



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Estudios moleculares de las aves cubanas: actualidad y perspectivas

Molecular studies on Cuban birds: current knowledge and perspectives

Alexander Llanes-Quevedo^{1*} y Georgina Espinosa-López²

¹ Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba

* Autor para correspondencia:
alex.llanesquevedo@gmail.com

RESUMEN

Los estudios de genética molecular aplicados a la ornitología han demostrado ser de gran utilidad en la resolución de conflictos taxonómicos, identificación de eventos de hibridación, caracterización de la diversidad y estructura poblacionales, así como la priorización en la conservación, entre otros. En este trabajo, se presenta una revisión bibliográfica de cómo tales estudios han sido aplicados a las aves de Cuba, el archipiélago con mayor diversidad avifaunística del Caribe insular, y se discuten algunas de las aplicaciones y potencialidades del uso de las técnicas contemporáneas de trabajo con marcadores moleculares. Se realizó una búsqueda en las bases de datos *online* de publicaciones científicas entre los años 1990-2019, para analizar el número de trabajos realizados, las especies incluidas, el tipo de marcadores moleculares empleados, los objetivos definidos y la participación de los especialistas e instituciones cubanas. De las 394 especies registradas para Cuba, solamente se han estudiado 26, siendo Passeriformes el orden más trabajado. La mayor parte de los artículos se enfocan a la reconstrucción de filogenias para esclarecimiento de preguntas relacionadas con la sistemática y biogeografía de las especies incluidas. Las secuencias de genes mitocondriales son el tipo de marcador molecular más empleado y es incipiente el empleo de las técnicas de Secuenciación de Nueva Generación. La participación de especialistas e instituciones cubanas en los estudios genéticos de las aves de Cuba, considerando autorías y donación de muestras, alcanza un 30% de las publicaciones existentes. El desarrollo actual de las técnicas de trabajo con marcadores moleculares abre posibilidades reales de aprovecharlos en el estudio y conservación de la avifauna cubana por investigadores e instituciones nacionales. Algunos de los elementos que pueden potenciarlo son el muestreo no invasivo en el campo, el aprovechamiento de los especímenes de las colecciones, y el empleo de las técnicas de Secuenciación de Nueva Generación para su análisis.

Palabras clave: ornitología, Cuba, genética, marcadores moleculares, Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

Recibido: 2019-07-11

Aceptado: 2019-12-16

ABSTRACT

The studies of molecular genetics applied to Ornithology have proven to be useful in the resolution of taxonomic conflicts, identification of hybridization events, characterization of population's diversity and structure, as well as prioritization in conservation, among others. In this paper, we presented a bibliographic review of how such studies have been applied to Cuban birds, the archipelago with the highest avian diversity in the insular Caribbean, and some of the applications and potential uses of the current techniques of the analysis of molecular markers are discussed. We searched online databases of scientific publications between 1990-2019, to analyze the number of studies, the species included, the type of molecular markers used, the objectives, and the participation of Cuban specialists and institutions. Of the 394 species recorded for Cuba, only 26 have been studied, being order Passeriformes the most studied. Most articles focused on the reconstruction of phylogenies to clarify questions related to the systematics and biogeography of the species included. Mitochondrial gene sequences are the most commonly used type of molecular marker, and the use of Next Generation Sequencing techniques is just emerging. The participation of Cuban specialists and institutions in the genetic studies of Cuban birds, considering both authorship and donation of samples, reaches 30% of the existing papers. The current development of techniques with molecular markers opens real possibilities to take advantage of them for the study and conservation of Cuban avifauna by national researchers and institutions. Some of the elements that can enhance this approach are non-invasive sampling in the field, the use of already collected specimens, and the use of Next Generation Sequencing techniques for the analysis.

Keywords: ornithology, Cuba, genetics, molecular markers, Next Generation Sequencing (NGS)

INTRODUCCIÓN

Las aves constituyen uno de los grupos más representativos de la biodiversidad de Cuba, comprendiendo más de la mitad de las especies de vertebrados que ocupan este archipiélago. En total, se han registrado hasta 394 especies de aves (Navarro 2019) de las 738 que habitan en todo el Caribe Insular, por lo que constituye la avifauna más diversa de la región (Gerfbracht y Levesque 2019). El archipiélago cubano sustenta un número importante de taxones endémicos, especies residentes permanentes, así como otros que realizan residencias invernales o paradas de tránsito en sus migraciones (González *et al.*, 2002, Navarro, 2015). Según la Lista Roja de la IUCN (2019), en Cuba se distribuyen actualmente 21 especies de aves con alguna categoría de amenaza (en Peligro Crítico, en Peligro, Vulnerables) y 23 Casi Amenazadas, aunque según González *et al.* (2012) asciende a 30 la cantidad especies de aves cubanas con algún grado de amenaza.

La alta diversidad y endemismo de la avifauna cubana, unidos en tiempos más recientes a la necesidad de su manejo y conservación, han impulsado los estudios ornitológicos en Cuba desde hace poco menos de dos

centurias hasta la actualidad. En el siglo XIX, y con gran influencia europea, la mayor parte de estos se dirigió a la descripción de especies y de su historia natural. Entre los años 1827 y 1893, fueron publicados hasta diez catálogos y obras de adición o descripción de nuevas especies. Estos esfuerzos alcanzaron su cumbre con la obra Contribución a la Ornitología cubana (Gundlach 1876) en la que se compilaba información de hasta 263 especies (Garrido y García Montaña, 1975). El advenimiento del siglo XX marcó el giro del foco principal de la ornitología en el archipiélago a la sistemática y ecología (Garrido y Kirkconnell, 2010), con un papel importante de especialistas e instituciones norteamericanas hasta la década de 1960 (Peris, 2011). A partir de entonces comenzó una nueva etapa donde el trabajo ornitológico ha estado protagonizado por profesionales e instituciones cubanas. Entidades fundadas en este periodo, como el Instituto de Ecología y Sistemática, el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad y la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y Fauna, de conjunto con otras ya existentes (la Universidad de La Habana y el Museo Nacional de Historia Natural, por ejemplo), han pasado a liderar el estudio de las aves en el país (Acosta *et al.*, 2004; Mugica *et al.*, 2012). Sus principales esfuerzos han estado enfocados hacia investigaciones

ecológicas integrales de comunidades (Garrido y Kirkconnell, 2010); con énfasis hacia especies con algún grado de amenaza como la Cotorra cubana (*Amazona leucocephala*), el Catey (*Psittacara euops*), el Frailecillo Silbador (*Charadrius melodus*), entre otros (Acosta *et al.*, 2004) y el estudio de la composición de especies para determinadas áreas naturales de interés (e.g. Denis *et al.*, 2005; Sánchez, 2005; Parada *et al.*, 2013).

A partir de 1970-1980, el progreso en las técnicas de trabajo con marcadores genéticos potenció algunos de los principales avances en la ornitología a nivel mundial (e.g. estudios filogenéticos, de sistemas de apareamiento, de la vida en grupo y la cría cooperativa) (Birkhead y Charmantier, 2001). Los marcadores genéticos son secuencias de DNA, con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Estos pueden ser genes o fragmentos de DNA sin función conocida y permiten identificar individuos o especies (Raza *et al.* 2015; 2016). Entre los marcadores más utilizados se encuentran el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP por sus siglas en inglés), el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (*Amplified fragment length polymorphism*, AFLP), el polimorfismo de DNA de amplificación aleatoria (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD), los microsatélites o la repetición de secuencia simple (*Simple sequence repeats*, SSR o *Short tandem repeats*, STR), el polimorfismo de nucleótido único (*Single-nucleotide polymorphism*, SNP) y las secuencias génicas (Raza *et al.* 2016). El empleo de estos ha generado una explosión de estudios aplicados a la taxonomía, sistemática, biogeografía y genética de poblaciones, así como análisis comparativos de ecología, comportamiento y morfología (Birkhead y Charmantier, 2001). En la actualidad, los métodos de secuenciación paralela masiva (NGS por sus siglas en inglés: *Next Generation Sequencing*) han permitido reanalizar estas problemáticas en mayor detalle y abrir nuevas líneas de investigación (Toews *et al.* 2015).

En este trabajo se presenta una revisión general de las publicaciones que emplean marcadores moleculares para el estudio de las aves de Cuba, desde 1990 hasta el presente. Además, se discuten algunas de las aplicaciones de este tipo de estudios a la avifauna cubana y las potencialidades del uso de las técnicas contemporáneas de trabajo con estos marcadores.

