



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Ecología



Diversidad y estructura genética de la Polla de Wetmore, *Rallus wetmorei*

(Zimmer y Phelps, 1944; Aves, Rallidae)

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela
por la Br. Adriana Carolina Rojas Barrios
como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

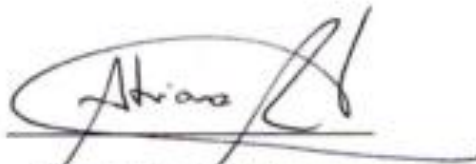
Tutor: Adriana Rodríguez-Ferraro
Asesor académico: Sandra Giner

Trabajo Especial de Grado titulado:

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POLLA DE WETMORE,
RALLUS WETMOREI (ZIMMER Y PHELPS, 1944; AVES, RALLIDAE)**

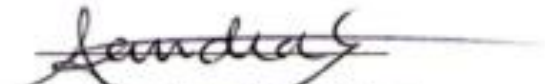
Presentado por la Br. Adriana C. Rojas B. ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

El mismo fue defendido públicamente el día 8 de mayo de 2015 y aprobado por los miembros del Jurado, designados por el Consejo de Escuela de Biología, quienes consideran que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por los reglamentos correspondientes.



Dra. Adriana Rodríguez-Ferraro

Tutor (USB)



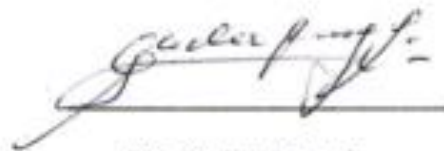
Dra. Sandra Giner

Asesora académica (UCV)



Dr. Jorge L. Pérez Emán

Jurado Principal (UCV)



Dra. Yadria Rangel

Jurado Principal (UCV)

1. Resumen

La Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*) es una especie endémica de Venezuela, y tiene una distribución restringida, características que han hecho que se la catalogue como En Peligro. La distribución de la Polla de Wetmore es disyunta, por lo que existe la posibilidad de que la especie esté constituida por poblaciones pequeñas y aisladas, restringidas a las distintas formaciones de mangle en la costa noroccidental del país. Para evaluar la diversidad y estructura genética de la Polla de Wetmore, empleamos muestras de 19 individuos de cuatro localidades a lo largo de su intervalo de distribución geográfica. Luego de amplificar y secuenciar un gen mitocondrial, la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa (ND2), y un gen nuclear, el intrón 5 de la alcohol deshidrogenasa I (ADH5), se identificaron 9 haplotipos para el gen ND2 y sólo uno para ADH5. La diversidad haplotípica obtenida para la especie con el gen mitocondrial fue de 0,819, mientras que la nucleotídica fue 0,0062. Los valores obtenidos de F_{st} y los resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) indican que no existe estructura genética y sugieren que existe flujo genético entre las poblaciones estudiadas. Adicionalmente, los resultados de la distribución de diferencias pareadas parecen indicar que el tamaño poblacional de la especie ha sido relativamente constante a lo largo del tiempo.

Palabras claves: *Rallus wetmorei*, diversidad genética, conservación, especies amenazadas.

2. Agradecimientos

Agradezco...

A mi familia, en especial a mi madre y abuela por todo el apoyo brindado durante toda la carrera y la realización de este proyecto.

A la profesora Adriana Rodríguez-Ferraro, por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto, por todo el conocimiento y experiencia brindada y por ser mi mejor acompañante en el campo.

A la profesora Aniuska Kazandjián, por permitirme usar su laboratorio, por confiarme su laboratorio durante su ausencia y por la compañía.

A la profesora Sandra Giner, por aceptar ser mi asesor académico, por la ayuda y colaboración.

A los profesores Yadira Rangel y Jorge Pérez, por las valiosas recomendaciones y comentarios en las diferentes etapas del proyecto.

A Miguel Lentino, por su ayuda y colaboración en el proyecto.

A Eugenia Sánchez y Andrea D'Amico, por el entrenamiento en el laboratorio, la paciencia, conocimiento, ayuda y apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A Esteban Agudo, Vilisa Morón, Luis Montilla, Jackson Mendoza, José Luis Moncada y Génesis Yanéz, por la compañía en el campo y por la paciencia para esperar y atrapar a la Polla.

Al Decanato de Investigación y Desarrollo de la USB y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación (FONACIT), por los fondos otorgados para la realización de este proyecto.

Al Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET), por permitirnos el alquiler de su camioneta para las salidas de campo

A FUDENA y Estación Biológica Quizandal, por recibarnos y brindarnos hospedaje, por la amabilidad y ayuda.

A mis amigos del Laboratorio de Ecología Experimental (LEE), por su apoyo en los momentos difíciles de la realización de este proyecto.

A Gustavo Silva, por estar siempre conmigo, en los buenos y malos momentos.

A todos mis amigos, quienes me han apoyado y estuvieron conmigo en los mejores y peores momentos del proceso de realización de este proyecto.

¡Muchas gracias!

3. Tabla de contenido

1. Resumen	iii
2. Agradecimientos	iv
3. Tabla de contenido	vi
4. Introducción	1
5. Antecedentes.....	5
5.1. Origen y características de la Familia Rallidae	5
5.2. Problemas de conservación en la Familia Rallidae	7
5.3. Estructura y diversidad genética en la Familia Rallidae	7
6. Justificación del Trabajo Especial de Grado	16
7. Objetivos.....	17
7.1. Objetivo general	17
7.2. Objetivos específicos	17
8. Materiales y métodos.....	17
8.1. Área de Estudio.....	17
8.2. Captura de individuos y colecta de muestras	19
8.3. Extracción, amplificación, purificación y secuenciación de ADN.....	23
8.4. Análisis de datos	26
8.4.1. Diversidad y estructura genética.....	26
8.4.2. Redes de haplotipos	28
8.4.3. Distribución de diferencias pareadas	28
9. Resultados.....	29
9.1. Salidas de campo.....	29
9.2. Diversidad Genética.....	30
9.3. Estructura Genética	31
9.4. Redes de haplotipos	32
10. Discusión	35
10.1. Implicaciones para la conservación.....	40
11. Conclusiones.....	44
12. Recomendaciones.	45
13. Referencias bibliográficas.	46
14. Apéndice A. Información de los individuos utilizados en los análisis del presente estudio.....	60

4. Introducción.

La genética de la conservación es una disciplina que emplea técnicas y teorías de la genética para generar información y desarrollar estrategias que permitan disminuir los riesgos de extinción de especies amenazadas, preservando, a largo plazo, las especies como entidades dinámicas que puedan enfrentar cambios que ocurran en el ambiente donde éstas habitan (Frankham y col., 2004; Wan y col., 2004). Esta disciplina se ha expandido tanto que actualmente las técnicas moleculares son usadas de forma frecuente para priorizar especies a ser protegidas, inferir sus relaciones históricas y responder preguntas acerca de la cantidad y distribución de la diversidad genética en poblaciones de especies amenazadas (Goldstein y col., 2000). Quizás, esta última, es la aplicación más importante de la genética de la conservación ya que permite identificar los patrones de diversidad genética y los procesos que la determinan en esas especies (DeSalle y Amato, 2004).

Uno de los objetivos principales de la genética de la conservación es entender la relación entre la diversidad genética y la viabilidad poblacional (Beebe y Rowe, 2008). La diversidad genética se refiere a toda la variación de alelos y genotipos que están presentes en un determinado grupo de organismos (Frankham y col., 2004), siendo ésta el componente más básico de la biodiversidad. La diversidad genética es de gran importancia ya que es necesaria para que pueda ocurrir la adaptación de los organismos en respuesta a cambios ambientales, de ahí que su conocimiento y comprensión sea de gran relevancia para la conservación (Reed y Frankham, 2003; Frankham, 2005).

La diversidad genética de una población puede verse afectada por múltiples factores, como: la deriva génica, cuellos de botella, selección natural, mutaciones, flujo genético y endogamia. La deriva génica modifica las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente, debido a los efectos del azar en la reproducción sexual; este proceso resulta en la fijación de los alelos más frecuentes y en la pérdida de los alelos menos frecuentes (Freeland y col., 2011). Los cuellos de botella son reducciones bruscas en el tamaño poblacional, lo que acelera el proceso de deriva génica, traduciéndose en pérdida de alelos (especialmente raros) y disminución de la diversidad genética (Frankham y col., 2004).

La selección natural es la reproducción diferencial de individuos de diferentes genotipos dentro de una población, y este proceso puede aumentar o disminuir la diversidad genética de una población, dependiendo del tipo de selección que actúe sobre la misma. La selección estabilizadora reduce la diversidad genética ya que favorece el genotipo promedio; por su parte, la selección direccional reduce la diversidad genética seleccionando en contra de aquellos alelos que disminuyen la aptitud del individuo portador o a favor de alelos que aumenten la aptitud del individuo portador. El tipo de selección que aumenta la diversidad genética es la selección disruptiva, ya que selecciona dos genotipos extremos y no los genotipos intermedios (Frankham y col., 2004; Freeland y col., 2011).

Otro factor que disminuye la diversidad genética de una población es la endogamia, que es la reproducción entre individuos emparentados, es decir, que están genéticamente relacionados. La endogamia resulta en la disminución de la heterocigosidad, la fijación de alelos y puede causar una reducción en la

sobrevivencia y el éxito reproductivo de las especies (Amos y Bamford, 2001; Frankham, 2005).

La mutación y el flujo genético son factores que pueden aumentar la diversidad genética. El flujo genético se refiere al movimiento de genes en mayor o menor grado de una población a otra y es un componente importante de la estructura poblacional, ya que evita la diferenciación genética entre poblaciones, debido al intercambio de genes (Eguiarte y col., 2007). Por otro lado, las mutaciones son errores en la replicación del ADN, errores que pueden ser de varios tipos: transiciones, que implican cambios entre purinas (A y G) o pirimidinas (C y T) y transversiones, en las que una purina se sustituye por una pirimidina o viceversa. Además, pueden ocurrir delecciones o inclusiones de nucleótidos, agregando así nuevos alelos y aumentando la diversidad genética (Freeland y col., 2011).

La evaluación de los patrones de diversidad genética de una especie ha sido, posiblemente, una de las mayores contribuciones de la genética de la conservación para la identificación de poblaciones viables, debido a que permite conocer el grado de diversidad genética y su distribución dentro y entre poblaciones de una especie. De esta forma, es posible identificar cuáles son las poblaciones con baja diversidad genética y si existe, o no, flujo genético entre diversas poblaciones. Esta información permite identificar las poblaciones que requieren de nuevos individuos para aumentar su nivel de diversidad genética y las poblaciones que pueden donar individuos a las poblaciones más vulnerables, estableciendo de esta forma las pautas para el manejo y la conservación de especies amenazadas (Haig, 1998; Donoso y col., 2004).

Varios estudios han demostrado que en especies amenazadas la diversidad genética generalmente es más baja en comparación con especies relacionadas que no sufren amenazas. Estas especies presentan una menor adaptabilidad debido a la poca diversidad genética y, por lo tanto, una limitada capacidad para responder a cambios ambientales (Spielman y col., 2004; DiBattista, 2008; Flight, 2010). Las principales razones que explican este patrón son que las especies amenazadas suelen tener tamaños poblacionales pequeños y, en muchos casos, presentan endogamia, lo que aumenta la probabilidad de que se acumulen genes deletéreos, se reduzca la sobrevivencia, se expresen efectos negativos sobre la reproducción y se disminuya la capacidad de responder a cambios ambientales. Por lo anterior, se ha planteado que especies con un tamaño poblacional pequeño, baja diversidad genética, flujo genético reducido o nulo y endogamia poseen un riesgo más alto de extinción (Frankham, 2005; Flight, 2010).

