcadores meramente por pruebas estadísticas, las cuales de todos modos serán sensibles a los mecanismos biológicos (Dharmarajan & Rhodes 2013). Si bien, en este trabajo no se consideró remover ningún loci, ya que no se presentaron desviaciones del EHW de ninguna clase. Sin embargo, sigue siendo importante considerar la posibilidad de que los alelos nulos sugeridos tengan un origen biológico.

En ese aspecto, factores relacionados con tamaños poblacionales reducidos, como la endogamia y el cuello de botella, pueden llevar a un aumento en la homocigosidad al igual que los alelos nulos (Dakin y Avise 2004, Hall et al. 2012, Dąbrowski et al. 2014). Por lo tanto, un exceso de homocigotos generado por ese tipo de mecanismos poblacionales puede ser malinterpretado como presencia de alelos nulos, llevando a falsos positivos (Dąbrowski et al. 2014). Así, el exceso de homocigotos sugerido para los dos marcadores podría estar relacionado a una disminución en el tamaño poblacional de la lapa verde en el país debido a las presiones antropogénicas y sus efectos sobre la genética de la misma.

Además de los alelos nulos, se encontró desequilibrio de ligamiento entre el par de loci CT43 y CT74. El desequilibrio de ligamiento se refiere a la asociación estadística no aleatoria de los alelos entre dos o más loci (Slatkin 2008, Rogers 2014). Este fenómeno

causa pseudoreplicación en los análisis que asumen independencia entre los marcadores (Selkoe & Toonen 2006). Por esta razón, para evitar cualquier sesgo se recomienda descartar uno de los marcadores en el par con desequilibrio de ligamiento (Wang 2017). Esto se realizó sin cambio alguno en los respectivos análisis. Además, el análisis de desequilibrio de ligamiento multilocus permitió corroborar que el par de loci aparentemente ligado no presentaba un efecto significativo a nivel del conjunto de loci. En consecuencia, se decidió no eliminar ninguno de los dos del total a utilizar.

Existen diversos factores no excluyentes que pueden propiciar la aparición y persistencia de desequilibrio de ligamiento (Wang 2017). Entre estos, se pueden mencionar: movimiento y mezcla de individuos entre poblaciones, deriva genética aleatoria, apareamiento no aleatorio, selección, fluctuaciones en el tamaño poblacional, cuello de botella y endogamia (Slatkin 2008, Szulkin et al. 2010, Rogers 2014, Wang 2017). Debido a esto, identificar un solo factor como posible causa es complicado, sobre todo porque bien podrían ser varios factores los que actúen.

Variabilidad genética y parentesco

Los valores de variabilidad genética observados en la lapa verde fueron menores a los de otras especies de guacamayas. Tanto los valores de heterocigosidad ($UH_e = 0.587$) como del número de alelos promedio ($N_A = 4$) resultaron más bajos que en especies menos amenazadas como *A. ararauna*, *A. chloropterus*, *A. macao*, *Orthopsittaca manilata* y *A. severus* (Cuadro 5). Todas estas especies se encuentran en la categoría de Preocupación Menor (LC) de la UICN (2017).

Por otro lado, la variabilidad genética de la lapa verde resultó más alta que la de otras especies amenazadas. Valores más bajos de heterocigosidad y media de alelos han sido reportados para *A. hyacinthinus* y *C. spixii* (Cuadro 5). Estas se encuentran categorizadas como Vulnerable (VU) y En Peligro Crítico (CE) respectivamente. En contraste, *A. militaris*, una especie muy cercana filogenéticamente con la lapa verde (Eberhard et al. 2015), ha mostrado una variabilidad genética mayor (Cuadro 5) que la observada aquí. Si bien, *A. militaris* tiene una categoría de amenaza menor (VU) y un tamaño poblacional mayor que la lapa verde (Juárez et al. 2012).

Cuadro 5. Niveles de heterocigosidad (H_e) y número de alelos (N_A) reportados en estudios previos para otras especies de guacamayas con microsatélites. Se reporta la categoría de amenaza para cada una según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). LC = Preocupación Menor, VU = Vulnerable, EN = En Peligro, CE = En Peligro Crítico.

Especie	H_e	N_A	# de marcadores	H_e promedio	N_A promedio	UICN	Referencia
<i>A. ambiguus</i>	0.587	4	7	0.548	4	EN	Este trabajo
<i>A. hyacinthinus</i>	0.350	2	4	0.398	3.75	VU	Faria et al. 2008
	0.447	2 a 9	10				Presti et al. 2015
<i>A. ararauna</i>	0.591	5.25	12	0.660	4.875	LC	Gebhardt & Waits 2008
	0.729	4.5	6				Caparroz et al. 2009
<i>A. chloropterus</i>	0.574	5.9	10	0.690	8.753	LC	Gebhardt & Waits 2008
	0.772	12.9	11				Olah et al. 2016
	0.725	7.46	9				Olah et al. 2017
<i>A. macao</i>	0.735	8.36	11	0.744	9.820	LC	Gebhardt & Waits 2008
	0.696	7.1	11				Schmidt 2013
	0.655	7.42	7				Monge et al. 2016
	0.892	16.4	11				Olah et al. 2016
<i>A. militaris</i>	0.620	5.31	8	0.62	5.31	VU	Rivera-Ortíz et al. 2017
<i>A. severus</i>	0.736	4.2	10	0.736	4.2	LC	Gebhardt & Waits 2008
<i>C. spixii</i>	0.433	3	12	0.433	3	CE	Monteiro 2015
<i>Orthopsittaca manilata</i>	0.675	4.3	10	0.675	4.3	LC	Gebhardt & Waits 2008

Por lo observado, la variabilidad genética de la lapa verde concuerda con el patrón de que especies amenazadas, y por ende con tamaños poblacionales menores, presentan una heterocigosidad menor que especies menos amenazadas y más abundantes (Amos & Harwood 1998, Evans & Sheldon 2008). Dicho patrón también ha sido reportado en las guacamayas. Presti et al. (2011), encontraron al comparar la heterocigosidad de cinco guacamayas que las especies más amenazadas tendieron a poseer niveles inferiores de variabilidad genética que las especies bajo menor amenaza. Al compararlas con lo encontrado en la lapa verde, ésta tuvo una variabilidad genética menor que *A. Leari* ($H_e = 0.62$) y *A. macao* ($H_e = 0.74$), pero mayor que la observada en *C. spixii* ($H_e = 0.55$), *A. hyacinthinus* ($H_e = 0.40$), *A. chloropterus* ($H_e = 0.55$).

Es importante recalcar que las comparaciones de los índices de variabilidad genética como la heterocigosidad deben realizarse con cuidado entre diferentes especies. Esto debido principalmente al uso de marcadores distintos en los diferentes estudios (Faria et al. 2008, Robertson et al. 2018). Por esta razón, se trató de citar aquellos trabajos donde se usaron el mismo tipo de marcadores microsatélites que los empleados aquí, y así mejorar la comparación. A pesar de esto, los trabajos mencionados no usaron la misma cantidad de marcadores, y en la mayoría de los casos solo usaron una parte de los utilizados aquí para la lapa verde. A eso se le suma que comparar la variabilidad genética entre especies puede ser difícil, debido a que probablemente tuvieron historias evolutivas distintas (Presti et al. 2015). Aun así, esta información sigue siendo muy útil como base de comparación, y para comprender el grado de amenaza genética de las especies (Faria et al. 2008, Robertson et al. 2018).

En ese sentido, parece ser que la lapa verde presenta reducida variabilidad genética con respecto a aquellas especies menos amenazadas. Sobre todo, comparada con especies filogenéticamente más emparentadas como las del género *Ara* (Provost et al. 2018). A pesar de eso, su variabilidad genética no resultó tan baja. Especialmente, si se compara con la descrita para las especies amenazadas *A. hyacinthinus* y *C. spixii*. Esto no es de sorprender, ya que *A. hyacinthinus* ha tenido disminuciones muy rápidas debido a la cacería y a la pérdida de su hábitat, mientras que a *C. spixii* se le considera la especie de loro más amenazada y una de las aves más críticamente amenazadas del mundo (Groffen et al. 2008, Pizo et al. 2008, Deb et al. 2010, Raso 2013). Además, aunque inferior, la heterocigosidad de la lapa verde resultó relativamente cercana a las reportadas como moderadas en *A. militaris* (Rivera-Ortiz et al. 2017) y *A. macao* (Monge

et al. 2016). Por consiguiente, se puede concluir que la especie presenta una variabilidad genética moderadamente baja en comparación a lo observado en otras especies de guacamayas.

Por otra parte, no se cuenta con mediciones históricas de la variabilidad genética de la especie. Tampoco se conocen valores de referencia de otras poblaciones en su distribución. Debido a esto, se hace más difícil determinar cuáles niveles pueden ser considerados normales en la especie. Además de cuál es el estado actual de la integridad genética de la población con respecto a ellos.

A pesar de los niveles reducidos de heterocigosidad y número de alelos, los coeficientes de endogamia no indicaron evidencia de endogamia entre los individuos muestreados. Tanto el F_{is} como los valores de COANCESTRY fueron consistentes con esto. Además, existió un muy bajo porcentaje (12.938%) de individuos emparentados en el conjunto de datos. Estos resultados permiten asumir que en la población predomina un apareamiento entre individuos poco emparentados. De ese modo, la endogamia estaría afectando muy poco a la genética de la población, y, al contrario, se estaría fomentando el mantenimiento o incluso aumento en la heterocigosidad a través del apareamiento aleatorio. Esto concuerda con la ausencia de desviaciones del EHW. Especialmente, con la ausencia de déficit de heterocigotos.

Diferenciación genética poblacional

Los diversos análisis realizados no encontraron evidencia de estructura poblacional. Por lo tanto, se concluye que los individuos de Costa Rica pertenecen a una misma población. Los resultados de la mayoría de los análisis fueron consistentes con este hecho. Solo el ΔK de STRUCTURE difirió con los demás. Este sugirió a $K = 2$ como el número de poblaciones más probable. El programa STRUCTURE es uno de los más usados actualmente para describir la estructura de una población. Sin embargo, ha sido reportado que en ocasiones no es capaz de identificar adecuadamente la cantidad de agrupaciones acorde con la historia evolutiva de las poblaciones (Kalinowski 2011).