MÉTODOS

Para la revisión, se realizaron búsquedas en las bases de datos de *Google Scholar* y *Web of Science*, incluyendo todas sus bases de datos: *Biological Abstracts*, *Biosis*, *Current Contents Connect*, *SciELO Citation Index*, *Russian Science Citation Index*, y *Zoological Records*. Las palabras claves empleadas fueron 'aves, bird, Cuba, DNA, molecular, molecular marker, gene*, phylogen*, phylogeography, sequence, RFLP, AFLP, RAPD, SSR, STR, microsatellite, NGS, SNP, *genomic*'. Además, fueron consultados especialistas y la literatura citada de los artículos encontrados para ampliar y verificar la compilación realizada. El rango temporal de búsqueda fue definido entre los años 1990-2019.

Todas las publicaciones fueron analizadas íntegramente para extraer la información referente a las especies trabajadas, el número y procedencia de las muestras empleadas, así como el tipo de marcadores moleculares utilizados. Para la clasificación y nomenclatura de las especies se siguió la propuesta del Comité Ornitológico Internacional (Gill y Donsker, 2019). La determinación del tipo de estudio fue realizada de acuerdo a la información contenida en el título y las palabras claves de cada artículo. Finalmente, se realizó una revisión de las citas a estas publicaciones en *Google Scholar* y *Web of Science* y se identificaron aquellas realizadas en trabajos enfocados a las aves cubanas en cualquiera de sus temáticas.

DESARROLLO

Estudios moleculares de las aves de Cuba

Entre 1990 y 2019 se publicaron 31 trabajos en los que se reporta y analiza información obtenida con marcadores moleculares referente a aves cubanas (Tabla 1), de estos, cinco artículos han sido enfocados exclusivamente al estudio de la avifauna de Cuba. En estas publicaciones se determinaron las relaciones poblacionales del Yaguasín (*Dendrocygna bicolor*) en tres arrozales de Cuba (Mugica *et al.*, 1992), la caracterización genética de la colonia reproductora de los Flamencos Caribeños (*Phoenicopterus ruber*) en Río Máximo (Frías-Soler *et al.*, 2014); de individuos de Cotorra Cubana (*Amazona leucocephala*) en cautiverio (Milián-García *et al.*, 2015a); y de colonias reproductivas de la Cayama (*Mycteria americana*; Llanes-Quevedo *et al.*, 2018) y la Seviya (*Platalea ajaja*; Llanes-Quevedo *et al.*, 2019). Por otra parte, en la publicación de Johansson *et al.* (2018) se registra por primera ocasión el mitogenoma de la especie extinta de Guacamayo Cubano *Ara tricolor*.

Los trabajos restantes presentan datos moleculares (mayormente secuencias de uno o más genes) de otras 21 especies de aves cubanas como parte de estudios filogenéticos amplios de los grupos a los que pertenecen, realizados en el contexto regional del Caribe y América Central (Tabla 1). En estos últimos trabajos (el 83% de todos los estudios publicados, N=31) no participaron investigadores o personal de instituciones cubanas como parte de los autores o en los agradecimientos. Además, la mayor parte de las muestras procesadas fueron obtenidas de especímenes en colecciones en Estados Unidos y Suecia (Tabla 1). Instituciones como *Academy of Natural Sciences*, Filadelfia; *Field Museum of Natural History*, Chicago; *United States National Museum*, Washington D. C.; *Museum of Comparative Zoology*, Harvard University; *American Museum of Natural History*, New York y *Swedish Museum of Natural History* proporcionaron el material para más de la mitad de los estudios. Únicamente los ejemplares procesados en los artículos de Omland *et al.* (1999), Lanyon y Omland (1999), Moore *et al.* (2011) y de Powell *et al.* (2014) (una muestra por especie en cada artículo) fueron proporcionadas por el Museo Nacional de Historia Natural de Cuba. Para los trabajos de Loughheed *et al.* (2000) y Ottens-Wainright *et al.* (2004) las muestras fueron obtenidas mediante la colecta de aves silvestres, mientras que en Overton y Roads (2004) y Rusello *et al.* (2010), también se emplearon algunas muestras de esta procedencia para completar el muestreo realizado en colecciones de Estados Unidos.

La representatividad taxonómica de la avifauna es dispar en los trabajos moleculares realizados hasta la fecha. De los 21 órdenes de aves presentes en Cuba, 11 han sido trabajados, siendo Passeriformes el mejor representado. Se han estudiado 26 especies, de las cuales la mitad son endémicas (Fig. 1a), siete presentan alguna categoría de amenaza y dos están extintas (Fig. 1b).

La mayor parte de los artículos consisten en aportes a la sistemática y taxonomía de las especies incluidas, así como a estudios biogeográficos de la avifauna caribeña, mientras que el número de estudios filogeográficos y de genética de poblaciones son los más reducidos (Tabla 1). En la mayoría de estos trabajos se emplean secuencias de DNA mitocondrial, en un reducido número se combinan más de un tipo de marcador (microsatélites o secuencias nucleares y secuencias mitocondriales) y en tres, se han empleado las técnicas de NGS (Tabla 1).

Los resultados de los estudios moleculares en aves cubanas han sido pobremente incorporados en subsecuentes investigaciones de la avifauna cubana. Solo unas pocas publicaciones posteriores refieren la información obtenida en estos (*e.g.*, Overton y Roads, 2004 citado en Pérez-Mena y Mora, 2011, y Omland *et al.*, 1999 en Garrido *et al.*, 2005), lo cual podría estar determinado porque su objetivo principal es la reconstrucción filogenética de los grupos a los que pertenecen. En estos trabajos, generalmente, se analiza un escaso número de muestras cubanas por taxón, lo que imposibilita su empleo para hacer inferencias sobre las dinámicas de sus poblaciones, ecología y conservación, líneas dominantes en la investigación ornitológica en Cuba.

Los estudios genéticos y su relevancia en el conocimiento y la conservación de la avifauna cubana.

La importancia de los estudios genéticos ha sido reconocida por la IUCN, que ha definido la diversidad genética, entre especies e incluso entre ecosistemas como un criterio para la conservación (McNeely *et al.*, 1990). El estudio de este componente de la biodiversidad permite la caracterización y comparación de *taxa* dentro y entre diferentes niveles jerárquicos. De esta forma, contribuye a la resolución de problemas disímiles que pueden ir desde la inferencia de relaciones filogenéticas y la determinación de los límites de las especies, hasta la identificación del sexo de los individuos y los sistemas de apareamiento dentro de las poblaciones. A continuación, exponemos brevemente algunas de las aplicaciones que podrían ser relevantes en la conservación de la avifauna de Cuba.

Taxonomía: Delimitación de especies

La definición de especie, subespecie o unidades evolutivamente significativas (ESU) es básica para una mejor comprensión de la diversidad biológica, su evolución y conservación. Los métodos de análisis de DNA son cada vez más empleados para determinar los límites evolutivos y geográficos de estas entidades (Haig *et al.*, 2011). Al permitir la identificación de linajes independientes, los métodos moleculares han sido especialmente útiles para el descubrimiento de especies crípticas, es decir, aquellas con caracteres externos sutiles o indistinguibles resultantes de una morfología evolutivamente conservadora (Bickford *et al.*, 2007).

Tabla 1. Publicaciones científicas que incluyen investigaciones con marcadores moleculares en las aves de Cuba entre los años 1990-2019. Se incluyen los primeros autores, año, especie(s) bajo estudio, los marcadores empleados, el tamaño de muestra utilizado (N) y su procedencia.

Table 1. Scientific publications that include investigations with molecular markers in the birds of Cuba between the years 1990-2019. The first authors, year, species (s) under study, the maracadores used, the sample size used (N) and their origin are included.