Adicionalmente, estudios enfocados en las características genéticas de poblaciones de especies amenazadas permiten también identificar Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs, por sus siglas en inglés), que son poblaciones que tienen un alto nivel de aislamiento reproductivo. Estas poblaciones representan un componente importante de la evolución de las especies, lo que permite un enfoque objetivo para priorizar las unidades de protección (Moritz, 1994; Fraser y Bernatchez, 2001; Palsbøll y col., 2007). Estas ESUs, debido a su alta distintividad (tanto genética como ecológica), ameritan ser manejadas como unidades separadas para fines de conservación (Fraser y Bernatchez, 2001).

Cuando existe bajo flujo genético entre poblaciones y la conectividad entre las mismas es reducida, se hace necesario el monitoreo y administración, por separado, de las áreas donde éstas se encuentran; a estas áreas se les conoce como Unidades de Manejo (Moritz, 1994), las cuales, generalmente, son poblaciones demográficamente independientes cuya dinámica poblacional no depende de la inmigración, sino de sus tasas de natalidad y mortalidad. Los estudios sobre diversidad genética permiten identificar unidades de manejo dentro de una especie y, por tanto, contribuir con la conservación de las poblaciones naturales (Palsbøll y col., 2007).

5. Antecedentes

5.1. Origen y características de la Familia Rallidae

La Familia Rallidae, perteneciente al Orden Gruiformes, se encuentra representada en la mayoría de los continentes, siendo una familia de aves con una de las distribuciones más amplias en el mundo (Slikas y col., 2002). Este patrón es el resultado de una diversificación que involucró episodios de expansión del intervalo de distribución y especiación regional (García-R. y col., 2014a). Los principales géneros de la Familia Rallidae (*Laterallus*, *Gallinula*, *Porzana*, *Fulica*, *Rallus*, *Gallicrex*, *Amaurionis*, *Coturnicops*, *Megacrex*, *Gallicrex*, *Gallirallus*, *Crex* y *Lewinia*) se originaron cerca del límite entre el Oligoceno y el Mioceno, hace aproximadamente 23 millones de años, mientras que la diversificación de la familia

ocurrió a una tasa constante, con un periodo de diversificación relativamente abrupto hace 40-30 millones de años (García-R. y col., 2014a). Esta diversificación fue posible debido a la alta capacidad de dispersión de algunas especies de la familia y al éxito en la explotación de nuevas oportunidades ecológicas (García-R. y col., 2014a). El género *Rallus* parece haberse originado durante el Mioceno tardío y haberse especializado y radiado en las Américas antes de invadir el Viejo Mundo (García-R. y col., 2014a; 2014b).

Las especies pertenecientes a la Familia Rallidae son aves que pueden medir entre 12 y 63 cm de largo y presentan patas posteriores fuertes, ya que son principalmente caminadoras (Olson, 1973; Livezey 1998). Los rálidos suelen ser aves con comportamiento discreto y tímido, con coloraciones crípticas y muy similares al color de la densa vegetación entre la que se mueven. Esto dificulta su observación y quizás sea el motivo de los pocos estudios enfocados en especies de esta familia (Taylor y van Perlo, 1998). Actualmente, la familia incluye 135-143 especies en todo el mundo, siendo la mayoría de hábitos omnívoros (Taylor y van Perlo, 1998; García-R. y col., 2014a). Sus hábitats principales son los manglares, pantanos de agua salada o dulceacuícola, bosques templados y tropicales (Livezey, 1998). No existe un claro dimorfismo sexual en esta familia; sin embargo, en algunas especies, los machos son ligeramente más grandes que las hembras (Taylor y van Perlo, 1998). La mayoría de las especies de rálidos son monógamas y muestran una territorialidad marcada la mayor parte del año (Taylor y van Perlo, 1998). Muchos de los rálidos son sedentarios, siendo algunas especies incapaces

de volar; sin embargo, algunos rálidos continentales presentan hábitos migratorios (Livezey, 1998).

5.2. Problemas de conservación en la Familia Rallidae

Las especies de la Familia Rallidae parecen tener cierta predisposición a la extinción, ya que el 23% de las especies de la familia se encuentra globalmente amenazado (Bennett y Owens, 1997). Desde el año 1600, se han extinto 20 especies de rálidos, siendo las principales causas de estas extinciones, la depredación e invasión del hábitat por especies exóticas, la cacería y la degradación del hábitat (Taylor y van Perlo, 1998). En la actualidad, a pesar de múltiples esfuerzos realizados para protegerlas, cinco especies de la Familia Rallidae se consideran En Peligro Crítico, 10 En Peligro y 18 Vulnerables (UICN, 2014). La mayoría de los autores reportan la pérdida y reducción del hábitat, la introducción de especies exóticas y otras consecuencias de la actividad humana (contaminación), como las principales amenazas para la sobrevivencia de las especies de rálidos (Ozaki y col., 2010; Miller y col., 2012; UICN, 2014).

5.3. Estructura y diversidad genética en la Familia Rallidae

Los estudios sobre estructura y diversidad genética en la Familia Rallidae son escasos. Sin embargo, a partir del año 1995 empezaron a realizarse investigaciones con el objetivo de evaluar los niveles de diversidad genética, así como la conectividad entre poblaciones de distintas especies de rálidos, principalmente aquellas consideradas amenazadas.

Fleischer y colaboradores (1995) emplearon minisatélites como marcadores moleculares para evaluar la estructura genética de *Rallus longirostris yumanensis* (n=9) y *Rallus longirostris levipes* (n=39), dos subespecies que se distribuyen al sur de California, Estados Unidos, y que se encuentran en peligro de extinción. Para *R. l. yumanensis*, estos autores encontraron un nivel de variación típico de poblaciones exogámicas (0,33 de proporción promedio de fragmentos compartidos), pero para *R. l. levipes* la variación encontrada era baja, obteniendo valores desde 0,63 a 0,77 en la proporción promedio de fragmentos compartidos. Al comparar los resultados obtenidos con los obtenidos posteriormente por Nusser y colaboradores (1996) usando RAPDs (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), encontraron que para este marcador la variación era extremadamente baja, ya que fueron usadas 16 bandas polimórficas para evaluar 48 individuos de las cinco poblaciones, encontrándose cinco loci polimórficos para ambas especies, seis para *R. l. levipes* y cinco para *R. l. yumanensis*. Por lo que Fleischer y colaboradores propusieron que dicha variación es el resultado de un cuello de botella ocurrido hace 1.000 años, tiempo suficiente para recuperar la variación en los minisatélites (altamente mutables) (Fleischer y col., 1995).

Más recientemente, se estimó la diversidad genética de *Gallirallus okinawae*, un ráldo endémico de la isla de Okinawa (Japón) y que está catalogada como En Peligro (UICN, 2014). Ozaki y colaboradores (2010) analizaron la región control del ADN mitocondrial de 177 individuos y encontraron sólo seis haplotipos con nucleótidos diferentes en seis sitios. La diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π) calculadas fueron de 0,4990 y 0,0017, respectivamente. La

diversidad haplotípica fue relativamente alta en comparación a otras aves amenazadas, pero la diversidad nucleotídica fue menor, por lo que los autores sugieren que la baja diversidad nucleotídica en la región control se debe a un cuello de botella reciente (Ozaki y col., 2010).

Girad y colaboradores (2010) determinaron el origen y la conectividad de una población de *Laterallus jamaicensis* que fue descubierta en 1994 en la Sierra Nevada de California, Estados Unidos. Ellos emplearon 19 loci de microsatélites y la región control del ADN mitocondrial para comparar la población descubierta recientemente (Sierra Nevada, $n=31$) con la población de San Francisco ($n=31$) y la población del Valle Imperial al sur de California ($n=6$). Estos autores encontraron que la población de San Francisco tenía 11 haplotipos de los cuales 6 eran haplotipos únicos, tenía una diversidad haplotípica (h) de 0,9100 y una diversidad nucleotídica (π) de 0,0051, mientras que la población de Sierra Nevada tenía 6 haplotipos, un solo haplotipo único, diversidad haplotípica (h) de 0,5300 y diversidad nucleotídica (π) con un valor de 0,0026. Ellos aseguran que existe un fuerte aislamiento entre las poblaciones de *Laterallus jamaicensis*; sin embargo, los autores sugieren la existencia de movimientos migratorios entre las poblaciones de Sierra Nevada y San Francisco. Con base en sus resultados a la aproximación la inferencia bayesiana, ellos sugieren el flujo de genes de la población de Sierra Nevada a la población de San Francisco ($0,11 \pm 0,04$) fue cinco veces mayor que en la dirección opuesta ($0,02 \pm 0,02$). Con base en estos resultados, los autores proponen tres posibles orígenes para la población de la Sierra Nevada: a) ésta podría haberse originado a partir de individuos

colonizadores de la población de San Francisco, b) ambas poblaciones podrían ser vestigios de una población que anteriormente estuvo ampliamente distribuida, o c) ambas poblaciones fueron colonizadas por individuos pertenecientes a una tercera población, que actualmente está extinta (Girad y col., 2010).

En el 2011, Grueber y Jamieson emplearon microsatélites para evaluar los patrones temporales de diversidad genética de *Porphyrio hochstetteri* antes, durante y posterior al re-descubrimiento de la especie en Fiordland–Nueva Zelanda. En ese estudio incluyeron 3 muestras de museo colectadas antes del re-descubrimiento, 3 muestras que fueron colectadas durante el re-descubrimiento y 20 muestras actuales. Ellos encontraron que cinco loci fueron polimórficos entre las muestras antes del re-descubrimiento, tres en las colectadas en el re-descubrimiento y cinco en las muestras recientes, sugiriendo una diversidad genética para la especie similar entre los tres períodos de tiempo, pero baja.

Posteriormente, Miller y colaboradores (2012) emplearon secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) y seis loci de microsatélites para caracterizar la estructura genética y los patrones de diversidad de *Coturnicops noveboracensis* en seis localidades en Norte América, incluyendo el sur de Oregón, donde se encuentra una población aislada. Los resultados de los análisis con ADN mitocondrial indicaron que existe una diferenciación poblacional significativa, pero al realizar una comparación pareada de las localidades no identificaron tendencias geográficas claras. Por su parte, los microsatélites sugirieron una estructura genética sutil, diferenciando a Oregón de las otras cinco localidades muestreadas. Además, la población de Oregón presentó menor diversidad genética ($h = 0,3360$;

$\pi = 0,0009$) y parece haber pasado por un cuello de botella reciente, posiblemente debido a la reducción de su hábitat a consecuencia de la pérdida de humedales causada por expansión urbana e incendios (Miller y col., 2012).

Recientemente, Stermin y colaboradores (2014) utilizaron la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) del ADN mitocondrial para evaluar la diversidad y estructura genética de *Rallus aquaticus* en poblaciones de 11 países de Europa (Rumanía, España, Alemania, Montenegro, Rusia, Siberia, Kazajstán, Letonia, Suecia, Noruega y Países Bajos). En una muestra de 75 individuos, encontraron 12 haplotipos, de los cuales sólo uno era común y compartido entre todas las poblaciones, exceptuando Noruega, mientras que los demás haplotipos variaban en una o dos posiciones. Para las estimaciones de diferenciación de la población, todas las muestras provenientes del noroeste de Europa (4 haplotipos, $h = 0,4040$) se agruparon y se compararon con las muestras procedentes de Rumanía (3 haplotipos, $h = 0,2270$), Siberia (2 haplotipos, $h = 0,1180$) y Kazajstán (3 haplotipos, $h = 0,8300$). Los autores sugieren que la mayor diversidad haplotípica en Kazajstán se debe a una diversificación constante durante un tiempo prolongado de tiempo en esa localidad en comparación con las demás regiones (Stermin y col., 2014). De los haplotipos raros, sólo uno estuvo compartido entre Rumanía y Kazajstán, por lo que proponen que en el pasado reciente se ha restringido el flujo genético entre Kazajstán y las otras localidades.