En especial, ΔK no evalúa a $K = 1$ como una solución potencial. En ese caso, es probable que $K = 2$ sea reportado por defecto en las ocasiones donde haya solo una. En consecuencia, se recomienda que ΔK no sea usado exclusivamente para la determinación de la cantidad de grupos genéticos y que se combine con otros métodos (Janes et al. 2017). Además, se debe ser cuidadoso de que los métodos que se usen proporcionen una representación adecuada de la estructura poblacional (Kalinowski 2011). Se aconseja que el investigador seleccione un valor que sea biológicamente adecuado, basándose en el conocimiento de la historia de la población (Alexander et al. 2009, Janes et al. 2017).

En ese sentido, la ausencia de estructura con microsatélites ha sido reportada en otras especies de psitácidos como *Amazona auropalliata* (Wright et al. 2005), *Amazona aestiva* (Leite et al. 2008) y *A. ararauna* (Caparroz et al. 2009). En los casos anteriores, la gran capacidad de vuelo y dispersión de este grupo ha sido mencionada como una de las principales razones de la carencia de estructura. Sin embargo, otras investigaciones sí han encontrado estructura poblacional en guacamayas. Olah et al. 2017 encontraron diferenciación genética poblacional en *A. macao*. Ellos descubrieron que una barrera altitudinal estaba limitando el flujo en el área y creando estructura genética. A partir de sus resultados, sugieren que las elevaciones y regiones montañosas suponen una barrera importante a la dispersión de las guacamayas. Monge et al. 2016 también encontraron que una cordillera montañosa propició la diferenciación genética entre dos poblaciones de *A. macao* relativamente cercanas (≈ 80 km) al limitar el espacio físico para la dispersión, y por ende el flujo genético entre ellas. Por último, Rivera-Ortíz et al. 2017 encontraron dos poblaciones muy marcadas en *A. militaris*, divididas por la Sierra Madre en México. Mientras que los sitios de la misma vertiente, aunque relativamente separadas genéticamente, pertenecían a la misma población. En ese sentido, en la región del Caribe de Costa Rica no existen barreras geográficas de ese tipo que puedan suponer un obstáculo para los movimientos de la lapa verde. Así, es muy probable que la especie no haya tenido problemas para dispersarse por la región, lo que le habría permitido comportarse como una sola población históricamente. Sin embargo, queda pendiente analizar fuentes históricas de ADN de la especie en el país que ayuden esclarecer este hecho.

Investigaciones en especies de aves amenazadas, pero con mucha movilidad, también han encontrado patrones de ausencia de estructura. Por ejemplo, Kvistad et al. (2015) no encontraron estructura genética en el mielero regente (*Anthochaera phrygia*). Un ave que ha sido muy amenazada (CE) a causa de la pérdida y fragmentación de su

hábitat. Sin embargo, su alta movilidad ha impedido que su población se viera fragmentada genéticamente.

También, Stojanovic et al. (2018) no detectaron estructura en la población del periquito migrador (*Lathamus discolor*). Esta es una especie muy móvil y En Peligro Crítico (CE) debido a la pérdida de su hábitat y a la introducción del petauro del azúcar (*Petaurus breviceps*) en su sitio de reproducción en Tasmania (Heinsohn et al. 2015). El periquito migrador se reproduce en Tasmania y pasa el invierno en Australia continental. Los individuos cambian de sitio de anidación de un año a otro dependiendo de la disponibilidad de alimento. Esto hace que se formen grupos anidando en distintos sitios o que todos aniden en una misma área (Stojanovic et al. 2018). Los autores indican que este patrón variable de reproducción produce un amplio flujo génico que concuerda con la carencia de estructura.

Un patrón similar al anterior, de influencia de la disponibilidad y distribución de recursos clave en la estructura puede estarse dando en la lapa verde. Debido a la desaparición del almendro, el remanente principal del hábitat reproductivo de la lapa verde se encuentra restringido a una región relativamente pequeña en el Caribe norte del país (Chassot et al. 2001, Chassot et al. 2004, Madriz 2004). Dicho efecto pudo contribuir a que la población no se fragmentara en diferentes sitios de anidación, y al contrario se mantuviera como una sola unidad. Esto, debido a que se ha sugerido que la pérdida y fragmentación del hábitat puede crear un efecto de filopatría antropogénica en las guacamayas, donde los individuos y sus crías continúan reproduciéndose en la misma área focal a falta de hábitat adecuado que conecte sitios de anidación alejados (Schmidt 2013). Esto puede provocar patrones de estructura entre diferentes sitios de anidación aislados por zonas carentes de hábitat reproductivo o de alimentación, que propicien su conectividad. Esto puede ser especialmente importante en especies como la lapa verde, donde los individuos tienden a presentar fidelidad a sus nidos o zona de anidamiento (Villate et al. 2009). Sin embargo, en este caso quedó un área principal remanente con las condiciones para la reproducción de la especie en la región. Esto pudo contribuir a la panmixia de la población al mantener la reproducción de la lapa verde en una misma zona.

Por otro lado, aunque con gran capacidad de vuelo, la dirección de los movimientos de la mayoría de los psitácidos se ven muy influenciados por las variaciones temporales y la disposición en el paisaje de recursos críticos para ellas como la fenología de fructificación (Faria et al. 2008, Schmidt 2013). Esto es claramente observado en la lapa verde a través de su migración anual. En la época no reproductiva, la mayoría de los individuos se desplazan grandes distancias hacia los remanentes de su hábitat no reproductivo en el Caribe en busca de alimento. En dichos sitios, tienden a congregarse en grupos grandes de forrajeo compuestos por adultos y juveniles (Chassot et al. 2004, Monge et al. 2010). Dicha congregación durante esa época del año provee amplias oportunidades para la formación de parejas, lo que puede facilitar la conectividad genética regional (Schmidt 2013, Toft & Wright 2015). Es probable que tal comportamiento, en combinación con sus movimientos anuales, haya contribuido a que la población se siguiera comportando como una sola unidad.

Por otra parte, otras investigaciones con guacamayas han encontrado diferencias en estructura poblacional entre ADN nuclear (microsatélites) y ADN mitocondrial. Por ejemplo, Caparroz et al. 2009 aunque no encontraron estructura en la población de *A. ararauna* con microsatélites, encontraron división en dos haplogrupos a través de ADN mitocondrial. Una de las posibles explicaciones que los autores dan a este fenómeno es la existencia de dispersión sesgada por sexo. En ese caso, las hembras serían filopátricas, mientras que los machos tenderían a dispersarse. La existencia de estructura aparentemente causada por dispersión sesgada por sexo se ha mencionado también para *A. hyacinthinus* (Faria et al. 2008). Por lo tanto, no se puede descartar del todo la presencia de estructura poblacional en la zona solamente con el uso de microsatélites; quedando pendiente una evaluación del mitogenoma para confirmar los patrones anteriormente mencionados.

Análisis de cuello de botella genético

Por último, en los análisis de cuello de botella genético se encontraron resultados contrastantes. Por un lado, tanto el análisis de exceso de heterocigosidad basado en el modelo mutacional TPM como el *M*-Ratio encontraron evidencia genética para un cuello de botella reciente. Esto indicaría que pudo existir una reducción en el número de individuos que llevó a un evento reciente de cuello de botella genético en la población (Peery et al. 2012). Esto, a su vez, concordaría con los valores reducidos de heterocigosidad y número de alelos en comparación a otras especies de guacamayas. Sin

embargo, la prueba de cambio de moda en la distribución de las frecuencias alélicas mostró una distribución normal. Esto apuntaría a que aún hay una cantidad considerable de alelos raros en la población (Le Page et al. 2000). Lo anterior va en contra de lo que se espera en un evento de cuello de botella genético reciente (Fatima et al. 2008). Esto último coincidiría con la ausencia de endogamia encontrada.

Williamson-Natesan (2005) evaluó a través de simulaciones la capacidad de estos tres métodos de detectar cuellos de botella recientes. La autora encontró que los métodos con la mayor probabilidad de detectar correctamente un cuello de botella bajo diferentes escenarios fueron el exceso de heterocigosidad y el *M*-Ratio. El método de exceso de heterocigosidad tuvo la mayor probabilidad de detectar correctamente un cuello de botella si este fue reciente, poco severo o el tamaño de la población previo al cuello de botella era pequeño. El *M*-Ratio tuvo la mayor probabilidad de detectar correctamente un cuello de botella si este duró varias generaciones, la población tuvo una recuperación demográfica o el tamaño de la población previo al cuello de botella era grande. Por otro lado, la prueba de distribución de las frecuencias alélicas mostró una probabilidad alta de caer en error tipo II (fallar al detectar un cuello de botella cuando este estaba presente). Según la autora, esta prueba parece ser muy conservativa y con un poder limitado para detectar cuellos de botella bajo diferentes escenarios. Por lo tanto, que tanto el exceso de heterocigosidad como el *M*-Ratio sugirieran la existencia de un evento de cuello de botella genético reciente, pero la prueba de distribución de las frecuencias alélicas no, podría estar relacionado a procesos en la población que influenciaran el resultado de dicho análisis.

En ese sentido, y tomando en cuenta la movilidad de las guacamayas, es muy probable que la inmigración jugara un papel principal en lo observado. Se ha reportado que la inmigración de individuos a través de la dispersión es el proceso más probable para mantener o recuperar los niveles variabilidad genética en poblaciones que han sufrido un cuello de botella (Hurston et al. 2009, McEachern et al. 2011, Shama et al. 2011, Du et al. 2016). Este proceso puede favorecer la entrada de nuevos alelos raros, incrementando la frecuencia de alelos raros dentro de la población (Keller et al. 2001, Whitehouse & Harley 2001, Busch et al. 2007). Esto pudo afectar la detección del cuello de botella por parte de la prueba de distribución de las frecuencias alélicas. Además, la afluencia de migrantes a la población puede ayudar a mitigar rápidamente la endogamia que puede aparecer en poblaciones reducidas (Brook et al. 2002, Tallmon et al. 2004,

Palstra & Ruzzante 2008, Szulkin et al. 2009, Bijlsma & Loeschcke 2012). Así, la llegada de nuevos individuos a la población pudo aportar a la baja endogamia, y al bajo porcentaje de individuos emparentados observados.

Dicha inmigración de individuos pudo provenir principalmente desde la zona del sureste de Nicaragua. Si bien el número de individuos que habitan en Costa Rica se estima en 302, los que habitan y anidan en el sureste de Nicaragua están estimados en 532, los cuales se benefician de la existencia de la Reserva Biológica Indio-Maíz (Chassot et al. 2004, Monge et al. 2010). Por lo tanto, los individuos de esa zona representarían un reservorio genético importante en la región. Así, la migración de individuos desde esa región pudo ayudar a contrarrestar los efectos de un posible cuello de botella genético (Ingvarsson 2001, Tallmon et al. 2004, Lowe & Allendorf 2010, Bijlsma & Loeschcke 2012, Baguette et al. 2013).