Autor, Año	Especie	Tipo de estudio	Marcador(es) empleado(s)	(N) y Procedencia
Mugica <i>et al.</i> , 1992	<i>Dendrocygna bicolor</i>	Genética poblacional	Polimorfismos de proteínas (esterasas)	(75) Medio natural
Espinosa de los Monteros, 1998	<i>Priotelus temnurus</i>	Filogenia	Secuencias de genes mitocondriales (Cytb, 12S rDNA)	(2) No Especificado: Colecciones de USA, México, Singapur y Dinamarca
Lovette <i>et al.</i> , 1998	<i>Setophaga pityophila</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias de genes mitocondriales (ATP 6/8)	(1) ANSP
Lanyon y Omland, 1999	<i>Agelaius assimilis</i>	Filogenia	Secuencias de gen mitocondrial (Cyt b)	(1) MNHNCu
Omland <i>et al.</i> , 1999	<i>Icterus melanopsis</i>	Filogenia	Secuencias de genes mitocondriales (ND2, Cyt b)	(1) MNHNCu
Lougheed <i>et al.</i> , 2000	<i>Melopyrrha nigra</i>	Filogenia	Secuencias de gen mitocondrial (Cyt b)	(No especificado) Medio natural
Klein <i>et al.</i> 2004	<i>Teretistris fernandinae</i>	Filogenia	Secuencias de gen mitocondrial (Cyt b)	(1) ANSP
Joseph <i>et al.</i> , 2004	<i>Myarchus sagrae</i>	Filogenia, Sistemática	Secuencias de genes mitocondriales (ATP 6/8)	(2) STRI
Ottens-Wainright <i>et al.</i> , 2004	<i>Amazona leucocephala</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias del gen mitocondrial (Cyt b)	(19) Medio natural
Overton y Roads, 2004	<i>Todus multicolor</i>	Filogenia	Secuencias de genes mitocondriales (Cyt b, ATP 6/8) +Secuencias del gen nuclear (c-mos)	(2) ANSP; (2) Medio natural
Rusello y Amato, 2004	<i>Amazona leucocephala</i>	Filogenia, Biogeografía, Sistemática	Secuencias de genes mitocondriales (COI, 12S rDNA, and 16S rDNA) +Secuencias de genes nucleares (β -fib, RP40, TROP)	(1) AMNH
Moyle 2005	<i>Priotelus temnurus</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias de gen mitocondrial (ND2) + Secuencias de gen nuclear (RAG-1)	(2) ANSP
Sheldon <i>et al.</i> , 2005	<i>Progne cryptoleuca</i>	Filogenia	Secuencias de genes mitocondriales (ND2, Cyt b) + Secuencias de gen nuclear (β -fib)	(1) LSUMZ
Fleischer <i>et al.</i> , 2006	<i>Campephilus principalis</i>	Filogenia, Sistemática	Secuencias de genes mitocondriales (COI, Cyt b, ND2, ATP6/8, 12SrDNA)	(1) USNM, (1) MCZ
Overton y Rhoads, 2006	<i>Xiphidiopicus percussus</i>	Filogenia	Secuencias de gen mitocondrial (Cyt b)	No Especificado
Johnson <i>et al.</i> , 2007	<i>Chondrohierax wilsonii</i>	Filogenia, Sistemática	Secuencias de genes mitocondriales (Cyt b, ND2)	(1) FMNH; (2) MCZ; (1) USNM
Miller 2007	<i>Myadestes elisabeth</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias de genes mitocondriales (ATP6/8, ND2, Cyt b, COI)	(1) ANSP
DaCosta y Klicka, 2008	<i>Priotelus temnurus</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias de gen mitocondrial (ND2)	(1) ANSP
Moyle <i>et al.</i> , 2008	<i>Progne cryptoleuca</i>	Filogenia	Secuencias de gen mitocondrial (Cytb)+Secuencias del gen nuclear (β -fib)	(1) LSUMZ
Rusello <i>et al.</i> , 2010	<i>Amazona leucocephala</i>	Genética poblacional	Microsatélites + Secuencias de genes mitocondriales (CR, pND6, pGlu)	(11) AMNH; (4) Medio natural
Moore <i>et al.</i> , 2011	<i>Colaptes fernandinae</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias de genes mitocondriales (COI, Cyt b, 12S rDNA)	(1) MNHNCu

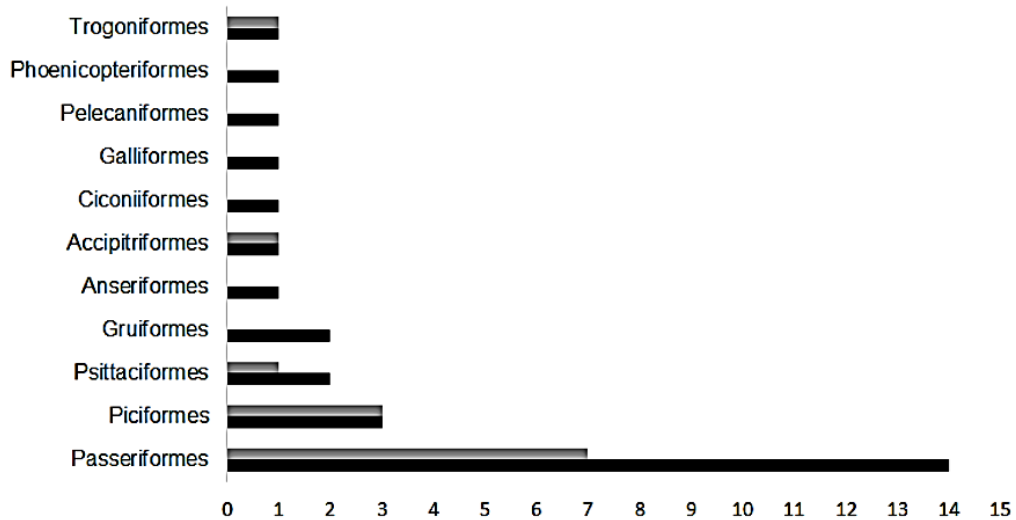
Tabla 1. Publicaciones científicas que incluyen investigaciones con marcadores moleculares en las aves de Cuba entre los años 1990-2019. Se incluyen los primeros autores, año, especie(s) bajo estudio, los marcadores empleados, el tamaño de muestra utilizado (N) y su procedencia. (Continuación)

Table 1. Scientific publications that include investigations with molecular markers in the birds of Cuba between the years 1990-2019. The first authors, year, species (s) under study, the maracadores used, the sample size used (N) and their origin are included. (Continuation)

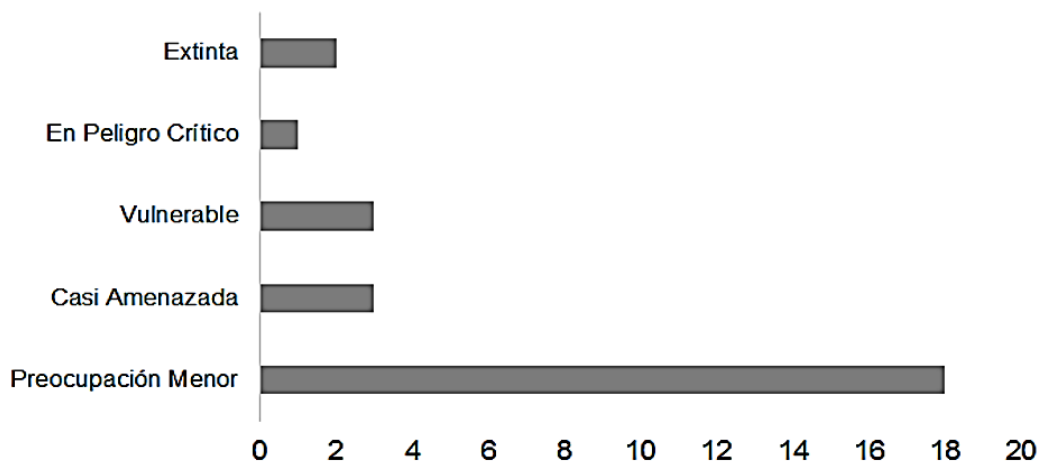
Autor, Año	Especie	Tipo de estudio	Marcador(es) empleado(s)	(N) y Procedencia
Jønsson <i>et al.</i> , 2012	<i>Corvus minutus</i>	Filogenia, Biogeografía	Secuencias de genes mitocondriales (ND2, ND3) + Secuencias de genes nucleares (ODC, GAPDH)	(1) AMNH
	<i>Corvus nasicus</i>			(1) NRM
Maley y Brumfield, 2013	<i>Rallus crepitans</i>	Filogenia, Sistemática	Secuencias de gen mitocondrial (ND2)+NGS-SNPs	(4) LSUMZ
	<i>Rallus elegans</i>			(1) LSUMZ
Powell <i>et al.</i> 2014	<i>Ptiloxena atroviolacea</i>	Filogenia, Sistemática	Secuencias de genes mitocondriales (ND2, Cyt b)	(1) FMNH
	<i>Teretistris fernandinae</i>			(1) ANSP
	<i>Icterus melanopsis</i>			(1) MNHNCu
	<i>Agelaius assimilis</i>			(1) MNHNCu
	<i>Agelaius humeralis</i>			(1) No Especificado
Frías-Soler <i>et al.</i> , 2014	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Genética poblacional	Microsatélites	(20) Medio natural
Milian-García <i>et al.</i> , 2015a	<i>Amazona leucocephala</i>	Genética poblacional	Microsatélites + Secuencias de región de control mitocondrial	(88) Individuos en cautiverio
Williford <i>et al.</i> , 2016	<i>Colinus virginianus</i>	Filogeografía	Secuencias de genes mitocondriales (ND2, CR)	(8) AMNH
Johansson <i>et al.</i> , 2018	<i>Ara tricolor</i>	Filogeografía	NGS-Mitogenómica	(2) NRM
Llanes-Quevedo <i>et al.</i> , 2018	<i>Mycteria americana</i>	Genética poblacional	Microsatélites	(37) Medio natural
Kolchanova <i>et al.</i> , 2019	<i>Amazona leucocephala</i>	Filogenia	NGS-Mitogenómica	(1) San Diego Zoo
Llanes-Quevedo <i>et al.</i> , 2019	<i>Platalea ajaja</i>	Genética poblacional	Microsatélites	(72) Medio natural