5.4. Rallidae en Venezuela.

De los 35 géneros de la Familia Rallidae, 12 se encuentran en Venezuela, (*Anurolimnas*, *Amaurolimnas*, *Aramides*, *Micropygia*, *Laterallus*, *Porzana*, *Rallus*,

Porphyrio, *Pardirallus*, *Gallinula*, *Fulica* y *Neocrex*), incluyendo 23 especies (Restall y col., 2007). De estas 23 especies, dos se consideran amenazadas, *Laterallus levraudi* y *Rallus wetmorei*, estando ambas clasificadas como En Peligro, tanto a nivel nacional (Rodríguez y Rojas-Suárez, 2008) como global (UICN, 2014).

5.5. La Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*)

John T. Zimmer y William H. Phelps describieron en 1944 una nueva especie de *Rallus* en Venezuela, la Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*), a partir de un ejemplar colectado en La Ciénaga, estado Aragua (Zimmer y Phelps, 1944). La Polla de Wetmore es un ave de unos 24- 27 cm de longitud, predominantemente marrón, que presenta dos morfos, uno claro y otro oscuro (Hilty, 2003). El morfo claro posee el dorso marrón cuyas plumas poseen márgenes amarillentos, los flancos son de color amarillento ahumado y el abdomen de color pardo (Fig. 1), mientras que el morfo oscuro presenta el dorso marrón oscuro y los flancos de color marrón ahumado (Fig. 2) (Hilty, 2003; Restall y col., 2007).



Figura 1. Polla de Wetmore, individuo morfo claro.



Figura 2. Polla de Wetmore, individuo morfo oscuro.

La Polla de Wetmore no presenta dimorfismo sexual con respecto al patrón de coloración pero posee dimorfismo sexual con respecto al tamaño, siendo los machos más grandes que las hembras (Sánchez, 2013). La Polla de Wetmore es endémica de Venezuela, y su distribución se encuentra restringida a bosques de manglar de la costa noroccidental del país (Hilty, 2003), e incluye los estados Falcón, Carabobo y Aragua (Restall y col., 2007). Históricamente, la Polla de Wetmore se ha reportado en pocas localidades (Tabla 1.

Tabla 1. Primeros registros de la Polla de Wetmore, en orden cronológico para las diferentes localidades donde se conoce su presencia.

Localidad	Coordenadas	Primer registro
La Ciénaga	10°28'N, 67°49'O	1943
Borburata	10°27'N, 67°57'O	1944
Patanemo	10°28'N, 67°55'O	1945
Puerto Cabello	10°28'N, 68°01'O	1945
Tucacas	10°48'N, 68°19'O	1950

P. N. Morrocoy	10°50'N, 68°18'O	2000
Chichiriviche	10°55'N, 68°20'O	1988
R.F.S. Cuare	10°55'N, 68°22'O	1972

Recientemente, Rodríguez-Ferraro y colaboradores (en revisión) confirmaron la presencia de la Polla de Wetmore en seis localidades en las que históricamente se había registrado: La Ciénaga (Edo. Aragua), Patanemo (Edo. Carabobo), Tucacas, Chichiriviche, Refugio de Fauna Silvestre de Cuare y en el Parque Nacional Morrocoy (Edo. Falcón) (Figura 3).

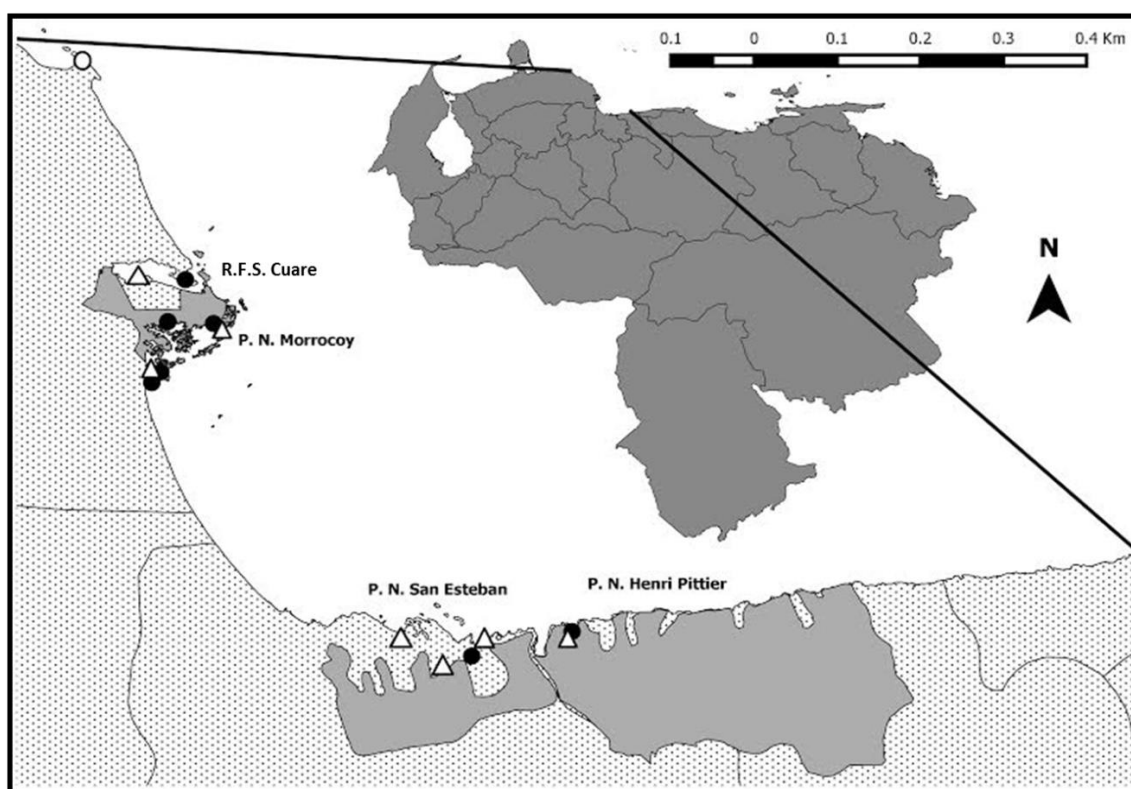


Figura 3. Distribución geográfica de la Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*). Triángulos blancos: localidades históricas, círculos negros: localidades con presencia confirmada

entre 2010-2015, círculo blanco: localidad visitada sin registro de presencia (Figura tomada de Rodríguez- Ferraro y colaboradores, en revisión).

Se conoce poco acerca de la biología de la especie; sin embargo, se sabe que es sedentaria de los manglares costeros y lagunas salobres inundadas estacionalmente (BirdLife International, 2013). En cuanto al período reproductivo, el registro de posibles juveniles en el mes de septiembre sugiere que éste comienza en abril o mayo (Collar y col., 1992). En el Parque Nacional Morrocoy fueron reportados nidos y evidencia de eclosión de huevos, a finales de mayo del 2012 (Rodríguez-Ferraro y col., 2012), lo que parece confirmar que abril-mayo es la etapa reproductiva de la especie. Sin embargo, en julio de 2013 se observó un nido con 5 huevos en Patanemo, y en junio del 2014 se observaron dos nidos, con 4 huevos cada uno, en el R. F. S. Cuare (ambas observaciones en salidas de campo de este proyecto) por lo que es necesario evaluar si existen dos picos reproductivos o una temporada de reproducción larga. Adicionalmente, se observó a una pareja copulando en Tucacas, en el mes de febrero del 2015.

Los registros históricos indican que la especie no fue registrada por más de dos décadas en la mayoría de las localidades y se ha observado una disminución en el número de individuos colectados en museos. Esta información ha sido usada como evidencia de una posible disminución en las poblaciones de la Polla de Wetmore, lo cual junto con su distribución restringida y la existencia de poblaciones disyuntas, ha hecho que se le clasifique como una especie En Peligro (Collar y col., 1992; Rodríguez y Rojas-Suárez, 2008; UICN, 2014). Entre las posibles amenazas para esta especie se encuentran la expansión de desarrollos

turísticos y de la industria petrolera en su área de distribución, así como la extensión de los poblados en las zonas costeras, que han alterado y reducido la extensión de los bosques de manglar (Collar y col., 1992; Rodríguez y Rojas-Suárez, 2008; UICN, 2014).

6. Justificación del Trabajo Especial de Grado

La Polla de Wetmore es un ave endémica y de distribución restringida, características determinantes para su clasificación como especie En Peligro (Rodríguez y Rojas-Suárez, 2008; UICN 2014). Sin embargo, se desconocen por completo los niveles de estructura y diversidad genética de las poblaciones remanentes. Dado que la distribución de la Polla de Wetmore es disyunta, existe la posibilidad de que la especie esté constituida por poblaciones pequeñas y aisladas restringidas a las distintas formaciones de mangle en la costa noroccidental del país. Poblaciones con estas características pueden ser susceptibles a la pérdida de diversidad genética por deriva génica (Hedrick y Miller, 1992; Whitlock, 2000). Debido a la relación directa que existe entre la cantidad de diversidad genética de una población y la respuesta adaptativa de ésta ante cambios ambientales, es importante determinar los patrones de diversidad genética de la Polla de Wetmore para poder evaluar la probabilidad de persistencia de la especie a largo plazo.

Evaluar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Rallus wetmorei* permitirá conocer los niveles de variabilidad en cada una de las poblaciones, así como a nivel de especie, determinar si existe conectividad entre las poblaciones, e identificar aquellas poblaciones aisladas y más vulnerables,

para así poder proponer estrategias de conservación y manejo que disminuyan su riesgo de extinción.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Evaluar la diversidad y estructura genética de la Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*) a lo largo de su intervalo de distribución geográfica en la costa de Venezuela.

7.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la variabilidad genética de la Polla de Wetmore, mediante el análisis de un gen mitocondrial y de un gen nuclear.
- Determinar si existe estructura genética entre las poblaciones existentes de la Polla de Wetmore.
- Examinar la variación espacial de la diversidad genética en esta especie mediante análisis filogeográficos.
- Evaluar si existe una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre las poblaciones de la Polla de Wetmore.

8. Materiales y métodos

8.1. Área de Estudio

El área de estudio está comprendida por cuatro localidades, ubicadas dentro de dos Parques Nacionales y un Refugio de Fauna Silvestre.

Parque Nacional Morrocoy: se encuentra ubicado en la costa centro-occidental de Venezuela en el estado Falcón, posee un área de 320 Km², una temperatura promedio anual de 27,2°C y una precipitación promedio anual de 1213 mm (Bone y col., 2001; Rosell, 2011). Los ecosistemas están dominados por bosques de manglar, seguidos por arrecifes coralinos, praderas de fanerógamas marinas y bosque deciduos. La vegetación del parque es variada; sin embargo, el manglar es dominante, siendo el mangle rojo (*Rhizophora mangle*) el mejor representado con un 68% de la cobertura, seguido por el mangle negro (*Avicennia germinans*) con un 24% y el mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) con un 8 a 10% (Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, 2006). Dentro del Parque Nacional Morrocoy se encuentran dos localidades de muestreo: la zona comprendida entre Caño León y el poblado de Agua Salobre (10°51'33.0" N, 68°19'21.0" O), y el sector de Punta Brava en Tucacas (10°47'52.0" N, 68°18'19.4" O). Los principales problemas de conservación que presenta el parque son la tala del bosque de mangle, explotación ilegal de recursos marinos, la construcción de complejos turísticos que drenan las aguas negras dentro del parque y la excesiva actividad turística (Lentino y Esclasans, 2005).

Parque Nacional San Esteban: se encuentra en la región central de la Cordillera de la Costa, en el estado Carabobo, posee un área de 435 Km², una temperatura máxima de 28,0°C y una precipitación máxima anual de 1800 mm (Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, 2006). La vegetación se caracteriza por bosques tropófilos, arbustales xerófilos y manglares (Lentino y Esclasans, 2005). La localidad de muestreo dentro de este parque nacional es

Patanemo (10°27'14.4" N, 67° 55'1.2" O). La principal amenaza del sector son los proyectos de desarrollo en la zona y la comercialización ilegal de productos vegetales (Lentino y Esclasans, 2005).