Además, se ha observado que en la época no reproductiva una parte de los individuos en Costa Rica se mueve hacia Nicaragua (Chassot et al. 2004). En ese sentido, la dispersión también resulta un medio efectivo para evitar el apareamiento con parientes, y por ende la endogamia y sus efectos negativos (Szulkin et al. 2009, Baguette et al. 2013). Por lo tanto, no solo la inmigración, sino un intercambio activo de genes entre los individuos de la región pudo contribuir al patrón observado.

Por esta razón, resulta importante realizar estudios de genética poblacional para los individuos en la zona de Nicaragua. Esto con el fin de determinar sus niveles de variabilidad, flujo genético y, principalmente, determinar la relación que estos tienen con las lapas verdes que habitan en Costa Rica. En especial, debido a que las lapas del norte de Costa Rica y el sureste de Nicaragua no solo tendrían un importante flujo genético, sino que es muy probable que estas pertenezcan a una misma población.

Aparte del intercambio con los individuos en el sureste de Nicaragua, es posible que haya contacto con la población de Nicaragua-Honduras. Esto debido a que se han reportado desplazamientos de individuos hacia el norte de hasta 120 km (Chassot et al. 2004). A pesar de estar alejadas entre sí, es posible que haya flujo génico entre ambas poblaciones. Aunque probablemente en cantidades muy bajas.

Por otro lado, se ha observado un crecimiento en la población de la lapa verde en Costa Rica en los últimos años. En 1994 el estimado poblacional era de 210 individuos, mientras que para 2010 fue de 302 (Monge et al. 2010). Un crecimiento importante en el número de individuos posterior al cuello de botella puede favorecer la creación de alelos nuevos a través de mutación. Ello fomentaría el incremento tanto de alelos raros como de la heterocigosidad. Sin embargo, los alelos raros aumentarían más rápidamente que la heterocigosidad. Esto explicaría la no detección del cuello de botella genético por parte de la prueba de distribución de frecuencias alélicas (Busch et al. 2007, Broquet et al. 2010, Cristescu et al. 2010, Robertson et al. 2018). Sin embargo, es importante mencionar que dicho aumento hipotético en el número de individuos en el país también puede estar relacionado con la afluencia de individuos desde Nicaragua y los descendientes de estos (Keller et al. 2001). Por lo tanto, este incremento en el número de individuos puede ser una combinación entre un aumento en el reclutamiento y la inmigración.

Por otra parte, dicho crecimiento de la población pudo tener un efecto amortiguador sobre su genética. En ese caso, el aumento en el número de individuos, ya fuera a través de reclutamiento o inmigración, pudo darse lo suficientemente rápido como para que los efectos del cuello de botella fueran menores. Por ende, un número considerable de alelos raros se mantendría en la población (Le Page et al. 2000). Esto también se reflejaría en los valores de variabilidad genética. Por ejemplo, se espera que entre más se extienda el evento de cuello de botella, más intensa sea la reducción de la heterocigosidad (Hughes 2010). Como se mencionó anteriormente, aunque más baja que otras especies de guacamayas, la variabilidad no resultó extremadamente disminuida. Esto podría estar indicando que el cuello de botella sufrido no fue tan prolongado como para tener un impacto severo en la variación genética poblacional (Martinez-Cruz et al. 2004, Brown et al. 2007).

Por otro lado, se ha mencionado que largos tiempos generacionales pueden ayudar a reducir los efectos de un cuello de botella. Esto al producir un efecto amortiguador en contra de la pérdida rápida de diversidad genética (Hailer et al. 2006, Bourke et al. 2010). Los Psittaciformes en general poseen expectativas de vida bastante largas, donde los más grandes tienden a ser más longevos que los pequeños (Brouwer et al. 2000, Munshi-South & Wilkinson 2006). En el caso de la lapa verde, se ha reportado una longevidad máxima de 29 años (Brouwer et al. 2000). Por esta razón, cabe la posibilidad de que este factor contribuyera a mitigar en cierta medida la pérdida de

variabilidad genética en la población posterior al cuello de botella. Este efecto ya se ha sugerido en guacamayas para *A. macao* (Schmidt 2013, Monge et al. 2016), así como para varias especies de aves rapaces (Hailer et al. 2006, Brown et al. 2007, Bourke et al. 2010).

Por último, se ha destacado que en especies longevas es posible que los eventos antropogénicos sean muy recientes como para que produzcan fuertes señales genéticas. Así, puede haber un retraso de tiempo en el cual el impacto genético se vuelve visible. De este modo, se puede dar una disminución en la variabilidad de la población a futuro (Leite et al. 2008, Ripperger et al. 2013, Monge et al. 2016).

CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizaron con éxito marcadores desarrollados para otras especies de psitácidos. Sin embargo, tres tuvieron que ser descartados debido a problemas de amplificación o monomorfismo. En ambos casos pudo deberse a mutaciones que afectaron el éxito de amplificación cruzada de dichos marcadores. Se observó presencia de datos faltantes en algunas de las muestras. Esto suele ser común en genotipos provenientes de muestras no invasivas debido a factores como el bajo contenido de ADN y las condiciones ambientales adversas. Es importante evaluar con cuidado la capacidad del conjunto de loci de diferenciar entre genotipos distintos para evitar sesgos.

A pesar de que se presentaron alelos nulos en dos de los marcadores, éstos no fueron descartados ya que no se encontraron desviaciones del EHW de ningún tipo. Además, se concluyó que el exceso de homocigotos en los dos loci probablemente era de origen biológico. Por lo tanto, los alelos nulos sugeridos corresponderían a falsos positivos. Además, el desequilibrio de ligamiento encontrado en un par de loci no presentó un efecto significativo sobre el conjunto.

Los valores de variabilidad genética observados en la lapa verde fueron menores a los de otras especies de guacamayas. Especialmente, al de aquellas en menor categoría de amenaza. Esto concuerda con el patrón mencionado en la literatura de que especies más amenazadas presentan valores de variabilidad genética menores al de aquellas menos amenazadas. Sin embargo, la variabilidad de la lapa verde no resultó tan baja como la de otras especies altamente amenazadas. Se concluyó que la especie presenta una variabilidad genética moderada-baja en comparación a otras especies de guacamayas. Lamentablemente, no se cuenta con mediciones históricas de la variabilidad genética de la especie que ayuden a definir de manera más precisa cuál es el estado actual de la integridad genética de la población y cuáles serían los niveles óptimos a alcanzar.

Además, debido a la ausencia de endogamia, el bajo porcentaje de individuos emparentados encontrados, y la ausencia de desviaciones del EHW, se concluyó que en la población predomina un apareamiento entre individuos poco emparentados. De ese modo, la endogamia estaría afectando muy poco a la genética de la población, y, al

contrario, se estaría fomentando el mantenimiento o incluso aumento en la variabilidad genética a través del apareamiento aleatorio.

La ausencia de diferenciación y estructura poblacional es un resultado que se ajusta a la realidad biológica de la lapa verde. Esta probablemente se ha comportado históricamente como una sola población. Al no existir barreras geográficas importantes en el Caribe de Costa Rica que obstaculicen sus movimientos y gracias a su gran capacidad de vuelo, la especie ha podido dispersarse con facilidad en la región. Por otro lado, la población se sigue comportando como una sola unidad actualmente a pesar de la fragmentación del paisaje. Esto debido a que el remanente principal de su hábitat reproductivo se encuentra restringido a una misma zona relativamente pequeña. Lo anterior, ha evitado que la población se fragmente en diferentes sitios de anidamiento y ha mantenido la panmixia de la población. Además, sus movimientos anuales, así como su tendencia a congregarse en grupos grandes, probablemente han contribuido a mantener a la población como una sola unidad.

Se detectó la presencia de un evento reciente de cuello de botella genético en la población de Costa Rica. Los resultados contrastantes encontrados pudieron deberse a la influencia de procesos poblacionales sobre los análisis. En especial, el intercambio de individuos y genes con los que habitan en las regiones de Nicaragua pudo favorecer la entrada de nuevos alelos raros, además de disminuir la endogamia; ayudando así a contrarrestar los efectos de un posible cuello de botella genético. Otros factores como el crecimiento de la población, dispersión, y la longevidad de la especie pudieron contribuir al patrón observado.

RECOMENDACIONES

Se recomienda probar más marcadores heterólogos, o desarrollar marcadores propios para la especie. De esta manera, aumentar el número de marcadores disponibles para futuras investigaciones ya sea en la población de Costa Rica o en las demás poblaciones de su distribución.

Para obtener ADN de calidad, es recomendable el uso de plumas en buen estado. En especial, evitar el uso de plumas afectadas por la humedad (presencia de hongo) o que muestren indicios de llevar mucho tiempo expuestas a las condiciones ambientales.

Debido a que el crecimiento que se ha observado en la población parece estar acompañado de niveles moderados de variabilidad genética, se recomienda enfocar los esfuerzos de conservación a combatir amenazas más urgentes como el saqueo de los nidos y la pérdida de su hábitat.

Es necesario realizar acciones concretas para mejorar los hábitats reproductivo y no reproductivo de la especie en el país. En especial, propiciar la recuperación del almendro de montaña. Así, evitar que la carencia de hábitat adecuado sea limitante a largo plazo para que la población pueda alcanzar un tamaño mayor que le permita mantener y mejorar sus niveles de variabilidad genética.

Debido a que la lapa verde en Costa Rica se encuentra representada por una sola población, es importante realizar esfuerzos para mantener dicha estructura. Por ejemplo, se deben enfocar esfuerzos en prevenir que su hábitat reproductivo se vea fragmentado y que se produzcan sitios de anidamiento aislados. Dicho aislamiento podría provocar la aparición de fenómenos negativos para la población como la endogamia, y llevar a una disminución en la variabilidad genética que ponga en riesgo su supervivencia a largo plazo.

Para mantener niveles altos de variabilidad genética en la población de Costa Rica, así como evitar la aparición de efectos negativos a largo plazo como la endogamia, se recomienda evitar su aislamiento de las demás poblaciones. Para ello, se debe asegurar la presencia de hábitat idóneo para la especie entre las poblaciones. De esta manera, se incentiva la dispersión de los individuos y el flujo génico entre las poblaciones.