Siglas y acrónimos de genes referidos en la tabla. Genes mitocondriales: 12S/16S rDNA: secuencias codificantes de los fragmentos de RNA ribosomal 12S y 16S; ATP 6/8: ATP sintasa subunidades 6/8; COI: Citocromo oxidasa I; CR: región de control; Cyt b: Citocromo B; ND2: NADH dehidrogenasa 2. **Genes nucleares:** β -fib: beta-fibrinógeno; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfodehidrogenasa; ODC: ornitina descarboxilasa; RAG-1: gen activador de la recombinación; RP40: Proteína Ribosómica 40; TROP: α -Tropomiosina;

Siglas y acrónimos de museos referidos en la tabla: AMNH: American Museum of Natural History, USA; **ANSP:** Academy of Natural Sciences Philadelphia, USA; **FMNH:** Field Museum of Natural History, USA; **LSUMZ:** Louisiana State Museum of Natural Science, USA; **MCZ:** Museum of comparative Zoology, USA; **MNHNCu:** Museo Nacional de Historia Natural de Cuba, Cuba; **NRM:** Naturhistoriska Riksmuseet (Swedish Museum of Natural History), Sweden; **STRI:** Smithsonian Tropical Research Institute, Panama; **USNM:** National Museum of Natural History, USA.



A



B

Figura 1. Especies de aves de Cuba incluidas en los estudios moleculares realizados entre 1990 y 2019 **A:** Número de especies total (negro) y endémicas (gris), **B:** Categorías de la IUCN.

Figure 1. Cuban bird species included in molecular studies published between 1990 and 2019. **A:** Number of total (black) and endemic (gray) species. **B:** IUCN Categories.

El reconocimiento de esas especies (linajes) puede entonces afectar el entendimiento de la riqueza y el endemismo. Estos patrones dependen del concepto de especie que se utilice, pudiendo ser muy diferentes al aplicar uno u otro, así por ejemplo en el trabajo de Navarro-Sigüenza y Peterson (2004) para México, 135 especies biológicas de aves fueron divididas produciendo un total de 323 especies filogenéticas/evolutivas, 122 de las cuales serían nuevas endémicas. Este tipo de análisis permite una mejor comprensión de los procesos evolutivos y un enfoque más adecuado para la conservación. En Cuba se han identificado sobre la base de evidencia genética, especies crípticas y conflictos taxonómicos para algunos *taxa* como peces (Lara *et al.*, 2010) y anfibios (Díaz *et al.*, 2012), sin embargo, tales estudios son prácticamente inexistentes para las aves que residen de forma permanente en Cuba. Varias especies endémicas como el Carpintero Verde *Xiphidiopicus percussus* (Kirkconnell, 2000), el Sijú Platanero *Glaucidium siju* (Garrido, 2002) y el Pechero *Teretistris fornsi* (Garrido, 2000) presentan patrones de variación geográfica, indicativos de procesos evolutivos interesantes que han tenido lugar en sistemas montañosos de la isla principal del archipiélago cubano o masas de tierra cercanas a esta. La evaluación genética de tales linajes podría ser relevante, no solo para su taxonomía y conservación, sino para la comprensión de los elementos geográficos e históricos que han dirigido la evolución de la biota cubana.

Hibridación

En lo referente al estudio de la hibridación, los métodos moleculares constituyen un medio rápido y preciso de revelar las entidades taxonómicas que son permeables o están bajo erosión genética. La hibridación puede ser importante en procesos como transferencia de rasgos adaptativos (Hedrick, 2013) y el origen de nuevas especies (Schumer *et al.*, 2014), pero también puede tener efectos dañinos para alguna de las especies involucradas. Por ejemplo, la hibridación entre especies invasoras y nativas puede provocar la extinción de estas últimas (Haig *et al.*, 2011). Las aves presentan niveles relativamente altos de hibridación y se ha estimado que aproximadamente el 9% de las especies puede hibridar al menos con otra especie de la clase (Grant y Grant, 1992). En Cuba, ya se han desarrollado estudios moleculares sobre esta temáti-

ca, aplicados particularmente al cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*) y el cocodrilo americano (*C. acutus*, Milián-García *et al.*, 2015b), sin embargo, su aplicación a las aves está todavía pendiente.

Genética de poblaciones: Estructura y Conectividad

Las especies no son entidades invariables y monotípicas sino que están constituidas por poblaciones que pueden presentar una estructura histórica, ecológica y genética distinguible (Vázquez-Domínguez y Hafner, 2006). Los marcadores moleculares permiten evaluar y medir la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. De esta forma se puede prevenir o intentar revertir la pérdida de diversidad genética, la depresión por endogamia y exogamia, la fragmentación de las poblaciones y la reducción de las migraciones entre estas (Frankham, 1995). Este conocimiento es esencial para el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies y la identidad genética única de las poblaciones locales (Vázquez-Domínguez y Hafner, 2006).

Los marcadores moleculares permiten comprender los niveles relativos de diferenciación dentro y entre poblaciones, relaciones de fundador, tasas de dispersión entre subpoblaciones, tamaños efectivos poblacionales, entre otros. Por tanto, constituyen un complemento ideal a los estudios ecológicos al mejorar la comprensión de los factores demográficos y ecológicos que pueden afectar a las especies, así como la planificación de la conservación a largo plazo (Haig 1998). La caracterización genética de poblaciones de aves en Cuba es incipiente y ha estado orientada hacia aves acuáticas coloniales (Flamenco caribeño: Frías-Soler *et al.* 2014; Cayama: Llanes-Quevedo *et al.*, 2018; Seviya: Llanes-Quevedo *et al.*, 2019). A partir de estos trabajos se ha concluido que las colonias de aves cubanas estudiadas presentan, generalmente, niveles altos de variación genética, similares a los de colonias estudiadas en otras regiones del continente americano, que sostienen un mayor número de individuos. Además, estas especies presentan poblaciones que se encuentran conectadas entre sí mediante flujo genético, lo que indica que se comportan como metapoblaciones. Esto es relevante para la conservación, pues indica que los sitios de nidificación deben ser manejados y protegidos como una unidad. Se requiere, sin embargo, mejorar el estado de conocimiento de las aves endémicas, siendo especialmente intere-

santes aquellas de distribución restringida y con poblaciones alopátricas como el Cabrerito de la Ciénaga (*Torreornis inexpectata*), el Zunzuncito (*Calypte helena*) y los Caos Montero y Pinalero (*Corvus nasicus* y *C. palmarum*, respectivamente).