Refugio de Fauna Silvestre de Cuare: se encuentra ubicado en la costa oriental del estado Falcón (10 ° 54' 40.2" N, 68°16'35.4" O), tiene una superficie de 118,5 Km², posee una temperatura promedio anual que oscila entre 25,0°C y 27,0°C, la precipitación promedio anual varía entre 1000 mm y 1100 mm (Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, 2006). El Refugio de Fauna Silvestre presenta bosques de manglar en el golfete de Cuare, las albuferas y los cayos, donde se observan las especies *Rhizophora mangle*, *Avicennia nigricans* y *Laguncularia racemosa* (Lentino y Esclasans, 2005). El área presenta diversos problemas de conservación, siendo de especial importancia la contaminación del agua por mercurio, debido a la industria petroquímica, y el mal manejo de aguas servidas que desembocan en el Refugio (Lentino y Esclasans, 2005).

8.2. Captura de individuos y colecta de muestras

Se realizaron nueve (9) salidas de campo, entre marzo 2013 y febrero 2015 (Tabla 2) visitando las localidades donde la presencia de *Rallus wetmorei* había sido reportada durante los últimos años. Las localidades visitadas fueron:

1. Patanemo, Parque Nacional San Esteban, estado Carabobo.
2. Sector Punta Brava-Tucacas, Parque Nacional Morrocoy, estado Falcón.
3. Sector Caño León-Agua Salobre, Parque Nacional Morrocoy, estado Falcón.
4. Refugio de Fauna Silvestre de Cuare, estado Falcón.

Tabla 2. Localidades visitadas en salidas de campo realizadas durante el proyecto de T.E.G. Se incluye la fecha de cada muestreo.

Salidas	Localidad	Fecha
1	Caño León-Agua Salobre	Marzo 2013
2	Patanemo	Julio 2013
3	Tucacas-Punta Brava	Febrero 2014
4	Cuare	Junio 2014
5	Cuare	Diciembre 2014
6	Patanemo	Enero 2015
7	Tucacas-Punta Brava	Enero 2015
8	R.F.S. Cuare	Enero 2015
9	Tucacas-Punta Brava	Febrero 2015

Para las capturas se emplearon redes de neblina de 12 m de largo, 2,5 m de alto y 61 mm de apertura. Las redes fueron colocadas en senderos o caminos dentro del bosque de manglar (Fig. 4), en aquellos sitios donde previamente se observaron individuos de la Polla de Wetmore o donde se obtuvo respuesta a las vocalizaciones reproducidas mediante “playback”. Las vocalizaciones utilizadas fueron tomadas de Boesman (2006) y se reprodujeron con un mp3 (iPod®, Apple, Inc., Cupertino, California) conectado a un mini amplificador (Mini Amplifier Speaker®, RadioShack Corporation, Fort Worth, Texas).



Figura 4. Redes de neblina en el sendero o camino del bosque de manglar.

De cada individuo capturado se colectó una muestra de sangre (Fig. 5) y dos plumas rectrices, siguiendo los protocolos sugeridos por Gaunt y Oring (1997). Adicionalmente, a cada individuo capturado se le colocó un anillo de aluminio numerado para evitar colectar más de una muestra del mismo individuo. Además de los individuos capturados, se contaba con 3 muestras que fueron colectadas por Sánchez (2013) provenientes del sector Caño León en el P. N. Morrocoy y una muestra de tejido obtenida de la Colección Ornitológica Phelps (COP), proveniente de Patanemo, P. N. San Esteban. En aquellas salidas de campo donde se

encontraron nidos (Patanemo y Cuare), se colectó un huevo de cada nido encontrado.



Figura 5. Colecta de la muestra de sangre de la Polla de Wetmore

Las capturas se realizaron en conformidad con los siguientes permisos otorgados a Adriana Rodríguez-Ferraro (tutora) en calidad de investigadora responsable del proyecto “Estatus y conservación de la Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*): integrando técnicas ecológicas y moleculares para ampliar el conocimiento y la conservación de una especie amenazada”:

- Contrato de Acceso a Recursos Genéticos, obtenido al incorporar el proyecto dentro del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos de la Universidad Simón Bolívar ante el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente,

- Licencia de Caza con Fines Científicos, otorgada por la Oficina Nacional de Diversidad Biológica del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente,
- Autorización para realizar investigación dentro de los Parques Nacionales Henri Pittier, San Esteban y Morrocoy, otorgada por el Instituto Nacional de Parques (INPARQUES) y
- Autorización para realizar actividad de investigación en el Refugio de Fauna Silvestre Cuare, otorgada por la Oficina Nacional de Diversidad Biológica del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente.

8.3. Extracción, amplificación, purificación y secuenciación de ADN

El trabajo de laboratorio, desde la extracción de ADN hasta la purificación de productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se realizó en el Laboratorio de Sistemática Molecular de la Universidad Simón Bolívar, a cargo de la profesora Aniuska Kazandjian.

A partir de las muestras de sangre y plumas colectadas en el campo, se realizó la extracción de ADN con el kit comercial de extracción QIAGEN DNeasy® Blood and Tissue Kit, siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante (Qiagen 2003). Para comprobar si las extracciones habían sido exitosas, se tomaron 3 µl de cada muestra de ADN y 2 µl de buffer de carga 6X (glicerol 5%, azul de bromofenol 0,04% y xilencianol 0,04%) y se corrieron en un gel de agarosa al 1% (1 g agarosa/100 ml Buffer TAE 1 X). El gel contenía, además, la tintura fluorescente para ADN SYBR® Safe con una concentración de 0,5X. La corrida se

llevó a cabo por 10 min a 100V en una cámara de electroforesis horizontal de Labnet, modelo Gel XL Ultra v-2, utilizando Buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) como buffer de corrida. Los geles fueron revelados utilizando un transiluminador UV, de UVP, a 302 nm y fotodocumentados con el sistema BioDoc-It™.

Posteriormente, el ADN extraído se utilizó para amplificar dos genes mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystems, modelo 2720. El primer gen amplificado, el cual forma parte del genoma mitocondrial, fue la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa (ND2, 1041 pb). ND2 es el tercer gen más variable luego de ATPasa 8 y ND6; sin embargo, estos dos genes aunque son altamente variables resultan más complicados de amplificar y secuenciar, por el contrario ND2 puede ser secuenciado en dos partes simplificando así la amplificación, además de ser un gen de mayor longitud (Sorenson, 2003). El segundo gen amplificado, que forma parte del genoma nuclear, fue el intrón 5 de la alcohol deshidrogenasa I (ADH5, 752 pb), el cual ha sido empleado anteriormente de forma exitosa en estudios previos con especies de la familia Rallidae (Fain y col., 2007; Tavares y col. 2010).

La amplificación de ambos genes se realizó en dos partes (dos reacciones por gen), siguiendo las recomendaciones de Fain y colaboradores (2007) para ADH5 y de Sorenson y colaboradores (1999) para ND2. Los cebadores empleados fueron previamente diseñados y han sido empleados exitosamente en aves (Tabla 3). Para la amplificación de ADH5 se empleó el perfil sugerido por Tavares y

colaboradores (2010), el cual consta de: un paso de desnaturalización de 94°C por 3 minutos, seguido de 15 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65-55°C (decreciendo 1°C por ciclo) por 35 segundos y 72°C por 1 minuto, seguido de 26 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 35 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 2 minutos. Por otra parte, la amplificación del gen ND2 se realizó empleando el perfil sugerido por Cadena y colaboradores (2007), el cual consta de una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, finalizando con una extensión de 72°C por 10 minutos.

Tabla 3. Cebadores empleados en la amplificación de los genes ADH5 y ND2.

Gen	Cebador	Secuencia	Reacción	Referencia
ADH5	ADH5F	5'-TCTGTTGTCATGGGCTGCAAG-3'	Reacción A	Fain y col. (2007)
	ADH6R	5'-TCCAAAGACGGACCCTTTCCAG-3'		
	ADH5F2	5'-TGCCAAGGCCAARGAGCTGGG-3'	Reacción B	
	ADH6R2	5'-GGTCAAAAGTGATCTTYTGTGCTGC-3'		
ND2	L5216	5'-GGCCCATACCCCGRAATTG-3'	Reacción C	Sorenson y col. (1999)
	H5766	5'-RGAKGAGAARGCYAGGATYTTKCG-3'		
	H6313	5'-ACTCTTRTTTAAGGCTTTGAAGGC-3'	Reacción D	
	L5758	5'-GGNGGNTGAATRGGNYTNAAYCARA-3'		

Para comprobar si las PCR habían sido exitosas, se tomaron 3 µl de cada producto de PCR y 2 µl de buffer de carga 6X (glicerol 5%, azul de bromofenol 0,04% y xilencianol 0,04%) y se realizó una electroforesis siguiendo el mismo protocolo descrito previamente para comprobar el éxito de las extracciones. Los productos de las PCR fueron purificados utilizando el kit comercial de purificación QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, California) siguiendo el

protocolo indicado por el fabricante (Qiagen, 2006). Posteriormente, los productos ya purificados se enviaron a MacroGen® (Corea) para la secuenciación donde emplearon un secuenciador automático Applied Biosystems 3730XL.

Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron revisadas visualmente y fueron editadas usando el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall 1999). Las secuencias editadas fueron ensambladas usando el programa Geneious® 6.1.7 (Biomatters Limited 2005). Para ello, se empleó un mapa de referencia. Para el gen ND2 se utilizó como mapa una secuencia de *Gallus gallus* (No. de acceso: JQ970530.1) y para el gen ADH5 una secuencia de *Rallus longirostris* (No. de acceso: DQ485885.1). Ambas secuencias fueron tomadas de GenBank®. Todas las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal X versión 2.1 (Larkin y col., 2007).

8.4. Análisis de datos

8.4.1. Diversidad y estructura genética

Para cada uno de los genes, una vez obtenida la matriz con todas las secuencias, se determinaron cuatro estimadores de diversidad genética, utilizando el programa DnaSP 5.10 (Librado y Rozas, 2009):

1) Diversidad Haplotípica (h), que representa la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes entre ellos (Freeland y col., 2011). En una población con panmixia, es decir, con apareamiento al azar, h es equivalente

a la heterocigosidad esperada (frecuencia de heterócigos en una población que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg).

2) Diversidad Nucleotídica (π), que es el número estimado de nucleótidos diferentes entre pares de secuencias y proporciona una medida de divergencia entre secuencias (Freeland y col., 2011).

3) Número de Sitios Polimórficos (S), que representa el número total de mutaciones en la muestra (Misawa y Tajima, 1997)

4) Número de Diferencias Pareadas (k) que representa el número de diferencias entre un par particular de secuencias (Wakeley, 1996).

Además de estimar la diversidad genética, se determinó el índice F_{st} que permite evaluar la diferenciación genética entre subpoblaciones (Freeland y col., 2011). El F_{st} es una medida del grado de consanguinidad dentro de una subpoblación, en relación con el total de población, y refleja la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en una subpoblación sean idénticos por descendencia (Nei, 1987; Freeland y col., 2011).

Adicionalmente, para evaluar la presencia de estructura genética entre las poblaciones de la Polla de Wetmore, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA, Excoffier y col., 1992). El AMOVA consiste en un análisis jerárquico de varianza, que se aplica a los haplotipos, utilizando una matriz con distancias euclidianas al cuadrado. El análisis permite estimar la estructura total de las poblaciones, debido a que calcula la variación genética entre los individuos, dentro de las poblaciones y entre las poblaciones (Excoffier y col., 1992).