Se debe fomentar la conectividad, y, por ende, el intercambio de genes con los individuos y sitios de anidamiento del sureste de Nicaragua. Esto, a través de la conservación y recuperación del hábitat idóneo para la especie en esa zona binacional. Lo anterior favorecería el mantenimiento de niveles altos de variabilidad genética, así como la supervivencia de la población de a largo plazo.

Es de suma importancia llevar a cabo estudios genéticos en las demás poblaciones de la distribución de la lapa verde. Esto permitirá tener un panorama más claro del estado de conservación genética de la especie en toda su distribución. Así, se pueden identificar aquellas poblaciones que requieran acciones para recuperar su variabilidad genética. En especial, es importante realizar estudios de genética poblacional para las lapas verdes que se encuentran en Nicaragua. Con el fin de determinar sus niveles de variabilidad genética y esclarecer su relación con las lapas verdes que habitan en Costa Rica.

Es indispensable realizar evaluaciones a futuro de la genética de la población en el país. Esto con el fin de monitorear cambios, así como evaluar los efectos de las presiones antropogénicas sobre su variabilidad en el tiempo. De esta manera, se puede tener un marco de referencia más amplio para la toma de decisiones respecto al estado de su integridad genética.

Es recomendable evaluar a la población a través de ADN mitocondrial. Esto permitiría desvelar información valiosa sobre la estructura y comportamiento de la población. Por ejemplo, patrones de filopatría y dispersión sesgada por sexo.

Se recomienda evaluar fuentes históricas de ADN de la especie, como, por ejemplo, especímenes de museo. A través de esto se podría tener una idea del comportamiento que ha tenido la genética de la población en diferentes periodos de tiempo. En ese sentido, sería útil obtener valores anteriores a las presiones antropogénicas, que sirvan como referencia de los niveles de variabilidad normales para la especie.

IMPLICACIONES PARA EL MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LA VIDA SILVESTRE

El presente estudio permitió dilucidar el estado de la genética poblacional de una especie en peligro de extinción como lo es la lapa verde. Dicha información, puede ser muy útil para ayudar a dirigir los esfuerzos donde más aporten a la conservación de la especie. En especial, tomando en cuenta que en la mayoría de los casos los recursos para conservación son limitados, por lo que se deben seleccionar prioridades al asignar fondos (Allendorf et al. 2010, Haig et al 2011).

Se pudo observar que, a pesar de las presiones antropogénicas reportadas para la especie, la genética de la población en Costa Rica no se encuentra gravemente afectada. Esto sumado al crecimiento gradual que ha tenido la población en los últimos años resulta alentador para su conservación. En consecuencia, se considera que el estado de la genética de la población no representa una preocupación inmediata. En cambio, se debe enfocar los esfuerzos en disminuir las amenazas antropogénicas. Estas pueden representar una limitación para el restablecimiento tanto de la población como de sus niveles de variabilidad genética.

En los últimos años, se han realizado esfuerzos importantes para disminuir el saqueo de los nidos y conservar el hábitat reproductivo de la especie. Dichos esfuerzos son probablemente la principal razón del aumento en el número de individuos en el país. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, el hábitat de la especie se encuentra muy degradado. Esto plantea un impedimento importante a la recuperación de la población; por ejemplo, debido a una escasez de cavidades suficientes para anidar (Faria & Miyaki 2006, de la Parra-Martínez et al. 2015). Por ende, se debe trabajar con urgencia en aumentar la disponibilidad de tanto el hábitat reproductivo como el no reproductivo de la especie.

El hecho de que los individuos en Costa Rica pertenezcan a una población genéticamente panmíctica tiene consecuencias importantes para el manejo y conservación de la misma. Por ejemplo, la reincorporación de individuos decomisados o rehabilitados puede hacerse sin temor a alterar la estructura de la población. Siempre y cuando se asegure que dichos individuos pertenecen a la población del país. Sin embargo, dada la situación actual de los patrones poblacionales y genéticos de las lapas verdes que se distribuyen en Costa Rica, los proyectos de reproducción y reintroducción de individuos deberían ser desincentivados. Los mismos desvían recursos valiosos para

la protección *in situ* del hábitat idóneo para la lapa hacia la liberación de individuos que provienen de proyectos en donde se desconocen estos patrones, caracterizando el manejo *ex situ* de la lapa verde en Costa Rica como dudoso.

Por otro lado, proyectos importantes en la zona como el del canal seco interoceánico podrían afectar la estructura de la población. Dicho proyecto podría fragmentar el hábitat reproductivo de la especie creando zonas de anidamiento aisladas. Esto, a su vez, puede fomentar la aparición de fenómenos negativos para la población como la endogamia, y llevar a una disminución en la variabilidad genética que ponga en riesgo su supervivencia a largo plazo. Por lo tanto, esta información tan importante debe ser tomada en cuenta en los proyectos de manejo y conservación con el fin de mantener la integridad de la población.

Además, una de las mayores preocupaciones para la conservación de dicha población debe ser su flujo de genes con las otras poblaciones. Este flujo es de gran importancia para el crecimiento y recuperación genética de las poblaciones, especialmente de aquellas con presiones antropogénicas y en tamaños reducidos (Lowe & Allendorf 2010). Como se mencionó, aunque posean gran capacidad de desplazamiento, la disposición de recursos importantes para la especie determinará en gran manera la dirección de sus movimientos. Por lo tanto, grandes extensiones carentes de hábitat idóneo para la especie pueden limitar la dispersión y aislar a la población. En ese caso, el manejo debe ir enfocado a establecer conectividad entre las poblaciones para incentivar la migración entre ellas.

LITERATURA CITADA

- Abramson, J., B. L. Speer, J. B. Thomsen, & M. Mello. 1996. The large macaws: their care, breeding and conservation. Raintree Publications, Fort Bragg, California, USA.
- Ağaoğlu, Ö. K., & O. Ertuğrul. 2012. Assessment of genetic diversity, genetic relationship and bottleneck using microsatellites in some native Turkish goat breeds. *Small Ruminant Research* 105:53–60.
- Agapow, P. M., & A. Burt. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 1:101–102.
- Alexander, D. H., J. Novembre, & K. Lange. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research* 19:1655–1664.
- Allendorf, F. W., G. Luikart, & S. N. Aitken. 2013. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Allendorf, F. W., P. A. Hohenlohe, & G. Luikart. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature reviews genetics* 11:697–709.
- Amos, W., & A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter?. *Heredity* 87:257–265.
- Amos, W., & J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353:177–186.
- Archer, F. I., P. E. Adams, & B. B. Schneiders. 2017. strataG: An R package for manipulating, summarizing and analysing population genetic data. *Molecular Ecology Resources* 17:5–11.
- Arias, A. C., & C. Campregher. 2010. Plantas medicinales en una plantación de cacao en Guápiles, Costa Rica. *Research Journal of the Costa Rican Distance Education University* 2:231–237.
- Armstrong, R. A. 2014. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic and Physiological Optics* 34:502–508.

- Arrendal, J., C. Vila, & M. Björklund. 2007. Reliability of noninvasive genetic census of otters compared to field censuses. *Conservation Genetics* 8:1097–1107.
- Arroyo-Arce, S., & R. Salom-Pérez. 2014. First record of *Puma concolor* (Carnivora: Felidae) in Tortuguero National Park, Costa Rica. *Brenesia* 81–82:115–118.
- Arroyo-Arce, S., J. Guilder, & R. Salom-Pérez. 2014. Habitat features influencing jaguar *Panthera onca* (Carnivora: Felidae) occupancy in Tortuguero National Park, Costa Rica. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 62:1449–1458.
- Asmelash, B., S. Diriba, & S. K. Pal. 2017. Molecular markers based characterization and conservation of wild animals. *Research Journal of Recent Sciences* 6:53–62.
- Baguette, M., S. Blanchet, D. Legrand, V. M. Stevens, & C. Turlure. 2013. Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks. *Biological Reviews* 88:310–326.
- Bálint, M., Domisch, S., Engelhardt, C. H. M., Haase, P., Lehrian, S., Sauer, J., K. Theissing, S. U. Pauls, & C. Nowak. 2011. Cryptic biodiversity loss linked to global climate change. *Nature Climate Change* 1:313–318.
- Barbara, T., C. Palma-Silva, G. M. Paggi, F. Bered, M. F. Fay, & C. Lexer. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16:3759–3767.
- Barnes, M. A., & C. R. Turner. 2016. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 17:1–17.
- Berg, K. S., J. Socola, & R. R. Angel. 2007. Great Green Macaws and the annual cycle of their food plants in Ecuador. *Journal of Field Ornithology* 78:1–10.
- Berkunsky, I., P. Quillfeldt, D. J. Brightsmith, M. C. Abbud, J. M. R. E. Aguilar, U. Alemán-Zelaya, ... & J. B. Barberena. 2017. Current threats faced by Neotropical parrot populations. *Biological Conservation* 214:278–287.
- Bertorelle, G., M. W. Bruford, H. C. Hauffe, A. Rizzoli, & C. Vernesi. 2009. Population genetics for animal conservation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bijlsma, R., & V. Loeschcke. 2012. Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evolutionary Applications* 5:117–129.

- BirdLife International. 2013. *Ara ambiguus*. En IUCN. 2013. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.4. <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-2.RLTS.T22685553A48044192.en.>>. Accesado: 17 diciembre 2015.
- Blanquer-Maumont, A., & B. Crouau-Roy. 1995. Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved microsatellites in primate species. *Journal of molecular evolution* 41:492–497.
- Bonilla-Murillo, F., D. Beneyto, & M. Sasa-Marín. 2013. Anfibios y reptiles de los pantanos dominados por la palma de yolillo *Raphia taedigera* (Arecaceae) en el noreste de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 61:143–161.
- Bourke, B. P., A. C. Frantz, C. P. Lavers, A. Davison, D. A. Dawson, & T. A. Burke. 2010. Genetic signatures of population change in the British golden eagle (*Aquila chrysaetos*). *Conservation Genetics* 11:1837–1846.
- Bouzat, J. L. 2010. Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection, and history. *Conservation Genetics* 11:463–478.
- Brook, B., D. Tonkyn, J. O'Grady, & R. Frankham. 2002. Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. *Conservation Ecology* 6:<http://www.consecol.org/vol6/iss1/art16>.
- Broquet, T., S. Angelone, J. Jaquierey, P. Joly, J. P. Lena, T. Lengagne, S. Plenet, E. Luquet, & N. Perrin. 2010. Genetic bottlenecks driven by population disconnection. *Conservation Biology* 24:1596–1605.
- Brouwer, K., M. L. Jones, C. E. King, & H. Schifter. 2000. Longevity records for Psittaciformes in captivity. *International Zoo Yearbook* 37:299–316.
- Brown AHD., MW. Feldman, E. Nevo. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96:523–536.
- Brown, J. W., P. J. Van coeverden de groot, T. P. BIRT, G. Seutin, P. T. BOAG, & V. L. Friesen. 2007. Appraisal of the consequences of the DDT-induced bottleneck on the level and geographic distribution of neutral genetic variation in Canadian peregrine falcons, *Falco peregrinus*. *Molecular Ecology* 16:327–343.