Parentesco y Sistemas de apareamiento

Otras características importantes de las poblaciones que pueden ser abordadas mediante las técnicas moleculares, son la composición por sexos y las estrategias de apareamiento. Estos son parámetros poblacionales importantes debido a que influyen en su tamaño efectivo y por tanto, en su conservación (Haig *et al.*, 2011; Palstra y Fraser, 2012). Los métodos de sexado molecular en aves, son robustos y prácticamente universales (*e.g.* Griffiths *et al.*, 1998). Estos presentan ventajas sobre otras técnicas tradicionales, debido a su inocuidad, la reducción del tiempo de manipulación, el estrés provocado al ave durante el muestreo, y la seguridad de identificación, aun en especies monomórficas (Matta *et al.*, 2008). Por otra parte, con las técnicas moleculares puede realizarse el estudio de las formas de apareamiento en ausencia de información de los parentales, basado en el análisis de las relaciones de parentesco de la descendencia (Miño *et al.*, 2011). Varios estudios de este tipo han demostrado que el sistema de reproducción en algunas especies de aves es diferente a la monogamia que se observa desde el punto de vista conductual (Griffith *et al.*, 2002; Miño *et al.*, 2011). Incluso, se plantea que siete de cada diez especies presentan algún grado de paternidad múltiple (García-González, 2009). En Cuba, la determinación genética del parentesco y la identificación de sistemas de apareamiento es escasa (Cotorra cubana: Milián-García *et al.*, 2015a; Seviya: Llanes-Quevedo *et al.*, 2019; Cayama: Alfonso González, 2017), sin embargo, los trabajos realizados dan a conocer aspectos interesantes de la biología reproductiva de esas especies, que pueden ser relevantes para la planeación de su manejo *ex-situ*.

Otras aplicaciones

Existe un grupo importante de aplicaciones que no detallaremos aquí como la evolución molecular y genómica comparativa, expresión genética y análisis de transcriptomas (Lerner y Fleischer, 2010); además, de estudios de manejo de metapoblaciones, conectividad migratoria, genética del paisaje, ecotoxicología (Haig

et al. 2011), epigenética (David *et al.* 2017; Frésard *et al.* 2013) y la interacción genética-cambio climático.

Oportunidades actuales para el desarrollo de trabajos moleculares con aves en Cuba

Los avances de las técnicas de trabajo con el DNA ofrecen oportunidades crecientes para su aprovechamiento en las condiciones de trabajo imperantes en la actualidad cubana. Uno de los elementos que podrían tener mayor impacto, es la posibilidad de emplear una gran variedad de muestras diferentes para la obtención de DNA, debido a la optimización de métodos de extracción. Las nuevas técnicas permiten aprovechar muestras procedentes del campo (sangre, plumas en crecimiento, plumas mudadas) y de colecciones (plumas, fragmentos de piel o cojinetes de las patas). Por otra parte, las técnicas de NGS permiten obtener los genomas completos de organismos o representaciones reducidas de estos, a partir de muestras como las referidas previamente, aun con cierto grado de degradación y antigüedad.

Si bien los costos asociados a estos métodos (especialmente la secuenciación masiva) todavía son prohibitivos para varias instituciones de investigación cubanas, estos tienden a abaratare con el paso del tiempo y la estandarización de las técnicas y procedimientos de laboratorio. La necesidad para el uso de técnicas moleculares puede constituir un incentivo para la exploración y ejecución de colaboraciones dentro de Cuba y con entidades foráneas a fin de formar nuevas capacidades y fortalecer la investigación ornitológica en el país.

Aprovechamiento de muestras recolectadas en el campo

Se ha descrito el empleo de varios tipos de muestras como cáscaras de huevo, restos óseos, escamas, regurgitados, heces y plumas mudadas para trabajos moleculares en aves. Estas pueden usarse para identificar la presencia de especies raras o elusivas, así como para realizar estudios de *taxa* cuyo muestreo por cuestiones de riesgo de extinción o comportamiento son poco prácticos. A partir del análisis de estas muestras, se puede realizar el conteo e identificación de individuos, la determinación del género, identificación de elementos de la dieta, la evaluación de la diversidad genética,

la estructura poblacional y los sistemas de apareamiento (Waits y Paetkau, 2005). A continuación, nos enfocaremos en el empleo de plumas mudadas y recomendamos trabajos como los de Waits y Paetkau (2005), Karp *et al.* (2012) y Baus *et al.* (2019) para encontrar ejemplos de las aplicaciones de otros tipos de muestras y recomendaciones para su uso.

Hasta la fecha se han realizado varios estudios sobre la base del análisis genético de plumas mudadas en varias especies de aves, si bien este tipo de muestras podrían parecer poco útiles o fiables por la ausencia de evidencia directa del individuo de procedencia o su estado de conservación (*e.g.* Horváth *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2008; Miño y Del Lama, 2009). De hecho, la recolección sistemática de plumas es altamente recomendable por su potencial para la investigación (Smith *et al.*, 2003).

Respecto a la procedencia de las plumas, puede existir el riesgo de muestrear repetidamente a los mismos individuos. Para reducir esta incertidumbre, se recomienda reducir la densidad de muestreo a, aproximadamente, una muestra por rango hogareño medio de la especie en cuestión, o usar plumas grandes, de vuelo o de la cola (Seki, 2006). En cualquier caso, es posible utilizar marcadores nucleares, como *loci* microsatélites, para la identificación individual y para verificar posibles pseudoréplicas en el muestreo (Seki, 2006). En relación al estado de preservación, este puede afectar de manera importante el trabajo molecular por la degradación o baja concentración del DNA y la presencia de inhibidores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Estos elementos pueden conducir a un éxito limitado en la amplificación de marcadores nucleares (Bush *et al.*, 2005). Sin embargo, una parte considerable de los trabajos realizados con plumas mudadas han obtenido buena calidad y cantidad de DNA (Horváth *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2008; Miño y Del Lama, 2009), aun en condiciones extremas como las presentes en los humedales, (Miño y Del Lama, 2009).

Los rendimientos de las extracciones de DNA pueden ser maximizados cuando se utilizan de las plumas de la cola respecto a las remeras primarias, secundarias y plumas más pequeñas (De Volo *et al.*, 2008).

Empleo de especímenes de colecciones en trabajos moleculares

Los especímenes depositados en las colecciones ornitológicas pueden ser una fuente valiosa de DNA. Para ello solo se requiere realizar modificaciones a los *kits* comerciales comúnmente empleados para extraer DNA de muestras frescas (Irestedt *et al.* 2006; McCormack *et al.* 2016; Anmarkrud y Lifjeld 2017). Estas modificaciones comprenden: 1) aumento del tiempo de digestión con proteinasa K; 2) aumento de las concentraciones de las enzimas y tampones empleados; 3) tratamiento previo con tampón STE y DTT; 4) precalentamiento de tampón de elución y 5) doble paso de elución (Irestedt *et al.* 2006; McCormack *et al.* 2016; Anmarkrud y Lifjeld, 2017). Con la aplicación de estos protocolos y los métodos de secuenciación de Sanger o los de NGS, se han llegado a procesar exitosamente especímenes de hasta 120 años de antigüedad (*e.g.*, McCormack *et al.*, 2016) y secuenciar mitogenomas de especies extintas como *Ectopistes migratorius*, *Campephilus imperialis* (Anmarkrud y Lifjeld 2017) y *Ara tricolor* (Johansson *et al.*, 2018). Este tipo de trabajo abre la posibilidad de realizar estudios filogenéticos y de tipo comparativo entre las poblaciones pasadas y presentes de diferentes especies.

Aunque la mayor parte de los especímenes cubanos se encuentran en colecciones estadounidenses y europeas (un total de 11 055), en Cuba, existen 18 colecciones ornitológicas, con aproximadamente 10 400 especímenes, incluyendo más de 40 tipos (Wiley *et al.*, 2008). Estas colecciones contienen representantes de 21 órdenes, 63 familias y 352 especies nativas de Cuba, y otras 133 especies foráneas. Además, incluyen una treintena de especies con algún grado de amenaza, así como las extintas *Ectopistes migratorius* y *Ara tricolor* (Wiley *et al.*, 2008). Las colecciones cubanas han sido poco utilizadas por los científicos nacionales (Wiley *et al.*, 2008, García-Lau y Gonzalez 2016), y esto es especialmente notable en el caso del trabajo con marcadores moleculares. Solo la colección del Museo Nacional de Historia Natural de Cuba ha sido aprovechada para este tipo de estudios (cinco especímenes, cuatro publicaciones). Las colecciones ornitológicas de Cuba pueden y deben ser empleadas en mayor medida para los trabajos con marcadores moleculares y de otro tipo, que permitan reincorporar a la vida útil especímenes valiosos que conforme pasa el tiempo pueden perderse o deteriorarse. Según Wiley *et al.*, (2008) casi el 20% de los especímenes en

Cuba está en regulares o malas condiciones y un número sustancial de especímenes en la mayoría de las colecciones carecen de datos críticos (22% de especímenes carecen de datos de localidad y 30% de fechas de recolección). Además, se requieren mayores esfuerzos para el completamiento del muestreo y la representación de especies y poblaciones de aves cubanas.