Finalmente, se propuso realizar una prueba de Mantel (Mantel, 1967), con la finalidad de determinar la existencia de una correlación entre las distancias genéticas de las poblaciones de la Polla de Wetmore y las distancias geográficas que las separan. La prueba postula que las distancias o similitudes entre las variables de la matriz respuesta (en este caso las distancias genéticas), no están linealmente correlacionados con las variables en la matriz modelo (las distancias geográficas), por lo que evalúa si la asociación es más fuerte de lo que sería esperado por azar (López y Olano, 2006).

Todos los análisis de estructura genética se realizaron empleando el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

8.4.2. Redes de haplotipos

Cuando las distancias genéticas que separan a los individuos son muy pequeñas, se emplean redes de haplotipos para expresar vías evolutivas potenciales alternativas a la simple bifurcación de ramas (Bandelt y col., 1999).

Las redes de haplotipos se construyeron empleando el programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Limited, 2012) mediante el algoritmo Median-Joining. Este algoritmo identifica grupos de haplotipos relacionados y construye una red a partir de esta relación Bandelt y col., 1999).

8.4.3. Distribución de diferencias apareadas

Se realizó la estimación de cambios históricos en el tamaño poblacional de la Polla de Wetmore, a través de la distribución de diferencias apareadas (*Mismatch*

Distribution, en inglés). Esta prueba evalúa si la distribución observada de S o k en la población de estudio es estadísticamente diferente de la esperada bajo la hipótesis de crecimiento poblacional (Vázquez-Domínguez y col., 2009). Adicionalmente, se estimó el Índice de Irregularidad (r , Harpending 1994) y el estadístico R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). El r indica la uniformidad de la distribución observada; los valores altos indican poblaciones demográficamente estables, mientras que valores bajos son esperados para poblaciones en las que ha ocurrido expansión demográfica (Harpending, 1994). El estadístico R_2 se basa en la distribución de frecuencias de los sitios segregantes de un locus y permite distinguir entre crecimiento poblacional y tamaño poblacional constante a causa de que la expansión poblacional genera un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía; valores bajos de R_2 son consistentes con un escenario de expansión demográfica (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). El análisis de distribución de diferencias pareadas, la prueba de bondad de ajuste y la estimación de los estadísticos se realizaron empleando el programa Arlequin versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

9. Resultados

9.1. Salidas de campo

Se capturaron 15 individuos (Tabla 4, Apéndice A). Para el gen ND2, se emplearon secuencias de 963 pb, mientras que para el gen ADH5, se emplearon secuencias de 581 pb. Las muestras de huevo colectadas no fueron incluidas en

el estudio, debido a que no se logró extraer y amplificar el ADN. Únicamente se incluyó una muestra de un huevo de R.F.S. Cuare que tenía un embrión, de donde se pudo extraer ADN a partir de tejido.

Tabla 4. Número de muestras por localidad incluidas en los análisis

Localidad	Nº de muestras colectadas en el presente estudio	Nº muestras obtenidas de estudios previos
Tucacas- Punta Brava	1	0
R.F.S. Cuare	6	0
Patanemo	5	1
Caño León- Agua Salobre	3	3

9.2 Diversidad Genética

Todas las poblaciones de la Polla de Wetmore presentaron una diversidad haplotípica relativamente alta, con la mayor diversidad haplotípica encontrada en Cuare y la menor en Morrocoy. Se identificaron 9 haplotipos, observándose la mayor diversidad en Cuare con 5 haplotipos y una menor diversidad en la localidad de Morrocoy, con solo 2 haplotipos. La diversidad nucleotídica fue más alta en la población de Patanemo y menor en Morrocoy, similar resultado al encontrado para el número de sitios polimórficos (S) y el promedio de diferencias pareadas (k) (Tabla 5).

Tabla 5. Estimadores de diversidad genética para el gen mitocondrial ND2.

Población	n	Haplotipos	Diversidad haplotípica (h) $\pm \sigma$	Diversidad nucleotídica (π)	Número de sitios polimórficos (S)	Número promedio de diferencias pareadas (k)
Cuare	6	5	0,9330 $\pm$ 0,1220	0,0177 $\pm$ 0,0035	32	14,4000
Morrocoy	6	2	0,6000 $\pm$ 0,2150	0,0077 $\pm$ 0,0047	19	6,3330
Patanemo	6	4	0,8000 $\pm$ 0,1720	0,0233 $\pm$ 0,0074	39	16,6670
Tucacas	1	1	1	0	0	0
Total	19	9	0,8190 $\pm$ 0,0820	0,0062 $\pm$ 0,0013	16	4,2160

Para en el gen ADH5 se encontró un único haplotipo, en todas las muestras por lo que no se realizaron los análisis de diversidad genética para el gen nuclear.

9.3 Estructura Genética

Los valores de F_{st} obtenidos fueron muy bajos y no significativos (Tabla 6), lo cual indica que no existe diferenciación genética entre las poblaciones de la Polla de Wetmore; sin embargo, la mayor diferencia se encuentra entre las poblaciones de Tucacas y Morrocoy.

Tabla 6. Valores pareados de F_{st} entre las poblaciones de Polla de Wetmore estudiadas (diagonal inferior) y valores de significancia (diagonal superior). Los valores representados como números negativos no se diferencian estadísticamente de cero

	Cuare	Morrocoy	Patanemo	Tucacas
Cuare		0,26126 $\pm$ 0,0497	0,51351 $\pm$ 0,0490	0,99099 $\pm$ 0,0030
Morrocoy	0,03404		0,37838 $\pm$ 0,0727	0,99099 $\pm$ 0,0030
Patanemo	-0,02500	0,01860		0,99099 $\pm$ 0,0030
Tucacas	-0,274707	0,04348	-0,52195	

Los resultados del Análisis de Varianza Molecular coinciden con los valores de F_{st} y también indican la ausencia de estructura genética entre las cuatro poblaciones estudiadas de la Polla de Wetmore. En el análisis se comparó la distribución de la variación molecular dentro y entre las cuatro poblaciones, encontrándose que el 100% de ésta se encuentra dentro de las poblaciones y no entre poblaciones ($\Phi = -0.02917$, $P = 0.57967$) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para la comparación de la variación molecular dentro y entre las poblaciones de la Polla de Wetmore.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componente de variación	Porcentaje de variación	g.l.
Entre poblaciones	11,167	-0,12063	-2,92	3
Dentro de poblaciones	63,833	4,25556	102,92	15

Debido a la ausencia de la estructura genética entre las poblaciones de la Polla de Wetmore, no se realizó la prueba de Mantel, ya que ésta determina la existencia de una correlación entre las distancias genéticas de las poblaciones y las distancias geográficas que las separan.

9.4 Redes de haplotipos

Para el gen mitocondrial ND2 se identificaron 9 haplotipos, entre los cuales se encontraron 6 haplotipos únicos y 3 haplotipos compartidos entre dos poblaciones cada uno (Fig. 5). El haplotipo más común, H6, se encontró en 8 de los 19 individuos analizados pertenecientes a dos poblaciones (5 de Morrocoy y 3 de Patanemo). Con respecto a los otros haplotipos compartidos, el haplotipo 1 se encontró en Cuare y Morrocoy y el haplotipo 4 en Patanemo y Tucacas. Cuatro de los haplotipos únicos (H2, H3, H5 y H8) pertenecen a la población de Cuare y los otros dos (H7 y H9) se encontraron sólo en Patanemo. .

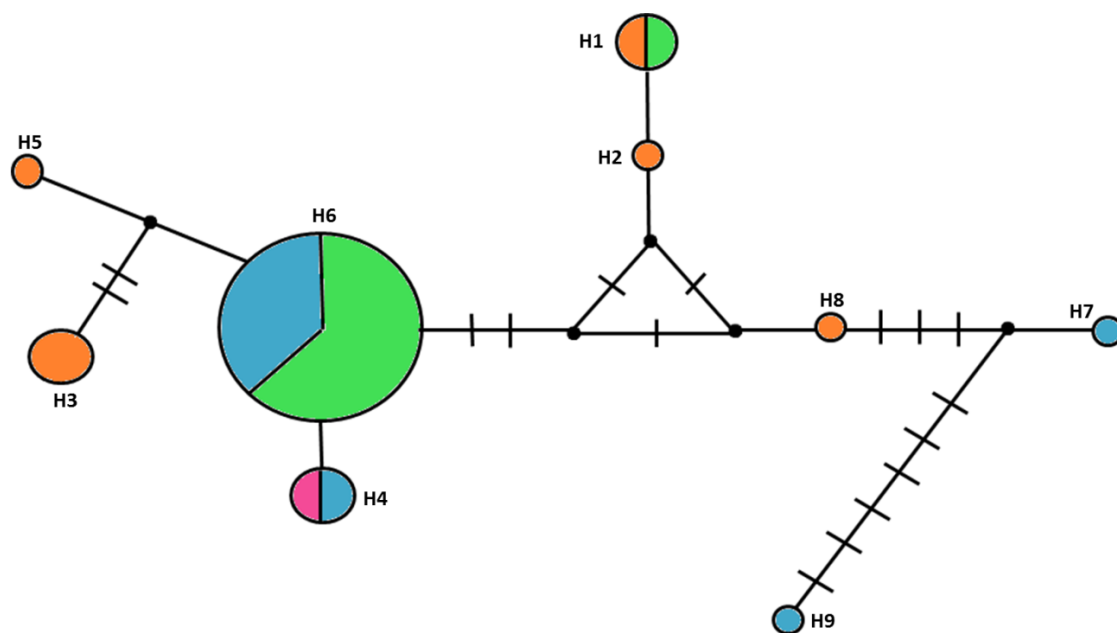


Figura 5. Red de haplotipos para el gen ND2. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. En verde la localidad de Morrocoy, en naranja se representa Cuare, en azul Patanemo y en rosado Tucacas. Los puntos y líneas perpendiculares de color negro representan los cambios ocurridos entre los haplotipos.

9.5. Distribución de diferencias pareadas.

Al graficar la distribución de diferencias pareadas, donde se observan las distribuciones observadas y esperadas, no se obtuvo una función unimodal en las frecuencias observadas, siendo la gráfica de las frecuencias observadas significativamente diferente a la gráfica de frecuencias esperadas, bajo el supuesto de expansión demográfica (Prueba de Bondad de Ajuste SSD = 0,7367; $P < 0,0001$), por lo que se infiere que el tamaño poblacional de la especie ha sido relativamente constante a lo largo del tiempo (Fig. 7).

Al estimar tanto el Índice de Irregularidad r y el estadístico R_2 , ambos presentaron valores bajos, lo cual es un indicativo de expansión demográfica. El r obtenido fue igual a 0,0326, mientras que el R_2 obtenido fue de 0,1283. Sin embargo, ninguno de estos valores fue significativo ($P > 0,05$) por lo cual se descarta la expansión demográfica.