- Busch, J. D., P. M. Waser, & J. A. DeWOODY. 2007. Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology* 16:2450–2462.
- Caballero, S., Correa-Cárdenas, C. A., & Trujillo, F. 2015. Population structure and genetic diversity of the endangered South American giant otter (*Pteronura brasiliensis*) from the Orinoco Basin in Colombia: management implications and application to current conservation programs. *Journal of Heredity* 106:469–477.
- Campos-Rodríguez, R., & S. M. Soto-Córdoba. 2014. Análisis de la situación del estado de la Gestión Integral de Residuos (GIR) en el cantón de Guácimo, Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha* 27:114–124.
- Caparroz, R. C. Y. Miyaki, & J. Baker. 2003. Characterization of microsatellite loci in the Blue-and-gold Macaw, *Ara ararauna* (Psittaciformes: Aves). *Molecular Ecology Notes* 3:441–443.
- Caparroz, R., C. Y. Miyaki, & A. J. Baker. 2009. Contrasting phylogeographic patterns in mitochondrial DNA and microsatellites: evidence of female philopatry and male-biased gene flow among regional populations of the blue-and-yellow macaw (Psittaciformes: *Ara ararauna*) in Brazil. *The Auk* 126:359–370.
- Caparroz, R., C. Y. Miyaki, M. I. Bampi, & A. Wajntal. 2001. Analysis of the genetic variability in a sample of the remaining group of Spix's Macaw (*Cyanopsitta spixii*, Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. *Biological Conservation* 99:307–311.
- Caparroz, R., K. C. Leite, L. A. Chinalia, C. Y. Miyaki, & R. G. Collevatti. 2007. Characterization of microsatellite loci in three species of *Amazona* (Psittaciformes) using heterologous primers. *Ornitología Neotrop* 18:438–444.
- Chapuis, M. P., & A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24:621–631.
- Chassot, O., G. Monge, G. Powell, S. Palminteri, U. Alemán, P. Wright, K. Adamek. 2001. Lapa verde, víctima del manejo forestal insostenible. *Ciencias Ambientales* 21:60–69.
- Chassot, O., G. Monge, U. Alemán, G. Powell, & S. Palminteri. 2004. Ecología y migraciones de la lapa verde. *Ambientales* 28:31–42.

- Chassot, O., G. Monge, & G. Powell. 2009. Biología de la conservación de la lapa verde 1994-2006: 12 años de experiencia. Centro Científico Tropical, San José, Costa Rica.
- Chaves S. L., I. Dias, C. Pomilla. 2010. Extraction of genomic DNA from carnivore fecal samples using QIAamp DNA Stool Mini Kit. https://www.amnh.org/content/download/69689/1196524/version/1/file/2010_stool_extraction_protocol.doc. Accesado el 17 marzo de 2018.
- Chun, S. L. 2008. The utility of digital aerial surveys in censusing *Dipteryx panamensis*, the key food and nesting tree of the endangered great green macaw (*Ara ambigua*) in Costa Rica. Dissertation, Duke University, Durham, USA.
- Cristescu, R., W. B. Sherwin, K. Handasyde, V. Cahill, & D. W. Cooper. 2010. Detecting bottlenecks using BOTTLENECK 1.2. 02 in wild populations: the importance of the microsatellite structure. *Conservation Genetics* 11:1043–1049.
- Dąbrowski, M. J., M. Pilot, M. Kruczyk, M. Żmihorski, H. M. Umer, & J. Gliwicz. 2014. Reliability assessment of null allele detection: inconsistencies between and within different methods. *Molecular Ecology Resources* 14:361–373.
- Dakin, E. E., & J. C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509.
- Dawson, D. A., G. J. Horsburgh, C. Küpper, I. R. Stewart, A. D. Ball, K. L. Durrant, B. Hansson, I. Bacon, S. Bird, A. Klein, A. P. Krupa, J. Lee, D. Martín-Gálvez, M. Simeoni, G. Smith, L. G. Spurgin, T. Burke. 2010. New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility—as demonstrated for birds. *Molecular ecology resources* 10:475–494.
- de la Parra-Martínez, S. M., K. Renton, A. Salinas-Melgoza, & L. G. Muñoz-Lacy. 2015. Tree-cavity availability and selection by a large-bodied secondary cavity-nester: The Military Macaw. *Journal of ornithology* 156:489–498.
- Deb, A., U. Foldenauer, R. J. Borjal, W. J., Streich, C. Lüken, R. Johne, H. Müller, & Hammer, S. 2010. A longitudinal study on avian polyomavirus-specific antibodies in captive Spix's Macaws (*Cyanopsitta spixii*). *Journal of avian medicine and surgery* 24:192–198.

- D'Elia, J., S. M. Haig, T. D. Mullins, & M. P. Miller. 2016. Ancient DNA reveals substantial genetic diversity in the California Condor (*Gymnogyps californianus*) prior to a population bottleneck. *The Condor* 118:703–714.
- DeSalle, R., & G. Amato. 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 5:702–712.
- DeYoung, R. W., & R. L. Honeycutt. 2005. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management* 69:1362–1384.
- Dharmarajan, G., W. S. Beatty, & O. E. Rhodes. 2013. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: dispelling unfounded expectations. *The Journal of Wildlife Management* 77:226–234.
- Di Rienzo A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin, & N. B. Friemer. 1994. Mutational process of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:3166–3170.
- Drews, C. (2001). Wild animals and other pets kept in Costa Rican households: incidence, species and numbers. *Society & Animals* 9:107–126.
- Du, Y., X. Zou, Y. Xu, X. Guo S. Li, X. Zhang, M. Su, J. Ma, & S. Guo. 2016. Microsatellite Loci Analysis Reveals Post-bottleneck Recovery of Genetic Diversity in the Tibetan Antelope. *Scientific reports* 6:35501.
- Earl, D. A., & B. M. VonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–361.
- Eberhard, J. R., E. E. Iñlgo-Elias, E. Enkerlin-Hoeflich, & E. P. Cun. 2015. Phylogeography of the Military Macaw (*Ara militaris*) and the Great Green Macaw (*A. Ambiguus*) Based on MTDNA Sequence Data. *The Wilson Journal of Ornithology* 127:661–669.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics* 5:435–445.
- Evans, S. R., & B. C. Sheldon. 2008. Interspecific patterns of genetic diversity in birds: correlations with extinction risk. *Conservation Biology* 22:1016–1025.

- Ewing, S. R., R. G. Nager, M. A. Nicoll, A. Aumjaud, C. G. Jones, & L. F. Keller. 2008. Inbreeding and loss of genetic variation in a reintroduced population of Mauritius kestrel. *Conservation Biology* 22:395–404.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, & J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Fagan, W. F., & E. E. Holmes. 2006. Quantifying the extinction vortex. *Ecology letters* 9:51–60.
- Falush, D., M. Stephens, & J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.
- Faria, P. J. & C. Y. Miyaki. 2006. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). *Genetics and Molecular Biology* 29:231–240.
- Faria, P. J., N. M. Guedes, C. Yamashita, P. Martuscelli, & C. Y. Miyaki. 2008. Genetic variation and population structure of the endangered Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*): implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 17:765–779.
- Farias, I. P., W. G. Santos, M. Gordo, & T. Hrbek. 2015. Effects of forest fragmentation on genetic diversity of the Critically Endangered primate, the pied tamarin (*Saguinus bicolor*): Implications for conservation. *Journal of Heredity* 106:512–521.
- Fatima, S., C. D. Bhong, D. N. Rank, & C. G. Joshi. 2008. Genetic variability and bottleneck studies in Zalawadi, Gohilwadi and Surti goat breeds of Gujarat (India) using microsatellites. *Small Ruminant Research* 77:58–64.
- Fernandes, G. A., & R. Caparroz. 2013. DNA sequence analysis to guide the release of blue-and-yellow macaws (*Ara ararauna*, Psittaciformes, Aves) from the illegal trade back into the wild. *Molecular biology reports* 40:2757–2762.
- Fernández, J., M. A. Toro, & A. Caballero. 2004. Managing individuals' contributions to maximize the allelic diversity maintained in small, conserved populations. *Conservation Biology* 18:1358–1367.