Potencialidades de los métodos de secuenciación paralela masiva

Existe un número importante de marcadores de DNA que han sido aplicados a diversos estudios de la biodiversidad. Su naturaleza y espectro de aplicación ha sido objeto de múltiples trabajos (*e.g.*, Karp *et al.*, 1997; Karp *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012), sin embargo, esta sección se enfoca en el uso de NGS que es el conjunto de métodos más poderoso para generar marcadores de DNA en la actualidad (Yang *et al.*, 2012).

Existen varias plataformas de NGS, entre las que se destacan las desarrolladas por Illumina, *Pacific Biosciences*, *Oxford Nanopore* entre otras. Para comparar las particularidades de estas, recomendamos textos como Liu *et al.* (2012), Quail *et al.* (2012) y Goodwin *et al.* (2016). Los métodos de NGS proporcionan una forma, eficiente de generar grandes cantidades de datos de secuencias con precios entre 22 y 1 000 \$ USD por Gpb (de sus siglas en inglés, *Giga base pairs* = 1 000 000 000 pares de bases) (Goodwin *et al.*, 2016). Los tiempos de ejecución de las corridas pueden variar entre 20 minutos hasta algunas semanas y producen una elevada precisión (entre 87-99.9%) en dependencia de la plataforma empleada (Liu *et al.*, 2012; Quail *et al.*, 2012). La precisión está referida a la probabilidad de cometer un error al secuenciar una base por cada 100, sin embargo, este error puede ser fácilmente corregido dado que para cada secuencia se obtienen múltiples copias, lo que permite compararlas entre sí e identificar y descartar errores del equipo de secuenciación.

Los métodos de NGS permiten obtener genomas completos o conjuntos de secuencias de este (que usualmente cubren entre el 2-10% del genoma) cuya procedencia y características dependen de la plataforma con la que fueron generados (Goodwin *et al.*, 2016). La secuenciación de genomas completos permite realizar estudios de reconstrucción filogenética

profunda de las aves así como de la evolución molecular de genes y caracteres (*e.g.*, Zhang *et al.*, 2014; Jarvis *et al.* 2014), sin embargo para propósitos como los mencionados en la sección anterior (estudios poblacionales, filogenias poco profundas) pueden ser más eficientes métodos de secuenciación reducida del genoma como la de Elementos Ultraconservados (UCEs, por sus siglas en inglés) y la de DNA asociado a sitios de restricción (RADseq). Los UCEs son regiones (secuencias) altamente conservadas (en algunos casos hasta en un 100%) en los genomas de organismos distantes evolutivamente (Bejerano *et al.*, 2004). Estas secuencias se encuentran distribuidas en todo el genoma y tienen poca superposición con genes parálogos conocidos (genes originados por eventos de duplicación) (Derti *et al.*, 2006). Además, proveen señal filogenética útil en múltiples escalas de tiempo evolutivas debido a que, aunque son marcadores muy conservados su variabilidad aumenta hacia los extremos de las secuencias (Faircloth *et al.*, 2012). Los métodos de RADseq, por otro lado, permiten la obtención de secuencias cortas flanqueadas por sitios de corte de enzimas de restricción. Estos métodos son relativamente rápidos, baratos y pueden emplearse con o sin conocimiento de un genoma de referencia. Dado que la información producida está compuesta por millones de secuencias, permite la realización de inferencias filogenéticas a partir de modelos de sustitución de nucleótidos, aunque la longitud de cada *locus* individual es relativamente corta. También pueden ser utilizados para cuantificar el número de alelos y heterocigosidad, permitiendo la realización de inferencias filogenéticas y de estructura poblacional con el mismo conjunto de datos (Ree y Hipp, 2015; Pante *et al.*, 2015).

Los marcadores revelados por NGS pueden ser útiles, en la búsqueda de la base genética de la variación fenotípica ecológicamente importante (mapeo de *loci* de rasgos cuantitativos: QTL) o estudios de asociación de genoma completo (GWAS). Desde el punto de vista de la conservación, la identificación de secuencias (candidatas) que se encuentran bajo selección para determinadas condiciones ambientales es muy relevante pues permitiría conservar información genética funcionalmente importante. Los estudios en *loci* ecológicamente relevantes permiten identificar unidades taxonómicas de interés para la conservación (Ekblom y Galindo, 2011). Otras de las aplicaciones de los métodos de NGS son los estudios de "códigos de barras" (*barcoding*), de regulación de genes,

interacciones DNA-proteína, epigenética, entre otros (Ekblom y Galindo, 2011).

CONCLUSIONES

Los estudios con marcadores moleculares son importantes para entender mejor la riqueza y los procesos evolutivos actuales y pasados que han conformado la avifauna cubana. Aunque estos métodos no han sido utilizados ampliamente por la comunidad ornitológica en Cuba existen potencialidades para revertir esta realidad. Es importante revalorizar las colecciones biológicas y mejorarlas mediante actividades de colecta sistemáticas bien diseñadas y teniendo en cuenta los objetivos de investigación y conservación. La obtención de información molecular mediante NGS más que un reto inalcanzable debe asumirse como un impulso al conocimiento de la ornitología cubana, que puede contribuir a su conservación, para lo cual se debe estimular la colaboración entre diferentes instituciones y la realización de proyectos integrales que permitan complementar las líneas actuales de investigación y fortalecer la ornitología hecha desde Cuba.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Adolfo Navarro-Sigüenza, Massiel Alfonso González, al Editor y dos revisores anónimos por sus valiosos comentarios en la revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Acosta, M., L. Mugica, O. Torres, D. Denis, A. Jiménez *et al.* (2004). Current status of Cuban threatened birds: case studies of conservation programs. *J. Caribb. Ornithol.* 17(1): 52-58.
- Alfonso González, M. (2017). Caracterización genética y sistemas de apareamiento de colonias de nidificación de *Mycteria americana* (Aves: Ciconiidae) en Cuba. Tesis de Diploma, Universidad de La Habana, Cuba.
- Anmarkrud, J.A. y J.T. Lifjeld (2017). Complete mitochondrial genomes of eleven extinct or possibly extinct bird species. *Mol. Ecol. Resour.* 17(2): 334-341.
- Baus, I., C. I. Miño, y O. Monge (2019). Current trends in the application of non-invasive genetic sampling to study Neotropical birds: Uses, goals, and conservation potential. *Avian Biol. Res.* 12(4): 125-132.
- Bejerano, G., M. Pheasant, I. Makunin, S. Stephen *et al.* (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science.* 304(5675): 1321-1325.
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. Ng, *et al.* (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22(3): 148-155.
- Birkhead, T. R. e I. Charmantier (2001). History of Ornithology. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Bush, K. L., M.D. Vinsky, C.L. Aldridge y C.A. Paszkowski (2005) A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conserv. Genet.* 6(5): 867-870.
- DaCosta, J. M. y J. Klicka (2008). The Great American Interchange in birds: a phylogenetic perspective with the genus Trogon. *Mol. Ecol.* 17(5): 1328-1343.
- David, S.A., M. Mersch, S. Foissac, A. Collin *et al.* (2017). Genome-wide epigenetic studies in chicken: A Review. *Epigenomes.* 1(3): 20.
- De Volo, S. B., R. T. Reynolds, M. R. Douglas, y M.F. Antolin (2008). An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. *The Condor.* 110(4): 762-766.
- Denis, D., L. Mugica, A. Rodríguez, M. Acosta *et al.* (2005). Lista y comentarios acerca de la avifauna de la ciénaga de Birama, Cuba. *Biología.* 19(1-2): 66-73.
- Derti, A., F.P. Roth, G.M. Church y C.T. Wu (2006). Mammalian ultraconserved elements are strongly depleted among segmental duplications and copy number variants. *Nat. Genet.* 38(10): 1216.
- Díaz, L. M., S. B. Hedges, y M. Schmid (2012). A new cryptic species of the genus *Eleutherodactylus* (Amphibia: Anura: Eleutherodactylidae) from Cuba. *Zootaxa* 3220(1): 44-60.
- Ekblom, R. y J. Galindo (2011) Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity.* 107(1): 1.
- Espinosa de los Monteros, A. (1998). Phylogenetic relationships among the trogons. *The Auk* 115(4): 937-954.
- Fleischer, R. C., J. J. Kirchman, J. P. Dumbacher, L. Bevier *et al.* (2006). Mid-Pleistocene divergence of Cuban and North American ivory-billed woodpeckers. *Biology letters* 2(3): 466-469.
- Faircloth, B.C., J.E. McCormack, N.G. Crawford, M.G. Harvey *et al.* (2012). Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Syst. Biol.* 61(5): 717-726.
- Frankham, R. (1995) Conservation genetics. *Annu. Rev. Genet.* 29(1): 305-327.
- Frésard, L., M. Morisson, J.M. Brun, A. Collin *et al.* (2013). Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. *Genet. Sel. Evol.* 45(1): 16.
- Frias-Soler, R., E. Tindle, G. Espinosa-Lopez, S., A. Blomberg *et al.* (2014) Genetic and phenotypic evidence supports evolutionary divergence of the American Flamingo (*Phoenicopterus ruber*) population in the Galápagos Islands. *Waterbirds.* 37(4): 349-469.