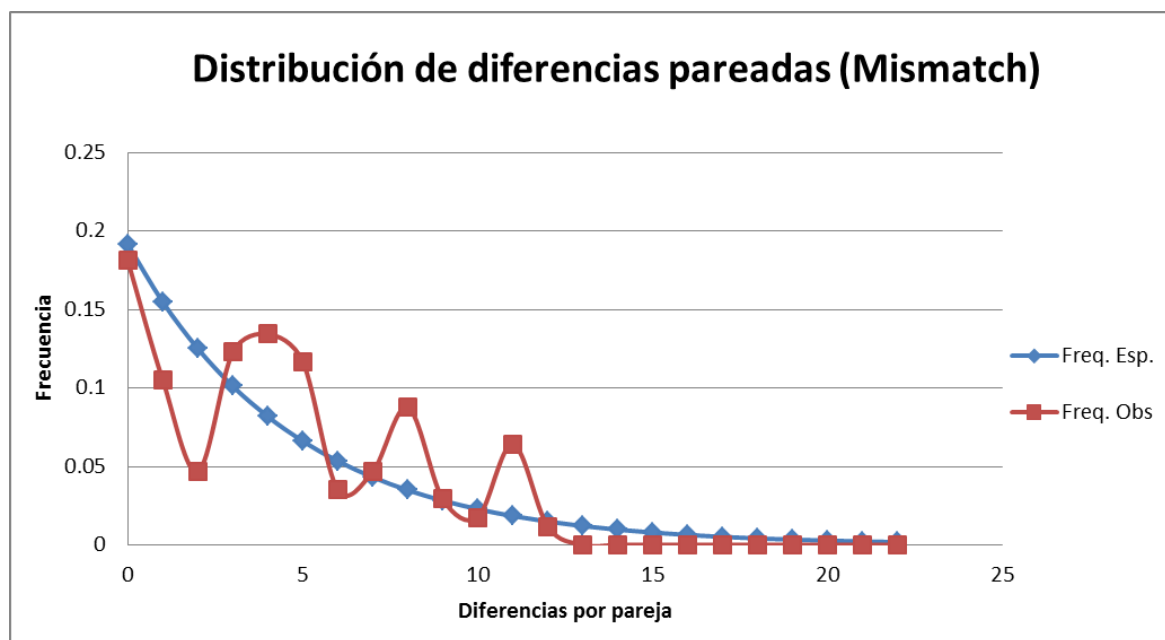


Figura 6. Distribución de diferencias pareadas de. En azul se representan las frecuencias esperadas y en rojo las frecuencias observadas.

10. Discusión

El presente estudio constituye el primero en emplear marcadores moleculares con el fin de evaluar la diversidad y estructura genética de una especie de la familia Rallidae en Venezuela y en el Neotrópico. A pesar de la predisposición a la extinción de la familia Rallidae (Bennett y Owens, 1997) los trabajos de diversidad y estructura genética son escasos; sin embargo, debido al desarrollo de las técnicas moleculares, recientemente los estudios en esta área han aumentado y se han empleado diversos marcadores moleculares para cuantificar la diversidad genética, conocer la estructura genética e inferir relaciones históricas de algunas especies amenazadas de la familia Rallidae (Girad y col., 2010; Ozaki y col., 2010; Grueber y Jamieson, 2011; Miller y col., 2012; Stermin y col., 2014). Esto ha permitido priorizar poblaciones a ser protegidas y proponer planes de manejo y conservación (Goldstein y col., 2000).

Los valores obtenidos para los estimadores de diversidad genética de la Polla de Wetmore son similares a los reportados para *Gallirallus okinawae* (Ozaki y col., 2010), *Laterallus jamaicensis* (Girad y col., 2010), y para una de las poblaciones de *Rallus aquaticus* (Stermin y col., 2014). A pesar de que el número de muestras en este estudio es menor al de la mayoría de los estudios mencionados, debido a la dificultad de capturar estas aves en áreas de manglar, la diversidad genética encontrada para el gen mitocondrial de la Polla de Wetmore, es en la mayoría de los casos mayor que la reportada para estas especies (Tabla 8). Los valores encontrados también son similares a los valores obtenidos para *Rhipidura spilodera*, *Chalcophaps indica* y *Gallirallus philippensis* (Kirchman y

Franklin, 2007) aves no amenazadas categorizadas como Preocupación Menor por la UICN (Tabla 8). Con base en los valores de diversidad genética obtenidos y, tomando en cuenta que la diversidad genética es de gran importancia para que pueda ocurrir la adaptación de los organismos en respuesta a cambios ambientales (Reed y Frankham, 2003; Frankham, 2005), se infiere que la Polla de Wetmore, a pesar de ser considerada una especie amenazada, posee un alto potencial adaptativo. Sin embargo, es importante considerar estos resultados con cautela, dado que los análisis se basan en un solo gen mitocondrial y en un bajo número de muestras. Se requieren más estudios que incluyan un mayor número de genes y muestras para poder confirmar que la Polla de Wetmore posee una alta diversidad genética.

La diversidad genética encontrada para el gen nuclear ADH5 fue cero, con la presencia de un solo haplotipo. Este resultado puede estar sustentado por el hecho de que la variación del genoma nuclear es menor que la del genoma mitocondrial, debido a la que las tasas de mutación nucleares son generalmente más bajas que las mitocondriales, tal vez por un factor de 10 (Brown, 1983; Zink y Barrowclough, 2008). Adicionalmente, para este gen solo se utilizó un fragmento de 581 pares de bases, debido a problemas con varias muestras en la amplificación del gen.

Tabla 8. Diversidad haplotípica y nucleotídica de aves amenazadas y no amenazadas, entre paréntesis se coloca el grado de amenaza de la especie, aquellas especies con un asterisco, pertenecen a la familia Rallidae

Especie	Diversidad haplotípica (<i>h</i>)	Diversidad nucleotídica (<i>π</i>)
<i>Rhipidura spilodera</i> (LC)	0,8068	0,0053
<i>Chalcophaps indica</i> (LC)	0,9430	0,0059
<i>Gallirallus philippensis</i> (LC)*	0,7710	0,00701
<i>Gallirallus okinawae</i> (EN)*	0,4990	0,0017
<i>Laterallus jamaicensis</i> (NT)*	0,9100 (San Francisco)	0,0051 (San Francisco)
	0,5300 (Sierra Nevada)	0,0026 (Sierra Nevada)
<i>Coturnicops noveboracensis</i> (LC)*	0,3360 (Oregón)	0,0009 (Oregón)
<i>Rallus aquaticus</i> (LC)*	0,8300 (Kazajstán)	-
	0,1180 (Siberia)	-
	0,2270 (Rumania)	-
	0,4040 (noroeste de Europa)	-
<i>Rallus wetmorei</i> *	0,9330 (Cuare)	0,01765 (Cuare)
	0,6000 (Morrocoy)	0,0077 (Patanemo)
	0,8000 (Patanemo)	0,0233 (Morrocoy)

Los valores de F_{st} y los resultados del AMOVA indican la ausencia de estructura entre las poblaciones de la Polla de Wetmore y sugieren también la existencia de flujo genético entre las cuatro poblaciones estudiadas. Lowe y Allendorf (2010) proponen que valores de F_{st} menores a 0,02 aseguran un flujo genético suficiente para mantener frecuencias alélicas similares entre las poblaciones, pero también sugieren que un emigrante por generación no es suficiente para mantener dichas frecuencias, por lo que la ausencia de estructura entre las poblaciones de la Polla de Wetmore podría indicar que está ocurriendo flujo genético y la migración de más de un individuo por generación entre las poblaciones estudiadas.

Aunque la mayoría de los miembros de la familia Rallidae presenta hábitos sedentarios y algunos son incapaces de volar (Livezey, 1998), en general se considera que las aves pertenecientes a esta familia poseen una alta capacidad de dispersión, debido a su presencia generalizada en las islas oceánicas (Taylor y van Perlo, 1998), así como a la evidencia de dispersión de larga distancia obtenida para algunas especies. Se ha reportado que durante el invierno ocurren movimientos de largas distancias (aproximadamente 1.200 km) de subespecies de *Rallus longirostris* en Florida, Estados Unidos (Crawford y col., 1982). También se ha reportado la dispersión, de hasta 3,5 km, de individuos juveniles de *Gallirallus australis grey* (Bramley, 2001) y la dispersión de adultos de *Rallus longirostris tenuirostris* durante la época de lluvia (mayo-septiembre) en México (Howe y col., 1989). Adicionalmente, se ha reportado la rápida recolonización por parte *Gallinula chloropus guami* de un humedal artificial en la isla de Rota en Micronesia, demostrando que la especie puede explotar rápidamente un hábitat recientemente disponible dispersándose distancias significativas (al menos 77 km) sobre el océano abierto (Worthington, 1998). En el caso de otra especie de la familia Rallidae, *Porphyrio porphyrio*, catalogada como En Peligro en la Península Ibérica, la recuperación y expansión del intervalo de distribución de ésta es el resultado de la protección eficaz de la especie y hábitats adecuados, el éxito de los programas de reintroducción y la capacidad de colonización de las inmediaciones y regiones distantes (> 300 kilómetros) por parte de la especie (Sánchez-La Fuente y col., 2001). La evidencia publicada sobre la dispersión de otras especies de rálidos y la revisión de las distancias calculadas, parecen respaldar la factibilidad de movimientos de individuos de la Polla de Wetmore entre las poblaciones

estudiadas, a pesar de la falta de continuidad del bosque de manglar entre algunas de ellas (Tabla 9)

Tabla 9. Distancias calculadas en línea recta entre las poblaciones estudiadas

Localidades	Distancia (Km)
Agua salobre/Morrocoy- Tucacas	10
Agua salobre/Morrocoy- Patanemo	65
R.F.S. Cuare- Patanemo	70
Cuare-Agua Salobre/Morrocoy	10
Cuare- Tucacas	15
Tucacas - Patanemo	55

La red de haplotipos realizada con el gen mitocondrial ND2 concuerda con los resultados del AMOVA y del índice F_{st} , ya que se encontraron nueve haplotipos, de los cuales tres eran compartidos entre las poblaciones. Este resultado reafirma la ausencia de estructura genética entre las poblaciones de la Polla de Wetmore y la ocurrencia de flujo genético. Las poblaciones de Patanemo y Cuare resultan de gran importancia e interés ya que presentan haplotipos únicos. Resulta interesante que solo un haplotipo (H1) sea compartido entre poblaciones cercanas y dos haplotipos (H4 y H6) estén compartidos entre las poblaciones más distantes. Este patrón puede explicarse por el bajo número de muestras, el cual pudo influir en el número de haplotipos compartidos encontrados entre Morrocoy, Tucacas y Cuare. A pesar de que el bosque de manglar de Patanemo se encuentra aislado del resto (Morrocoy, Tucacas, Cuare), los haplotipos compartidos entre Patanemo-Morrocoy y Patanemo-Tucacas sugieren la presencia de flujo genético entre poblaciones de la Polla de Wetmore.

Es importante considerar que el uso de un solo gen mitocondrial para realizar la red de haplotipos podría subestimar el número de haplotipos encontrados, ya que implica un único locus (Domínguez–Domínguez y Vázquez–Domínguez, 2009), por lo que es recomendable la utilización de genes nucleares y la comparación de más de un gen mitocondrial, con la finalidad de evaluar si existe congruencia en las historias fitogeográficas encontradas. Adicionalmente, sería recomendable la utilización de marcadores moleculares como los microsatélites que poseen altas tasas de mutación, siendo altamente polimórficos, por lo que resultan marcadores moleculares adecuados para inferir eventos genéticos relativamente recientes (Eguiarte y col., 2007; Freeland y col., 2011).

Los resultados obtenidos al graficar la distribución de diferencias pareadas, parece indicar que el tamaño poblacional de la especie ha sido relativamente constante a lo largo del tiempo, debido a que los resultados del Índice de Irregularidad r y el estadístico R_2 , no son significativos, se descarta una expansión demográfica reciente.