- Fonseca, W., F. E. Alice, J. Montero, H. Toruño, & H. Leblanc. 2008. Acumulación de biomasa y carbono en bosques secundarios y plantaciones forestales de *Vochysia guatemalensis* e *Hieronyma alchorneoides* en el Caribe de Costa Rica. *Agroforestería en las Américas* 46:57–64.
- Forshaw, J. M. 2010. *Parrots of the World*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Forsman, E. D., R. G. Anthony, K. M. Dugger, E. M. Glenn, A. B. Franklin, G. C. White, C. J. Schwarz, K. P. Burnham, D. R. Anderson, J. D. Nichols, J. E. Hines, J. B. Lint, R. J. Davis, S. H. Ackers, L. S. Andrews, B. L. Biswell, P. C. Carlson, L. V. Diller, S. A. Gremel, D. R. Herter, J. M. Higley, R. B. Horn, J. A. Reid, J. Rockweit, J. P. Schaberl, T. J. Snetsinger, & S. G. Sovern. 2011. *Population Demography of Northern Spotted Owls*: Published for the Cooper Ornithological Society (No. 40). University of California Press, California, USA.
- Fraixedas, S., Á. Fernández-Llamazares, A. Rico, A. Bach, M. Borrós, C. Barriocanal, & M. Boada. 2014. Suitability of the South Caribbean Coast of Costa Rica for Reintroduction of the Great Green Macaw *Ara ambiguus*. *Natural Resources* 5:653–665.
- Frankham, R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies* 326:22–29.
- Frankham, R. 2005. Conservation biology: ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity* 95:183.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation* 126:131–140.
- Frankham, R. 2010. Where are we in conservation genetics and where do we need to go?. *Conservation Genetics* 11:661–663.
- Frankham, R., D. A. Briscoe, & J. D. Ballou. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press, Cambridge, UK.
- Frankham, R., J. D. Ballou, & D. A. Briscoe. 2004. *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Frankham, R., J. D. Ballou, K. Ralls, M. Eldridge, M. R. Dudash, C. B. Fenster, R. C. Lacy, & Sunnucks, P. 2017. Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Frosch, C., R. H. Kraus, C. Angst, R. Allgöwer, J. Michaux, J. Teubner, & C. Nowak. 2014. The genetic legacy of multiple beaver reintroductions in Central Europe. *PLoS one* 9:e97619.
- Funk, W. C., E. D. Forsman, M. Johnson, T. D. Mullins, & S. M. Haig. 2010. Evidence for recent population bottlenecks in northern spotted owls (*Strix occidentalis caurina*). *Conservation Genetics* 11:1013–1021.
- Funk, W. C., T. D. Mullins, & S. M. Haig. 2007. Conservation genetics of snowy plovers (*Charadrius alexandrinus*) in the Western Hemisphere: population genetic structure and delineation of subspecies. *Conservation Genetics* 8:1287–1309.
- Galbusera, P., Van S. Dongen, & E. Matthysen. 2000. Cross-species amplification of microsatellite primers in passerine birds. *Conservation Genetics* 1:163–168.
- Garza J. C., & E. G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10:305–318.
- Gebhardt, K. J., & L. P. Waits. 2008. Cross-species amplification and optimization of microsatellite markers for use in six Neotropical parrots. *Molecular Ecology Resources* 8:835–839.
- Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Revista Ecosistemas* 18:23–33.
- Gómez-Figueroa, P. 2009. Ecología y conservación de la lapa verde (*Ara ambigua*) en Costa Rica. *Posgrado y Sociedad* 9:58–80.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from www.unil.ch/izea/software/fstat.html.
- Graham, K. E., M. J. Bulloch, & T. R. Lewis. 2013. Foraging behavior of three primate species in a Costa Rican coastal lowland tropical wet forest. *Biodiversity Journal* 4:327–334.

- Groffen, H., R. Watson, S. Hammer, & S. R. Raidal. 2008. Analysis of growth rate variables and postfeeding regurgitation in hand-reared Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*) chicks. *Journal of avian medicine and surgery* 22:189–198.
- Guedes, N. M. R. 2004. Management and conservation of the large macaws in the wild. *Ornitologia Neotropical* 15:279–283.
- Guittar, J. L., F. Dear & C. Vaughan. 2009. Scarlet Macaw (*Ara macao*, Psittaciformes: Psittacidae) Nest Characteristics in the Osa Peninsula Conservation Area (ACOSA), Costa Rica. *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 57:387–393.
- Haig, S. M., M. Miller, R. Bellinger, H. M. Draheim, D. M. Mercer, & T. D. Mullins. 2016. The conservation genetics juggling act: integrating genetics and ecology, science and policy. *Evolutionary applications* 9:181–195.
- Haig, S. M., R. S. Wagner, E. D. Forsman, & T. D. Mullins. 2001. Geographic variation and genetic structure in spotted owls. *Conservation Genetics* 2:25–40.
- Haig, S. M., W. M. Bronaugh, R. S. Crowhurst, J. D'elia, C. A. Eagles-Smith, C. W. Epps, B. Knaus, P. M. Miller, M. L. Moses, S. Oyler-McCance, W. D. Robinson, & B. Sidlauskas. 2011. Genetic applications in avian conservation. *The Auk* 128:205–229.
- Hailer, F., B. Helander, A. O. Folkestad, S. A. Ganusevich, S. Garstad, P. Hauff, C. Koren, T. Nygård, V. Volke, C. Vilà, & H. Ellegren. 2006. Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline. *Biology letters* 2:316–319.
- Hall, N., L. Mercer, D. Phillips, J. Shaw, & A. D. Anderson. 2012. Maximum likelihood estimation of individual inbreeding coefficients and null allele frequencies. *Genetics research* 94:151–161.
- Hanson, T. 2006. Effects of habitat fragmentation on the reproductive ecology and conservation genetics of the almendro (*Dipteryx panamensis*), a keystone rainforest tree. Dissertation, University of Idaho, Idaho, USA.

- Hanson, T. R., S. J. Brunfeldt, B. Finegan & L. P. Waits. 2007. Characterization of microsatellite markers for the almendro (*Dipteryx panamensis*), a tetraploid rainforest tree. *Molecular Ecology Notes* 8:425–427.
- Hardman C. 2011. Sustaining a splendid species. *Americas* 63:6–13.
- Harr, B., B. Zangerl, G. Brem, & C. Schlötterer. 1998. Conservation of locus-specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species, *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Molecular biology and evolution* 15:176–184.
- Hausknecht, R., H. Bayerl, R. Gula, & R. Kuehn, 2010. Application of quantitative real-time polymerase chain reaction for noninvasive genetic monitoring. *Journal of Wildlife Management* 74:1904–1910.
- Heinsohn, R., M. Webb, R. Lacy, A. Terauds, R. Alderman, & D. Stojanovic. 2015. A severe predator-induced population decline predicted for endangered, migratory swift parrots (*Lathamus discolor*). *Biological Conservation* 186:75–82.
- Herrero, M. F. 2006. Evaluación de la variabilidad genética en una población cautiva de lapas verdes (*Ara ambigua*, Bechstein) mediante la técnica de microsatélites. Thesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Hoffmann, A. A., C. M. Sgrò, & T. N. Kristensen. 2017. Revisiting adaptive potential, population size, and conservation. *Trends in ecology & evolution* 32:506–517.
- Holland, W. J. 1910. *Annals of the Carnegie Museum* V.6. Publications of The Carnegie Museum, California, USA.
- Horváth, M. B., B. Martínez-Cruz, J. J. Negro, L. Kalmár, & J. A. Godoy. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* 36:84–88.
- Hughes, A. L. 2010. Reduced microsatellite heterozygosity in island endemics supports the role of long-term effective population size in avian microsatellite diversity. *Genetica* 138:1271–1276.
- Hurston, H., L. Voith, J. Bonanno, J. Foufopoulos, P. Pafilis, E. Valakos, & N. Anthony. 2009. Effects of fragmentation on genetic diversity in island populations of the

- Aegean wall lizard *Podarcis erhardii* (Lacertidae, Reptilia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52:395–405.
- Ingvarsson, P. K. 2001. Restoration of genetic variation lost—the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* 16:62–63.
- IUCN. 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Accesado el 17 marzo de 2018.
- Jacob, G., R. Debrunner, F. Gugerli, B. Schmid, & K. Bollmann. 2010. Field surveys of capercaillie (*Tetrao urogallus*) in the Swiss Alps underestimated local abundance of the species as revealed by genetic analyses of non-invasive samples. *Conservation Genetics* 11:33–44.
- James, P. 2012. Buffon's Macaw: Hatched to Fly Free. *Parrots* 177:38–41.
- Jamieson, I. G. 2015. Significance of population genetics for managing small natural and reintroduced populations in New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 39:1–18.
- Janes, J. K., J. M. Miller, J. R. Dupuis, R. M. Malenfant, J. C. Gorrell, C. I. Cullingham, & R. L. Andrew. 2017. The K= 2 conundrum. *Molecular ecology* 26:3594–3602.
- Juárez, M., G. Marateo, P. G. Grilli, L. Pagano, M. Rumi, & M. Silva Croome. 2012. Estado del conocimiento y nuevos aportes sobre la historia natural del Guacamayo Verde (*Ara militaris*). *El hornero* 27:5–16.
- Kalinowski, S. T. 2011. The computer program STRUCTURE does not reliably identify the main genetic clusters within species: simulations and implications for human population structure. *Heredity* 106:625–632.
- Kamvar ZN, Brooks JC and Grünwald NJ. 2015. Novel R tools for analysis of genome wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics* 6:10.3389/fgene.2015.00208.
- Kamvar, Z.N., J.F. Tabima, and N. J. Grünwald, 2014b. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281.

- Karchani-Balma, S., A. Gautier, A. Raies, & E. Fournier. 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* 98:1271–1279.
- Keller, L. F., & D. M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in ecology & evolution* 17:230–241.
- Keller, L. F., K. J. Jeffery, P. Arcese, M. A. Beaumont, W. M. Hochachka, J. N. Smith, & M. W. Bruford. 2001. Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268:1387–1394.
- Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology* 85:1049–1064.
- Kinnison, M. T., A. P. Hendry, & C. A. Stockwell. 2007. Contemporary evolution meets conservation biology II: impediments to integration and application. *Ecological Research* 22:947–954.
- Küpper, C., T. Burke, T. Székely, & D. A. Dawson. 2008. Enhanced cross-species utility of conserved microsatellite markers in shorebirds. *BMC genomics* 9:502.
- Kvistad, L., D. Ingwersen, A. Pavlova, J. K. Bull, & P. Sunnucks. 2015. Very low population structure in a highly mobile and wide-ranging endangered bird species. *PloS one* 10:e0143746.
- Laikre, L., F. W. Allendorf, L. C. Aroner, C. S. Baker, D. P. Gregovich, M. M. Hansen, J. A. Jackson, K. C. Kendall, K. McKelvey, M. C. Neel, I. Olivieri, N. Ryman, M. K. Schwartz, R. ShortBull, J. B. Stetz, D. A. Tallmon, B. L. Taylor, C. D. Vojta, D. M. Waller & R. S. Waples. 2010. Neglect of genetic diversity in implementation of the convention of biological diversity. *Conservation Biology* 24:86–88.
- Laikre, L., T. Nilsson, C. R. Primmer, N. Ryman, & F. W. Allendorf. 2009. Importance of genetics in the interpretation of favourable conservation status. *Conservation Biology* 23:1378–1381.
- Le Page, S. L., R. A. Livermore, D. W. Cooper, & A. C. Taylor. 2000. Genetic analysis of a documented population bottleneck: introduced Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in New Zealand. *Molecular Ecology* 9:753–763.