- García-González, F. (2009): Selección Sexual Post-Cópula y la Evolución de la Poliandria. En: Dopazo, H. y A. Navarro (Eds.): *Adaptación y Evolución. 150 años después del Origen de las Especies*. Pp. 281-289. Sociedad Española de Biología Evolutiva, Obrapropia Editorial, Barcelona.
- García Lau, I. y A. Gonzalez Alfonso (2016). Composición de la colección científica de aves del Museo de Historia Natural Felipe Poey, Universidad de la Habana. *Rev. Cub. Cien. Biol.* 4 (3): 36-42.
- Garrido O.H. (2000) A new species of Oriente Warbler *Teretris fornsi* from Pico Turquino, Cuba, with ecological comments on the genus. *Cotinga* 14: 88-93.
- Garrido O.H. (2002) Subespecie nueva de sijú platanero (*Glaucidium siju*) para Cuba (Aves: Strigidae), con comentarios sobre otras especies de la familia. *Solenodon* 2: 45-52.
- Garrido, O.H. y F. García Montaña (1975). Catálogo de las Aves de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba, La Habana, Cuba. 149 pp.
- Garrido, O. H., J. W. Wiley y A. Kirkconnell (2005) The genus *Icterus* in the West Indies. *Ornitol. Neotrop.* 16: 449-470.
- Garrido, O.H. y A. Kirkconnell (2010) *Aves de Cuba*. Cornell University Press, Ithaca, USA. 287 pp.
- Gerbracht, J., y A. Levesque (2019) The complete checklist of the birds of the West Indies: v1.1. BirdsCaribbean Checklist Committee. Disponible en: https://www.birdscaribbean.org/wp-content/uploads/2019/10/Complete_WIChecklist_v1-1.pdf. Último acceso: 11 de diciembre de 2020.
- Gill F, D Donsker & P Rasmussen (Eds). 2020. IOC World Bird List (v10.1). doi : 10.14344/IOC.ML.10.1. Disponible en: <https://www.worldbirdnames.org/>. Último acceso: 11 de diciembre de 2020.
- González, H., L. Rodríguez Shettino, A. Rodríguez, C. A. Mancina y I. Ramos García (2012) Libro Rojo de los vertebrados de Cuba. Editorial Academia. La Habana, Cuba. 304 pp.
- González, H., S. A. Llanes, O. B. Sánchez, B. Rodríguez *et al.* (2002). *Aves de Cuba*. Instituto de Ecología y Sistemática. UPC Print, Vassa, Finlandia.
- Goodwin, S., J.D. McPherson y W.R. McCombie (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17(6): 333.
- Grant, P.R. y B.R. Grant (1992). Hybridization of bird species. *Science*, 256(5054): 193-197.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr y R. J. Dawson (1998). A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7(8):1071-1075.
- Griffith, S. C., I. P. Owens y K. A. Thuman (2002) Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol. Ecol.* 11(11): 2195-2212.
- Gundlach, J.C. (1876) Contribución a la Ornitología Cubana. Imprenta "La Antilla" de N. Cacho-Negrete, Cuba. 364 pp.
- Haig, S. M. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79(2): 413-425.
- Haig, S.M., W.M. Bronaugh, R.S. Crowhurst, J. D'elia *et al.* (2011). Genetic applications in avian conservation. *The Auk*. 128(2): 205-229.
- Hedrick, P.W. (2013). Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Mol. Ecol.* 22(18): 4606-4618.
- Horváth, M. B., B. Martínez-Cruz, J.J. Negro, L. Kalmár *et al.* (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *J. Avian Biol.* 36(1): 84-88.
- Irestedt, M., J.I. Ohlson, D. Zuccon, M. Kallersjo *et al.* (2006). Nuclear DNA from old collections of avian study skins reveals the evolutionary history of the Old World suboscines (Aves, Passeriformes). *Zool. Scr* 35(6): 567-580.
- IUCN (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-1. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>. Último acceso: 11 de diciembre de 2020.
- Jarvis, E.D., S. Mirarab, A.J. Aberer, B. Li *et al.* (2014). Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science* 346 (6215):1320-1331.
- Johansson, U. S., P. G. Ericson, M. P. Blom, y M. Irestedt (2018). The phylogenetic position of the extinct Cuban Macaw *Ara tricolor* based on complete mitochondrial genome sequences. *Ibis*. 160(3): 666-672.
- Johnson, J. A., R. Thorstrom y D. P. Mindell (2007). Systematics and conservation of the hook-billed kite including the island taxa from Cuba and Grenada. *Anim. Conserv.* 10(3): 349-359.
- Jønsson, K. A., P. H. Fabre y M. Irestedt (2012). Brains, tools, innovation and biogeography in crows and ravens. *BMC Evol. Biol.* 12(1): 72.
- Joseph, L., Wilke, T., Bermingham, E., Alpers, D. y Ricklefs, R. (2004). Towards a phylogenetic framework for the evolution of shakes, rattles, and rolls in *Myiarchus tyrant-flycatchers* (Aves: Passeriformes: Tyrannidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 31(1):139-152.
- Karp, A., K.J. Edwards, M. Bruford, S. Funk *et al.* (1997) Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nat. Biotechnol.* 15(7): 625.
- Karp, A., D.S. Ingram y P.G. Isaac (Eds.) (2012). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Springer Science & Business Media. 498 pp.
- Kirkconnell, A. (2000). Variación morfológica del Carpintero Verde *Xiphidiopicus percussus* en Cuba. *Cotinga* 14: 94-98.
- Klein, N. K., K. J. Burns, S. J. Hackett y C. S. Griffiths (2004) Molecular phylogenetic relationships among the wood warblers (Parulidae) and historical biogeography in the Caribbean basin. *J. Caribb. Ornithol.* 17(1): 3-17.
- Kolchanova, S., S. Kliver, A. Komissarov, P. Dobrinin *et al.* (2019) Genomes of Three Closely Related Caribbean Amazons Provide Insight for Species History and Conservation. *Genes*. 10 (1): 54.