10.1 Implicaciones para la conservación

Actualmente los bosques de manglar a nivel mundial están desapareciendo a una tasa anual de 1% a 2%. Estas tasas están aumentando más rápidamente en los países en desarrollo, donde se encuentra el 90% de los manglares del mundo, por lo que estos ecosistemas están cerca de su extinción en 26 de los 120 países que poseen manglar (Duke y col., 2007). Particularmente en Venezuela, los bosques de manglar que constituyen el único hábitat de la Polla de Wetmore

(aquellos que se encuentran en Carabobo, Aragua y Falcón) están presentando numerosos cambios y transformaciones por construcciones de urbanizaciones residenciales, turísticas, complejos industriales, extracción de madera, instalación de camaroneras, extracción industrial de sal y contaminación asociada al uso de agroquímicos por actividades agropecuarias, manejo de instalaciones y derrames petroleros (Lentino y Esclasans, 2005; Oliveira-Miranda y col., 2010). La fragmentación del hábitat disminuye el intercambio de individuos entre poblaciones, trayendo como consecuencia el aislamiento de las poblaciones y la disminución del intercambio genético, lo que representa un efecto negativo sobre la diversidad genética, aumentando así la vulnerabilidad de la especie a la extinción (Amos y Harwood, 1998; Hansson y Westerberg, 2002; San Vicente, 2004). Basados en esto, el hecho de haber obtenido una diversidad genética relativamente alta para la Polla de Wetmore y la ausencia de estructura genética entre sus poblaciones, no quiere que decir que la fragmentación de los bosques de manglar no esté afectando, o haya afectado la variación genética de sus poblaciones. La falta de datos genéticos previos a este estudio no permite saber si la diversidad en algún momento fue más alta y si los valores obtenidos son resultado de un proceso de disminución de dicha diversidad. Por otra parte, y tomando en cuenta que la fragmentación acelerada de los bosques de manglar en América Latina ha venido ocurriendo desde hace unos 25 años (Yáñez-Arancibia y Lara-Domínguez, 1999), los resultados obtenidos pueden deberse a que no ha transcurrido tiempo suficiente para que el marcador utilizado (ADN mitocondrial) permita detectar efectos de la fragmentación del hábitat sobre la diversidad genética de la especie y el flujo genético entre sus poblaciones.

La Polla de Wetmore está clasificada como En Peligro, debido a que es un ave con distribución restringida, endémica y con un hábitat que está siendo degradado (Rodríguez y Rojas-Suárez, 2008; UICN, 2014). Los valores de diversidad genética obtenidos son relativamente altos, sugiriendo que la especie posee una capacidad de adaptación a cambios ambientales; sin embargo, las amenazas antropogénicas y disminución acelerada de los bosques de manglar continúan actuando sobre sus poblaciones. Por lo tanto, para preservar el potencial evolutivo y adaptativo de la especie sería necesario la protección y manejo adecuado de los bosques de manglar, para evitar la reducción de las poblaciones remanentes de la Polla de Wetmore. Si la reducción del tamaño poblacional llegara a ocurrir, se aceleraría el proceso de deriva génica y aumentaría la probabilidad de endogamia, con la consecuente pérdida de la diversidad encontrada, lo que conllevaría a un aumento del riesgo de extinción de la especie.

A pesar del limitado número de muestras utilizado en el presente estudio, la ausencia de estructura genética entre las poblaciones estudiadas indica que la distribución de la variación molecular se encuentra dentro de las poblaciones, por lo que todas las poblaciones resultan igualmente valiosas para conservación y no es posible asignar prioridades de conservación a alguna población específica o identificar ESUs o Unidades de Manejo. Debido a que el principal objetivo de la genética de la conservación es preservar la identidad genética de las especies, los resultados obtenidos sugieren que en caso de ocurrir una extinción local de la Polla de Wetmore, el riesgo de afectar el acervo genético de la especie sería

relativamente bajo. Adicionalmente, las características genéticas encontradas (alta diversidad y ausencia de estructura poblacional) permitirían la implementación de estrategias de manejo, tales como el rescate genético (Storfer, 1999; Tallmon y col., 2004; Bouzat y col., 2009), en el cual individuos de cualquier población puedan ser trasladados para realizar reintroducciones en el caso de extinciones locales, o traslocaciones hacia poblaciones que pudieran quedar aisladas debido a la fragmentación, con el objetivo de incrementar la diversidad y el flujo genético y reducir los efectos de la deriva génica y la endogamia.

11. Conclusiones.

- La diversidad genética de la Polla de Wetmore, basada en el gen mitocondrial ND2, es ligeramente mayor que la reportada para mayoría de otras especies amenazadas de la familia Rallidae, lo que es favorable porque indica una capacidad potencial para adaptarse ante cambios ambientales. Sin embargo, para el gen nuclear AHD5 la diversidad encontrada fue nula, debido a la menor variación del genoma nuclear.
- Las poblaciones de Cuare y Patanemo poseen mayor diversidad genética y mayor número de haplotipos, siendo así las más diversas, a pesar del limitado número de muestras utilizado.
- No se encontró estructura genética entre las poblaciones de Morrocoy, Patanemo, Cuare y Tucacas, indicando flujo genético entre las poblaciones. Estas características sugieren que, en caso de ser necesario en el futuro, podrían realizarse programas de rescate genético como parte de la estrategia de conservación y manejo de la especie.
- Con base en la distribución de la variación molecular, las poblaciones resultan igualmente valiosas para conservación, siendo imposible especificar o identificar ESUs o Unidades de Manejo.
- Con base en el análisis de distribución de diferencias pareadas, se infiere que el tamaño poblacional de la especie ha sido relativamente constante a lo largo del tiempo.

12.Recomendaciones.

- Para tener resultados más robustos, sería ideal contar con más muestras por localidad así como contar con muestras de La Ciénaga, en el estado Aragua, que es la población más pequeña y aislada de la especie.
- Los métodos de captura descritos para otras especies de rálidos (Zembal y Massey, 1983; Kearns y col., 1998; Fuertes y col., 2002) resultaron ineficientes en el ambiente de manglar. Se necesita diseñar e implementar una técnica más eficiente para este tipo de hábitat que permita aumentar el éxito de captura y así incrementar el tamaño muestral.
- Realizar un estudio de diversidad y estructura genética, empleando como marcador molecular los microsatélites. Esto permitiría usar muestras de museo y comparar la diversidad genética previa a la fragmentación del manglar, y así evaluar si los niveles de diversidad encontrados son menores que en el pasado.
- Realizar estimados de densidad y tamaño poblacional de la Polla de Wetmore, así como estudios de dispersión, que permitan responder preguntas de la ecología de la especie y poder entender más acerca de la magnitud y distribución de su diversidad genética.

13. Referencias bibliográficas.

Amos, W., Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*. **87**: 257–265.

Amos, W. y Harwood, J. 1998. Factors affecting populations of genetic diversity in natural populations. *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* **353**: 177–186.

Bandelt, J. J., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 37–48.

Beebe, T., Rowe, G. 2008. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press, Segunda Edición, New York, Estados Unidos.

Bennett, P.M., Owens, I.P.F. 1997. Variation in extinction risk among birds: chance or evolutionary predisposition? *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **264**: 401–408.

Biomatters Limited. [en línea]. 2005 Geneious version 6.1.7 <http://www.geneious.com>. [Consulta: 12 marzo 2015]

BirdLife International. [en línea]. 2013. State of the world's birds. <http://www.birdlife.org/datazone/sowb/state/STATE2>. [Consulta: 13 Diciembre 2013].

Boesman, P. 2006. Birds of Venezuela. MP3 Sound Collection. Birdsounds.nl, Ellecom, Países Bajos.

Bone, D., Cróquer, A., Klein, E., Pérez, D., Losada, F., Martín, A., Bastidas, C., Rada, M. y colaboradores. 2001. Programa Caricomp: monitoreo a largo plazo de los ecosistemas marinos del Parque Nacional Morrocoy, Venezuela. *Interciencia* **26**: 457-462

Bouzat, J. L., Johnson, J. A., Toepfer, J. E., Simpson, S. A., Esker, T. L., Westemeier, R. L. 2009. Beyond the beneficial effects of translocations as an effective tool for the genetic restoration of isolated populations. *Conserv. Genet.* **10**: 191-201.

Bramley, G. 2001. Dispersal by juvenile North Island Weka (*Gallirallus australis grey*). *Notornis*. **48**:43–46.

Brown W.1983. Evolution of animal mitochondrial DNA: Evolution of Genes and Proteins. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos.

Cadena, C.D., Klicka, J., Ricklefs, R.E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: molecular phylogenetics and phylogeography of Buarremon brush-finches (Aves, Emberizidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**: 993–1016.

Collar, N., Gonzaga, L., Krabbe, N., Madroño-Nieto, A., Naranjo, L., Parker, T., Wege, D. 1992. Threatened birds of the Americas: the ICBP/IUCN Red Data Book. International Council for Bird Preservation, Cambridge, Reino Unido.

Crawford, R.; Olson, S.; Taylor, W., 1982. Winter distribution of subspecies of Clapper Rails (*Railus longirostris*) in Florida with evidence for long-distance and overland movement. *The Auk* **100**: 198–200.

DeSalle, R., Amato, G. 2004. The expansion of conservation genetics. *Nat. Rev. Gen.* **5**: 702–712.

DiBattista, J. D. 2008. Patterns of genetic variation in anthropogenically impacted populations. *Conserv. Genet.* **9**: 141–156.

Domínguez-Domínguez, O., Domínguez-Vázquez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Anim. Biodiver. Conserv.* **32**:59–70.

Donoso, C., Premoli, A., Gallo, L., Ipinza, R. 2004. Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, Chile.

Duke, N., Meynecke, J., Dittmann, Ellison, A., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S. y colaboradores. 2007. A world without mangroves?. *Science* **317**: 41-42.

Eguiarte, L., Souza, V., Aguirre, X. 2007. Ecología Molecular. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. Primera Edición, México D.F., México.

Excoffier, L., Lischer, H.E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol.* **10**: 564-567.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.

Fain, M.G., Krajewski, C., Houde, P. 2007. Phylogeny of "core Gruiformes" (Aves: Grues) and resolution of the Limpkin-Sungrebe problem. *Mol. Phylogenet. Evol.* **43**: 515-529.

Fitzpatrick, B. 2009. Power and sample size for nested analysis of molecular variance. *Mol. Ecol.* **18**:3961–3966.

Fleischer, R.C., Fuller, G., Ledigt, D.B. 1995. Genetic structure of the endangered Clapper Rail (*Rallus longirostris*) populations in Southern California. *Conserv. Biol.* **9**: 1234–1243.

Flight, P. 2010. Phylogenetic comparative methods strengthen evidence for reduced genetic diversity among endangered tetrapods. *Conserv Biol.* **24**:1307–1315.

Fluxus Technology Limited. 2012. [en línea]. Free phylogenetic Network software. <http://www.fluxus-engineering.com> [Consulta: 22 febrero 2015].

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **126**: 131–140.

Frankham, R., Ballou, J., Briscoe, D. 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

Fraser, D., Bernatchez, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Ecol.* **10**: 2741–2752.

Freeland, J. R., Kirk, H., Petersen, S. D. 2011. Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd. Segunda Edición, West Sussex, Reino Unido.

Fuertes, B., García, J. y, Colino, J. 2002. Use of fish nets as a method to capture small rails. *J. Field. Ornithol.* **73**: 220 – 223.

García-R, J., Gibb, G., Trewick, S. 2014a. Deep global evolutionary radiation in birds: diversification and trait evolution in the cosmopolitan bird family Rallidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* **81**: 96–108.

García-R, J., Gibb, G., Trewick, S. 2014b. Eocene diversification of crown group rails (Aves: Gruiformes: *Rallidae*). PLoS ONE **9**: 1-10.

Gaunt, A. Oring, L. 1997. Guidelines to the use of wild birds in research. Ornithological Council, Washington, D.C., Estados Unidos.

Girard, P., Takekawa, J., Beissinger, S. 2010. Uncloaking a cryptic, threatened rail with molecular markers: origins, connectivity and demography of a recently-discovered population. *Conserv. Genet.* **11**: 2409–2418.

Goldstein, P., DeSalle, R., Amato, G., Vogler, A. 2000. Conservation genetics at the species boundary. *Conserv. Biol.* **14**: 120–131.

Grueber, C. y Jamieson, I. 2011. Low genetic diversity and small population size of Takahe *Porphyrio hochstetteri* on European arrival in New Zealand. *Ibis* **153**: 384–394.

Haig, S. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* **79**: 413–425.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acid. S.* **41**: 95-98.

Hansson, B., Westerberg, L. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness. *Mol. Ecol.* **11**: 2467–2474.

Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* **66**: 591-600.

Hedrick, P. W., Miller, P. S.. 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecol. Applic.* **2**: 30-46.

Hilty, S. 2003. Birds of Venezuela. Princeton University Press, Princeton, Estados Unidos.

Howe, W., Taylor, D., Jett, D. 1989. Notes on the rail *Rallus longirostris tenuirostris* in the highlands of central México. *Wilson Bull.* **101**:117–120.

Kearns, G. D., Kwartin, N. B., Brinker, D. F. Haramis, G. M.1998. Digital playback and improved trap design enhances capture of migrant soras and Virginia rails. *J. Field. Ornithol.* **69**: 466-473.

Kirchman, J., Franklin, J. 2007. Comparative phylogeography and genetic structure of Vanuatu birds: Control region variation in a rail, a dove, and a passerine. *Mol. Phylogenet. Evol.* **43**:14–23.

Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T. Higgins, D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Lentino, M. Esclasans, D. 2005. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en Venezuela. Págs. 621- 730 en: BirdLife Internacional y Conservación

Internacional. Áreas Importantes para la Conservación de las Aves en los Andes Tropicales: sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad. BirdLife Internacional (Serie de Conservación de BirdLife N°. 14), Quito, Ecuador

Librado, P.; Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451-1452.

Livezey, B.C., 1998. A phylogenetic analysis of the Gruiformes (Aves) based on morphological characters, with an emphasis on the rails (Rallidae). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **353**: 2077-2151.

López de Luzuriaga A., Olano, J.M. 2006. Con los pies en el suelo: incluyendo la estructura espacial de los datos en los análisis multivariantes. *Ecosistemas* **15**: 60-68.

Lowe, W., Allendorf, F. 2010. What can genetics tell us about population connectivity?. *Mol. Ecol.* **19**: 3038–3051.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209–220.

Miller, M., Haig, S., M., Mullins, T., Popper K., Green, M. 2012. Evidence for population bottlenecks and subtle genetic structure in the Yellow Rail. *Condor* **114**: 100–112.

Ministerio del Poder Popular para el Ambiente [en línea] Sistema Venezolano de Información sobre Diversidad Biológica, 2006.

<http://diversidadbiologica.minamb.gob.ve/areas/ficha/26/> [Consulta: 17 febrero 2015].

Misawa, K., Tajima, F. 1997. Estimation of the amount of DNA polymorphism. *Genetics* **147**: 1959-1964.

Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**: 373-375.

Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, Estados Unidos.

Nusser, J. A., Goto, R. M., Ledig, D. B., Fleischer, R. C., Miller, M. M. 1996. RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered Light-footed Clapper Rail. *Mol. Ecol.* **5**: 463–472.

Oliveira-Miranda, M., Huber, O., Rodríguez, J., Rojas-Suárez, F. 2010. Riesgo de eliminación de los ecosistemas terrestres de Venezuela. Págs: 109-123 en: J.P. Rodríguez, F. Rojas-Suárez y D. Giraldo Hernández (eds.). Libro Rojo de los Ecosistemas Terrestres de Venezuela. Provita, Shell Venezuela, Lenovo (Venezuela), Caracas, Venezuela.

Olson, S. 1973. A classification of the Rallidae. *Wilson Bull.* **85**: 381–416.

Ozaki, K., Yamamoto, Y., Yamagishi, S., 2010. Genetic diversity and phylogeny of the endangered Okinawa Rail, *Gallirallus okinawae*. *Genes Genet. Syst.* **85**: 55–63.

Palsbøll, P., Bérubé, M., Allendorf, F. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol. Evol.* **22**: 11–16.

Qiagen. 2003. DNeasy® Tissue Handbook. Protocol for isolation of total DNA from animal tissues, pp. 18-20. Qiagen, Valencia, Estados Unidos.

Qiagen. 2006. QIAquick® Spin Handbook. QIAquick PCR Purification Kit Protocol Qiagen, Valencia, Estados Unidos.

Reed, D., Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv. Biol.* **17**: 230–237.

Restall, R., Rodner, C. y Lentino, M. 2007. Birds of Northern South America: Species accounts. Yale University Press, New Haven, Estados Unidos.

Rodríguez, J., Rojas-Suárez, F. 2008. Libro Rojo de la Fauna Venezolana. Provita y Shell Venezuela, S.A, Tercera Edición, Caracas, Venezuela.

Rodríguez-Ferraro, A., Sanchez, E., Lentino, M. 2012. First description of the nest and eggs of the Plain-flanked Rail (*Rallus wetmorei*). *Ornitol. Neotrop.* **23**: 461-466.

Ramos-Onsins, S., Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**:2092–2100.

Rosell, B. 2011. Morrocoy National Park Report. Europäisch- Karibische Gesellschaft e.V., Konstanz- Alemania.

Sánchez, E. 2013. Relaciones filogenéticas y estatus taxonómico de la Polla de Wetmore (*Rallus wetmorei*). Tesis de Licenciatura. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

Sánchez-La Fuente, A., Valera, F., Godino, A., Muela, F. 2001. Natural and human-mediated factors in the recovery and subsequent expansion of the purple swamphen *Porphyrio porphyrio* L. (Rallidae) in the Iberian Peninsula. *Biodivers. Conserv.* **10**: 851–867.

San Vicente, M. 2004. Conectividad ecológica del territorio y conservación de la biodiversidad: nuevas perspectivas en ecología del paisaje y ordenación territorial. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Primera Edición, Bilbao, España.

Slikas, B., Olson, S. L., & Fleischer, R. C. 2002. Rapid, independent evolution of flightlessness in four species of Pacific Island rails (Rallidae): an analysis based on mitochondrial sequence data. *J. Avian Biol.* **33**: 5–14.

Sorenson, M. D. 2003. Avian mtDNA primers. Boston University, Boston, Estados Unidos.

Sorenson, M.D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T., Mindell, D. P. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**:105-114.

Spielman, D., Brook, B. W., Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Nat. Acad. of Sci.***101**: 15261-15264.

Stermin, A., David, A., Pripon, L., Sevianu, E., Seifert, N., Eilers, A., Fregin, S., Haase, M., Schmitz, A. 2014. Limited genetic structure and diversity in the water rail *Rallus aquaticus* L., 1758 (Aves: Gruiformes: Rallidae) revealed by mitochondrial DNA analysis. *Ital. J. Zool.***81**: 1–5.

Storfer, A. 1999. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. *Biol. Conserv.* **87**: 173-180.

Tallmon, D. A., Luikart, G., Waples, R. S. 2004. The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends. Ecol. Evol.* **19**: 489-496.

Tavares, E.S., de Kroon, G.H.J., Baker, A.J. 2010. Phylogenetic and coalescent analysis of three loci suggest that the Water Rail is divisible into two species, *Rallus aquaticus* and *R. indicus*. *BMC Evol. Biol.***10**: 1-12.

Taylor, B., van Perlo, B. 1998. Rails. A Guide to de rails, crakes, gallinules, and coots of the world. Plica Press, East Sussex, Reino Unido.

UICN. [en línea]. 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. [Http: www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). [Consulta: 15 octubre 2014].

Vásquez-Domínguez E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño T., Gutiérrez-García, T. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la

información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **82**: 277-297.

Wakeley, J. 1996. The variance of pairwise nucleotide differences in two populations with migration. *Theor. Popul. Biol.* **49**: 39–57.

Wan, Q., Wu, H., Fujihara, T., Fang, S. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* **25**:2165–2176.

Whitlock, M. C. 2000. Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution* **54**: 1855-1861.

Worthington, D. 1998. Inter-island dispersal of the Mariana Common Moorhen: A recolonization by an endangered species. *Wilson Bull.* **110**: 414–417.

Yáñez–Arancibia, A., Lara–Domínguez A. 1999. Los manglares de América Latina en la encrucijada. Ecosistemas de Manglar en América Tropical. Instituto de Ecología A.C. México, UICN/ORMA, Costa Rica, NOAA/NMFS Silver Spring, Estados Unidos.

Zemba, R., Massey, B. W. 1983. To catch a Clapper Rail – twice. *North American Bird Bander* **8**: 144-148.

Zink, R., Barrowclough, G. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol.* **17**: 2107–2121.

Zink, R., Barrowclough, G., Atwood, J., Blackwell-Rago, R. 2000. Genetics, taxonomy, and conservation of the threatened California Gnatcatcher. *Conserv. Biol.* **14**:1394–1405.

Zimmer, J., Phelps, W. 1944. New species and subspecies of birds from Venezuela. *Am. Mus. Nov.* **1270**: 1 - 16.

14. Apéndice A. Información de los individuos utilizados en los análisis del presente estudio

Especie	Morfo	Número /Anillo	Fecha Captura	Localidad	Estado	Cordenadas	
<i>R. wetmorei</i>	claro	IC-386 (COP)	27/09/2000	Patanemo	Carabobo	10 ° 27' 14.4" N	67 ° 55' 1.2" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	125 (Audubon)	29/05/2012	Agua salobre -Morrocoy	Falcón	10 ° 51' 33.0" N	68 ° 19' 21.0" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	126 (Audubon)	30/05/2012	Agua salobre -Morrocoy	Falcón	10 ° 51' 33.0" N	68 ° 19' 21.0" O
<i>R. wetmorei</i>	claro	127 (Audubon)	30/05/2012	Agua salobre -Morrocoy	Falcón	10 ° 51' 33.0" N	68 ° 19' 22.7" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	128 (Audubon)	23/02/2013	Morrocoy	Falcón	10 ° 51' 31" N	68 ° 18' 53.2 "O
<i>R. wetmorei</i>	claro	129 (Audubon)	23/02/2013	Morrocoy	Falcón	10 ° 51' 31.5" N	68 ° 18' 53.2" O
<i>R. wetmorei</i>	claro	130 (Audubon)	24/02/2013	Morrocoy	Falcón	10 ° 51' 20.1" N	68 ° 14' 45.0" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	132 (Audubon)	13/07/2013	Patanemo	Carabobo	10 ° 26' 44.7" N	67 ° 55' 39.1" O
<i>R. wetmorei</i>	claro	133 (Audubon)	14/07/2013	Patanemo	Carabobo	10 ° 26' 44.7" N	67 ° 55' 39.1" O
<i>R. wetmorei</i>	-	(huevo con embrión)	27/05/2014	R.F. S. Cuare	Falcón	10 ° 54' 40.2" N	68 ° 16' 35.4" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	134 (Audubon)	28/06/2014	R.F. S. Cuare	Falcón	10 ° 54' 40.2" N	68 ° 16' 35.4" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	002 (USB)	16/12/2014	R.F. S. Cuare	Falcón	10 ° 56' 58.7" N	68 ° 19' 16.7" O
<i>R. wetmorei</i>	claro	003 (USB)	16/12/2014	R.F. S. Cuare	Falcón	10 ° 56' 58.7" N	68 ° 19' 16.7" O
<i>R. wetmorei</i>	claro	004 (USB)	16/12/2014	R.F. S. Cuare	Falcón	10 ° 56' 53.1" N	68 ° 19' 11.8" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	005 (USB)	15/01/2015	Patanemo	Carabobo	10 ° 27' 5.3" N	67 ° 55' 40.5" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	006 (USB)	16/01/2015	Patanemo	Carabobo	10 ° 27' 5.3" N	67 ° 55' 40.5" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	007 (USB)	16/01/2015	Patanemo	Carabobo	10 ° 27' 5.5" N	67 ° 55' 36.4" O
<i>R. wetmorei</i>	oscuro	008 (USB)	18/01/2015	Tucacas- Punta Brava	Falcón	10 ° 47' 52.0" N	68 ° 18' 19.4" O
<i>R. wetmorei</i>	claro	009 (USB)	19/01/2015	R.F. S. Cuare	Falcón	10 ° 56' 16.7" N	68 ° 18' 27.1" O