- Leite, K. C. E., G. H. F. Seixas, I. Berkunsky, R. G. Collevatti, & R. Caparroz. 2008. Population genetic structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*, Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. *Genet Mol Res* 7:819–829.
- Lewis, P. O. & D. Zaykin. 2001. Genetic Data Analysis V1.1.
<http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>.
- Lewis, T., P. Grant, M. G. Quesada, C. Ryall, T. C. LaDuke, & W. Road. 2010. A botanical survey of Caño Palma Biological Station (Estación Biológica Caño Palma), Tortuguero, Costa Rica. *Brenesia* 73:73–84.
- Lindshield, S. M. 2006. The density and distribution of *Ateles geoffroyi* in a mosaic landscape at El Zota Biological Field Station, Costa Rica. Thesis, Iowa State University, Iowa, USA.
- Lobo, Y. A. & G. A. E. Morales. 2014. Microsatélites. Páginas 75-100 en Cornejo, R. A., D. A. Serrato, B. R. Aguilar & M. G. R. Munive, editores. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. INECC-SEMARNAT, Coyoacán, México.
- Lowe, W. H., & F. W. Allendorf. 2010. What can genetics tell us about population connectivity?. *Molecular ecology* 19:3038–3051.
- Luckett, J., E. Danforth, K. Linsenhardt, & J. Pruetz. 2004. Planted trees as corridors for primates at El Zota Biological Field Station, Costa Rica. *Neotropical Primates* 12:143–146.
- Luikart, G., F. W. Allendorf, J.-M. Cornuet, & W. B. Sherwin. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The Journal of Heredity* 89:238–247.
- Lynch M., & K. Ritland. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152:1753–1766.
- Macbeth, G. M., D. Broderick, J. R. Ovenden, & R. C. Buckworth. 2011. Likelihood-based genetic mark–recapture estimates when genotype samples are incomplete and contain typing errors. *Theoretical population biology* 80:185–196.

- Madriz, B. 2004. Relación de dependencia directa para la alimentación y anidación de la lapa verde (*Ara ambigua*) y el almendro (*Dipteryx panamensis*) en la zona norte de Costa Rica. Informe de consultoría presentado a la Comisión Interna del SINAC y FONAFIFO, San José, Costa Rica. 33pp.
- Maglianesi-Sandoz, M. A. 2013. Desarrollo de las piñeras en Costa Rica y sus impactos sobre ecosistemas naturales y agro-urbanos. *Biocenosis* 27:62–70.
- McEachern, M. B., D. H. Van Vuren, C. H. Floyd, B. May, & J. M. Eadie. 2011. Bottlenecks and rescue effects in a fluctuating population of golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Conservation Genetics*, 12:285–296.
- McKelvey, K. S., & M. K. Schwartz. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *Journal of Wildlife Management* 68:439–448.
- MINAE. 2012. Plan de manejo del Refugio Nacional de Vida Silvestre Barra del Colorado. Pococí, Limón, Costa Rica. 283 Páginas Eds Fernando Bermúdez A. y Alekcey Chuprine V.
- Miyaki Y. C., R. Griffiths, K. Orr, A. L. Nahum, L. S. Pereira & A. Wajntal. 1998. Sex Identification of Parrots, Toucans, and Curassows by PCR: Perspectives for Wild and Captive Population Studies. *Zoo Biology* 17:415–423.
- Mondol, S., K. U. Karanth, N. S. Kumar, A. M. Gopaldaswamy, A. Andheria, & U. Ramakrishnan. 2009. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biological Conservation* 142:2350–2360.
- Monge, A. G., O. Chassot, O. Ramírez, Z. I. Alemán, A. Figueroa & D. Brenes. 2012. Temporada de nidificación 2009 de *Ara ambiguus* y *Ara macao* en el Sureste de Nicaragua y Norte de Costa Rica. *Zeledonia* 16:3–14.
- Monge, G, O. Chassot, H. Cháves, J.E. Rodríguez, G. Gutiérrez-Espeleta, K. Traylor-Holzer, Y. Matamoros, editores. 2009. Taller de conservación de la guacamaya verde (*Ara ambiguus*) evaluación de viabilidad poblacional y de hábitat (PHVA). Informe Final. 22 al 26 de Setiembre, 2008. Estación Biológica La Selva Heredia, Costa Rica.

- Monge, G. 2013. Evaluación del estado de conservación y viabilidad poblacional de la lapa verde (*Ara ambiguus*) en el Corredor Biológico Binacional El Castillo-San Juan-La Selva, Costa Rica-Nicaragua.
- Monge, G. A., O. Chassot, O. Ramírez, I. A. Zelaya, & A. Figueroa. 2010. Censo poblacional durante el periodo reproductivo de la subpoblación de *Ara ambiguus* en el sureste de Nicaragua y norte de Costa Rica 2009. *Zeledonia* 14:12–24.
- Monge, O., K. Schmidt, C. Vaughan, & G. Gutiérrez-Espeleta. 2016. Genetic patterns and conservation of the Scarlet Macaw (*Ara macao*) in Costa Rica. *Conservation Genetics* 17:745–750.
- Monteiro, R. S. 2015. Isolamento de microssatélites e análise genética de ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*, Aves, Psittaciformes). Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Morgan, J. A., V. T. Vredenburg, L. J. Rachowicz, R. A. Knapp, M. J. Stice, T. Tunstall, R. E. Bingham, J. M. Parker, J. E. Longcore, C. Moritz, C. J. Briggs, & J. W. Taylor. 2007. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:13845–13850.
- Morin, P. A., K. E. Chambers, C. Boesch, & L. Vigilant. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular ecology* 10:1835–1844.
- Munshi-South, J., & G. S. Wilkinson. 2006. Diet influences life span in parrots (Psittaciformes). *The Auk* 123:108–118.
- Nader, W., D. Werner, & M. Wink. 1999. Genetic diversity of scarlet macaws *Ara macao* in reintroduction studies for threatened populations in Costa Rica. *Biological Conservation* 87:269–272.
- Ojeda, A. P., L. M. Hirt & P. D. Zapata. 2012. Amplificación interespecífica de microssatélites de *Astyanax abramis*, utilizando cebadores para la especie emparentada *Astyanax fasciatus*. *Revista de Ciencia y Tecnología* 17:38–43.

- Olah, G., Butchart, S. H., Symes, A., Guzmán, I. M., Cunningham, R., Brightsmith, D. J., & Heinsohn, R. 2016. Ecological and socio-economic factors affecting extinction risk in parrots. *Biodiversity and Conservation* 25:205–223.
- Olah, G., R. G. Heinsohn, D. J. Brightsmith, & R. Peakall. 2017. The application of non-invasive genetic tagging reveals new insights into the clay lick use by macaws in the Peruvian Amazon. *Conservation Genetics* 18:1037–1046.
- Olah, G., R. G. Heinsohn, D. J. Brightsmith, J. R. Espinoza, & R. Peakall. 2016. Validation of non-invasive genetic tagging in two large macaw species (*Ara macao* and *A. chloropterus*) of the Peruvian Amazon. *Conservation Genetics Resources* 8:499–509.
- Oliveira, R., R. Godinho, E. Randi, N. Ferrand, & P. C. Alves. 2008. Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics* 9:1–11.
- Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Molecular ecology* 12:1375–1387.
- Palstra, F. P., & D. E. Ruzzante. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence?. *Molecular Ecology* 17:3428–3447.
- Parr, M., & T. Juniper. 2010. *Parrots: a guide to parrots of the world*. A&C Black Publishers, Soho Square, London, England.
- Peakall, R., & P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539.
- Peel, D., R. S. Waples, G. M. Macbeth, C. Do, & J. R. Ovenden. 2013. Accounting for missing data in the estimation of contemporary genetic effective population size (N_e). *Molecular ecology resources* 13:243–253.
- Peery, M. Z., R. Kirby, B. N. Reid, R. Stoelting, E. Doucet-Bëer, S. Robinson, C. Vásquez-Carrillo, J. N. Pauli, & P. J. Palsbøll. 2012. Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology* 21:3403–3418.

- Pérez, T., F. Vázquez, J. Naves, A. Fernández, A. Corao, J. Albornoz, & A. Domínguez. 2009. Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*). *Conservation genetics* 10:291–301.
- Piry S., G. Luikart, & J. M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90:502–503.
- Pizo, M. A., C. I. Donatti, N. M. R. Guedes, & M. Galetti. 2008. Conservation puzzle: Endangered hyacinth macaw depends on its nest predator for reproduction. *Biological Conservation* 141:792–796.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain, & P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847–859.
- Presti, F. T. & A. P. Wasko. 2014. A review of microsatellite markers and their application on genetic diversity studies in parrots. *Open Journal of Genetics* 4:69–77.
- Presti, F. T., A. R. Oliveira-Marques, R. Caparroz, C. Biondo & C. Y. Miyaki. 2011. Comparative analysis of microsatellite variability in five macaw species (Psittaciformes, Psittacidae): Application for conservation. *Genetics and molecular biology* 34:348–352.
- Presti, F. T., N. M. Guedes, P. T. Antas & C. Y. Miyaki. 2015. Population genetic structure in hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and identification of the probable origin of confiscated individuals. *Journal of Heredity* 106:491–502.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo J. U., & Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology* 36:348–360.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Provost, K. L., L. Joseph, & B. T. Smith. 2018. Resolving a phylogenetic hypothesis for parrots: Implications from systematics to conservation. *Emu-Austral Ornithology* 118:7–21.

- Pruett, C., & K. Winker. 2008. The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *Journal of Avian Biology* 39:252–256.
- Pruetz, J. D., & T. C. LaDuke. 2001. New field site: preliminary census of primates at El Zota Biological Field Station, Costa Rica. Nuevo sitio de campo: censo preliminar de los primates en la Estación Biológica de Campo El Zota. *Neotropical Primates* 9:22–23.
- Quintanilla, S., A. Gómez, C. Mariño-Ramírez, C. Sorzano, S. Bessudo, G. Soler, J. E. Bernal & S. Caballero. 2015. Conservation genetics of the scalloped hammerhead shark in the Pacific coast of Colombia. *Journal of Heredity* 106:448–458.
- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org/> (accessed 16 May 2016).
- Ralls, K., & J. D. Ballou. 2004. Genetic status and management of California condors. *The Condor* 106:215–228.
- Ramírez-Alán, O. A., C. Vaughan-Dickhaut, G. Herrera, & R. Guries. 2011. Dinámica de movimientos y ámbito de acción de dos especies de perezosos (*Choloepus hoffmanni* y *Bradypus variegatus*) en una plantación de cacao de Costa Rica. *Mesoamericana* 15:61–72.
- Raso, T. F., R. H. F. Teixeira, A. O. T. Carrasco, J. P. A. Júnior, & A. A. Pinto. 2013. *Chlamydophila psittaci* infections in hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) confiscated in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44:169–172.
- Reeves, P. A., C. L. Bowker, C. E. Fettig, L. R. Tembrock, & C. M. Richards. 2016. Effect of error and missing data on population structure inference using microsatellite data. *bioRxiv* 080630.
- Regnaut, S., F. S. Lucas, & L. Fumagalli. 2006. DNA degradation in avian faecal samples and feasibility of non-invasive genetic studies of threatened capercaillie populations. *Conservation Genetics* 7:449–453.

- Ripperger, S. P., M. Tschapka, E. K. Kalko, B., Rodriguez-Herrera, & F. Mayer. 2013. Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. *Conservation genetics* 14:925–934.
- Ritland, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetic Research Cambridge* 67:175–185.
- Rivera-Ortíz, F. A., S. Solórzano, M. D. C. Arizmendi, P. Dávila-Aranda, & K. Oyama. 2017. Genetic Diversity and Structure of the Military Macaw (*Ara militaris*) in Mexico: Implications for Conservation. *Tropical Conservation Science* 10:1–12.
- Robert, A. 2009. Captive breeding genetics and reintroduction success. *Biological Conservation* 142:2915–2922.
- Robertson, E. P., R. J. Fletcher, & J. D. Austin. 2018. Microsatellite polymorphism in the endangered snail kite reveals a panmictic, low diversity population. *Conservation Genetics* 19:337–348.
- Rodríguez-Clark, K. M., M. A. Oliveira-Miranda, M. Aguilera Meneses, Á. Martino, M. A. Méndez, C. Miyaki, M. G. Montiel-Villalobos, R. M. de Oliveira-Miranda, E. Poulin, D. Ruzzante, & Solé-Cava, A. 2015. Finding the “Conservation” in conservation genetics—progress in Latin America. *Journal of Heredity*, 106: 423–427.
- Rogers, A. R. 2014. How population growth affects linkage disequilibrium. *Genetics*, 197:1329–1341.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103–106.
- Sainudiin, R., R. T. Durrett, C. F. Aquadro, & R. Nielsen. 2004. Microsatellite mutation models: insights from a comparison of humans and chimpanzees. *Genetics* 168:383–395.
- Schmidt, F. 2009. The effect of site selection on the growth of *Dipteryx panamensis* in timber plantations in Costa Rica and Panama. Dissertation, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Schmidt, K. L. 2013. SPATIAL AND TEMPORAL PATTERNS OF GENETIC VARIATION IN SCARLET MACAWS (*ARA MACAO*): IMPLICATIONS FOR POPULATION

MANAGEMENT IN LA SELVA MAYA, CENTRAL AMERICA. Dissertation, Columbia University, New York, USA.

Schwartz, M. K., G. Luikart, & R. S. Waples. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in ecology & evolution* 22:25–33.

Segelbacher, G., S. A. Cushman, B. K. Epperson, M. J. Fortin, O. Francois, O. J. Hardy, R. Holderegger, P. Taberlet, L. P. Waits & S. Manel. 2010. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservation genetics* 11:375–385.

Selkoe, K. A. & R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9:615–629.

Senf, M. J. 2009. Interspecific and integroup interactions of mantled howling monkeys (*Alouatta palliata*) in primary versus secondary forest at El Zota Biological Field Station, Costa Rica. Iowa State University, Iowa, USA.

Shama, L. N. S., K. B. Kubow, J. Jokela & C. T. Robinson. 2011. Bottlenecks drive temporal and spatial genetic changes in alpine caddisfly metapopulations. *BMC Evolutionary Biology* 11:278.

Silva, H. E., F. T. Presti, A. P. Wasko, & D. Pinhal. 2015. Development of microsatellite markers for Hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) and their cross-amplification in other parrot species. *BMC research notes* 8:736.

Slatkin, M. 2008. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics* 9:477–485.

Smith, D. A., K. Ralls, A. Hurt, B. Adams, M. Parker, & J. E. Maldonado. 2006. Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Molecular Ecology* 15:387–406.

Steiner, C. C., A. S. Putnam, P. E. Hoeck, & O. A. Ryder. 2013. Conservation genomics of threatened animal species. *The Annual Review of Animal Biosciences* 1:261–281.

Stiles, F. G., & A. F. Skutch. 1989. *A Guide to the birds of Costa Rica*. Cornell University Press, New York, USA.

- Stockwell, C. A., A. P. Hendry, & M. T. Kinnison. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18:94–101.
- Stojanovic, D., G. Olah, M. Webb, R. Peakall, & R. Heinsohn. 2018. Genetic evidence confirms severe extinction risk for critically endangered swift parrots: implications for conservation management. *Animal Conservation* 1–11.
- Szulkin, M., N. Bierne, & P. David. 2010. Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. *Evolution* 64:1202–1217.
- Szulkin, M., P. Zelazowski, G. Nicholson, & B. C. Sheldon. 2009. Inbreeding avoidance under different null models of random mating in the great tit. *Journal of Animal Ecology* 78:778–788.
- Tallmon, D. A., G. Luikart, & R. S. Waples. 2004. The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution* 19:489–96.
- Taylor, A. 2011. Perfect 10. *PsittaScene* 23:4–9.
- Toft, C. A., & T. F. Wright. 2015. *Parrots of the wild: A natural history of the world's most captivating birds*. University of California Press, Oakland, California, USA.
- U.S. Fish and Wildlife Service [USFWS]. 2015. *Endangered and Threatened Wildlife and Plants; Two Foreign Macaw Species; Final Rule*. U.S. Fish and Wildlife Service, Falls Church, Virginia, USA.
- Valière, N. 2002. GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2:377–379.
- Van Oosterhout C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, & P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- Vaughan, C. 2011. Change in dense forest habitat for endangered wildlife species in Costa Rica from 1940 to 1977. *UNED Research Journal/Cuadernos de Investigación UNED* 3:99–161.
- Villate, R., L. Canet-Desanti, O. Chassot & G. Monge-Arias. 2009. *El Corredor Biológico San Juan-La Selva: una estrategia exitosa de conservación*. CATIE, San José, Costa Rica.

- Vonhof, M. J., H. Whitehead, & M. B. Fenton. 2004. Analysis of Spix's disc-winged bat association patterns and roosting home ranges reveal a novel social structure among bats. *Animal behaviour* 68:507–521.
- Waits, L. P., G. Luikart, & P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular ecology* 10:249–256.
- Walters, J. R., S. R. Derrickson, D. Michael Fry, S. M. Haig, J. M. Marzluff, & J. M. Wunderle. 2010. Status of the California Condor (*Gymnogyps californianus*) and efforts to achieve its recovery. *The Auk* 127:969–1001.
- Wang, J. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetic Research* 89:135–153.
- Wang, J. 2011. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular ecology resources* 11:141–145.
- Wang, J. 2017. Effects of sampling close relatives on some elementary population genetics analyses. *Molecular ecology resources* 18:41–54.
- Weir, B. S., & C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370.
- White, N. E., P. R. Mawson, R. Dawson, M. A. Bunce, & P. B. S. Spencer. 2009. Characterisation and cross-species utility of 20 microsatellite markers for population and forensic applications in the endangered Carnaby's Black-cockatoo, *Calyptorhynchus latirostris*. *Conservation Genetics Resources*, 1:341–345.
- Whitehouse, A. M., & E. H. Harley. 2001. Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular ecology*, 10:2139–2149.
- Willi, Y., J. Van Buskirk, & A. A. Hoffmann. 2006. Limits to the adaptive potential of small populations. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37:433–458.
- Williamson-Natesan, E. G. 2005. Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. *Conservation Genetics* 6:551–562.

- Woodruff, D. S. 2001. Populations, species, and conservation genetics. *Enciclopedia of biodiversity* 4:811–829.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323–353.
- Wright, T. F., A. M. Rodriguez, & R. C. Fleischer. 2005. Vocal dialects, sex-biased dispersal, and microsatellite population structure in the parrot *Amazona auropalliata*. *Molecular Ecology* 14:1197–1205.
- Wright, T. F., C. A. Toft, E. Enkerlin-Hoeflich, J. Gonzalez-Elizondo, M. Albornoz, A. Rodríguez-Ferraro, F. Rojas-Suárez, V. Sanz, A. Trujillo, S. R. Beissinger, V. Berovides, X. Gálvez, A. T. Brice, K. Joyner, J. Eberhard, J. Gilardi, S. E. Koenig, S. Stoleson, P. Martuscelli, J. M. Meyers, K. Renton, A. M. Rodríguez, A. C. Sosa-Asanza, F. J. Vilella, & J. W. Wiley. 2001. Nest poaching in Neotropical parrots. *Conservation Biology* 15:710–720.
- Zamora, N. A., & D. Solano. 2006. Una nueva especie de *Swartzia* (Leguminosae) de Costa Rica. *Lankesteriana* 6:133–138.

ANEXOS

Anexo A. Secuencias de los marcadores microsatélites probados en el presente estudio, obtenidos de Gebhardt & Waits (2008a).

Locus	Primers 5'-3'	Marcador fluorocromo
AgGT17	A AACTGCATGGGTTCAAGCTC R AGCTGGTTTTGTTCCGAAAG	NED
AgGT19	A GTCCTGCCTCCCAAAAAGA R CAACATTGACTCCTGGCAAA	VIC
AgGT21	A TTCAAAGGTGTCTGTATGCAATC R TCAGCCAGTTTCAGGCACTA	VIC
AgGT42	A GGCAGTCAGAAGCACCAT R TGGGGTAATGGAAGGAGTGA	VIC
AgGT90	A TCCACAATTCTACCGAAGTGG R ACATCACTCCCAACAGTCC	6-FAM
UnaCT21	A AAACGAGATGACCACCGAAA R TAACTCCCTCCAGCCAGCTT	6-FAM
UnaCT32	A CAGGAAGCACGGAAACAAAT R TGCTTTTGTGTCTGCTTTGG	VIC
UnaCT41	A ACGAACAGCTAACATAAAAATATTGC R CAGAAGCACATGATCTTCATCC	6-FAM
UnaCT43	A AGTGCAGAGGGGAATTCAGA R AAGTCAGTCAACGCTTCAACA	NED
UnaCT74	A TGCTGCTCTTAACATTTCTGA R GCAGAGTTGCATTTCTC	PET