- Lanyon S.M. y K.E. Omland (1999) A molecular phylogeny of the blackbirds (Icteridae): five lineages revealed by cytochrome-b sequence data. *The Auk*. 116(3): 629-639.
- Lara, A., J. L. Ponce de León, R. Rodríguez, D. Casane *et al.* (2010) DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 421-430.
- Lerner, H.R. y R.C. Fleischer (2010) Prospects for the use of next-generation sequencing methods in ornithology. *The Auk*. 127(1): 4-15.
- Liu, L., Y. Li, S. Li, N. Hu *et al.* (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 1-13.
- Llanes-Quevedo, A., M. Alfonso, R. Cárdenas, C. Frankel *et al.* (2018). Microsatellite variability of the wood stork *Mycteria americana* (Aves, Ciconiidae) in Cuba: implications for its conservation. *Anim Biodiv Conserv.* 41(2): 357-364.
- Llanes-Quevedo, A., M.A. Gutiérrez, R.F. Cárdenas, E. Lamarté *et al.* (2019). Population Genetics and Mating System of Cuban Breeding Colonies of Roseate Spoonbill (*Platalea ajaja*). *Waterbirds* 42: 343-351.
- Lougheed, S. C., J. R. Freeland, P. Handford y P.T. Boag. (2000). A molecular phylogeny of warbling-finches (Poospiza): paraphyly in a Neotropical emberizid genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17(3): 367-378.
- Lovette, I. J., E. Bermingham, G. Seutin y R.E. Ricklefs (1998). Evolutionary differentiation in three endemic West Indian warblers. *The Auk*. 115(4): 890-903.
- Maley, J. M., y R. T. Brumfield (2013). Mitochondrial and Next-Generation Sequence Data used to Infer Phylogenetic Relationships and Species Limits in the Clapper/King Rail Complex: *R. longirostris/R. elegans*. *The Condor* 115(2): 316-329.
- Matta, N., N. Ramírez, B. Zúñiga y V. Vera (2008). Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta Biológica Colombiana*, 13(2): 27-40.
- McCormack, J. E., W.L. Tsai y B.C. Faircloth (2016). Sequence capture of ultraconserved elements from bird museum specimens. *Mol Ecol Resour.* 16(5): 1189-1203.
- McNeely J., K. Miller, W. Reid, R. Mittermeier *et al.* (1990) *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, WRI, CI, WWF-US, The World Bank. 193 pp.
- Miller, M. J., Bermingham, E., Ricklefs, R. E. (2007). Historical biogeography of the new world solitaires (*Myadestes* spp). *The Auk*. 124(3): 868-885.
- Milián-García, Y., E.L. Jensen, J. Madsen, S. Álvarez Alonso *et al.* (2015a) Founded: genetic reconstruction of lineage diversity and kinship informs ex situ conservation of Cuban Amazon parrots (*Amazona leucocephala*). *J. Hered.* 106(1): 573-579.
- Milián-García, Y., R. Ramos-Targarona, E. Pérez-Fleitas, G. Sosa-Rodríguez *et al.* (2015b). Genetic evidence of hybridization between the critically endangered Cuban crocodile and the American crocodile: implications for population history and in situ/ex situ conservation. *Heredity* 114(3): 272.
- Miño, C.I., y S.N. Del Lama (2009). Molted feathers as a source of DNA for genetic studies in waterbird populations. *Waterbirds*. 32(2): 322-329.
- Miño, C. I., M. A. Russello, P. F. M. Gonçalves, y S.N. Del Lama (2011). Reconstructing genetic mating systems in the absence of parental information in colonially breeding waterbirds. *BMC Evol. Biol.* 11(1): 196.
- Moore, W.S., L.C. Overton y K.J. Miglia (2011). Mitochondrial DNA based phylogeny of the woodpecker genera *Colaptes* and *Piculus*, and implications for the history of woodpecker diversification in South America. *Mol Phylogenet Evol.* 58(1): 76-84.
- Moyle R.G. (2005). Phylogeny and biogeographical history of Trogoniformes, a pantropical bird order. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84(4): 725-738.
- Moyle, R. G., B. Slikas, L.A. Whittingham, D.W. Winkler *et al.* (2008) DNA sequence assessment of phylogenetic relationships among New World martins (Hirundinidae: Progne). *The Wilson Journal of Ornithology*. 120(4): 683-692.
- Mugica, L., G. Espinosa y M. Acosta (1992). Relaciones entre poblaciones de *Dendrocygna bicolor* (Viellot, Aves: Anatidae) sobre la base de los patrones electroforéticos de esterazas de hígado y miógeno. *Cien. Biol.* 24: 95-104.
- Mugica, L., M. Acosta, A. Jiménez, y A. Rodríguez (2012). Current knowledge and conservation of Cuban waterbirds and their habitats. *J. Caribb. Ornithol.* 25(2): 64-76.
- Navarro, N. (2015) *Aves endémicas de Cuba. Guía de Campo*. Ediciones Nuevos Mundos.
- Navarro, N. (2019) *Annotated Checklist of the Birds of Cuba*. Ediciones Nuevos Mundos. The Friendship Association. USA. 58pp.
- Navarro-Sigüenza, A. G., y A.T. Peterson (2004). An alternative species taxonomy of the birds of Mexico. *Biota Neotropica*, 4 (2): 1-32.
- Omland, K.E., S.M. Lanyon y S.J. Fritz (1999). A molecular phylogeny of the New World orioles (Icterus): the importance of dense taxon sampling. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12(2): 224-239.
- Ottens-Wainright, P., K.M. Halanych, J.R. Eberhard, R.I. Burke *et al.* (2004). Independent geographic origins of the genus *Amazona* in the West Indies. *J. Caribb. Ornithol.* 17(1): 23-49.
- Overton, L.C. y D.D. Rhoads (2004). Molecular phylogenetic relationships based on mitochondrial and nuclear gene sequences for the Todies (*Todus*, Todidae) of the Caribbean. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32 (2): 524-538.

- Overton, L.C. y D.D. Rhoads (2006). Molecular phylogenetic relationships of *Xiphidiopicus percussus*, *Melanerpes*, and *Sphyrapicus* (Aves: Picidae) based on cytochrome b sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41(2): 288-294.
- Palstra, F. P. y D. J. Fraser (2012). Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal. *Ecology and Evolution.* 2(9): 2357-2365.
- Pante, E., J. Abdelkrim, A. Viricel, D. Gey *et al.* (2015). Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity* 114(5): 450-459.
- Parada, A., A. García-Quintas, E. Socarras, y O. Martínez (2013). Adiciones a las avifaunas de las cayerías norte y sur de las provincias de Ciego de Ávila y Camagüey, Cuba. *Rev. Cub. Cien. Biol.* 2: 51-57.
- Pérez Mena, E. E. y E. C. Mora (2011). Geographic song variation in the non-oscine Cuban Tody (*Todus multicolor*). *The Wilson Journal of Ornithology.* 123(1): 76-84.
- Peris, S.J. (2011). La biodiversidad de aves en Cuba. *Cuadernos de Biodiversidad* 10: 4-9.
- Powell, A.F., F.K. Barker, S.M. Lanyon, K.J. Burns *et al.* (2014). A comprehensive species-level molecular phylogeny of the New World blackbirds (Icteridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 71: 94-112.
- Quail, M.A., M. Smith, P. Coupland, T.D. Otto *et al.* (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics.* 13(1): 341-354.
- Raza S., S. Farooqi y H. Mubeen (2015). Role of Molecular Markers and their Significance. *American Journal of Pharmacy & Health Research.* 3: 12.
- Raza, S., M. W. Shoab y H. Mubeen (2016). Genetic Markers: Importance, uses and applications. *International Journal of Scientific Research Publications.* 6(3): 221-2250.
- Ree, R.H. y A.L. Hipp (2015) Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq). En: Hörandl E. y M.S. Appelhans (Eds.): *Next-Generation Sequencing in Plant Systematics.* Pp: 181-204. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Alemania.
- Rudnick, J.A., T.E. Katzner, E.A. Bragin y J.A. DeWoody (2008). A noninvasive genetic evaluation of population size, natal philopatry and roosting behavior of non-breeding eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*) in Central Asia. *Conservation Genetics* 9: 667-676.
- Russello, M.A., C. Stahala, D. Lalonde, K.L. Schmidt *et al.* (2010). Cryptic diversity and conservation units in the Bahama Parrot. *Conservation Genetics* 11: 1809-1821.
- Russello, M.A., y G. Amato (2004). A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30(2): 421-437.
- Sánchez, B. (2005) Inventario de la avifauna de Topes de Colantes, Sancti Spiritus, Cuba. *J. Caribb. Ornithol.* 18: 7-12.
- Schumer, M., G.G. Rosenthal y P. Andolfatto (2014). How common is homoploid hybrid speciation? *Evolution.* 68(6): 1553-1560.
- Seki, S. I. (2006). Application of molted feathers as noninvasive samples to studies on the genetic structure of pigeons (Aves: Columbidae). *Journal of Forest Research.* 11: 125-129.
- Sheldon, F.H., L.A. Whittingham, R.G. Moyle, B. Slikas *et al.* (2005). Phylogeny of swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35(1): 254-270.
- Smith, T.B., P.P. Marra, M.R. Webster, I. Lovette *et al.* (2003). A call for feather sampling. *The Auk* 120(1): 218-221.
- Toews, D.P., L. Campagna, S.A. Taylor, C.N. Balakrishnan *et al.* (2015). Genomic approaches to understanding population divergence and speciation in birds. *The Auk* 133(1): 13-30.
- Vázquez-Domínguez, E. y D.J. Hafner (Eds.) (2006). *Genética y Mamíferos Mexicanos: Presente y Futuro.* New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin. 32(32): 67-73.
- Waits, L.P. y D. Paetkau (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management.* 69(4): 1419-1433.
- Wiley, J.W., R.A. Román, A.R. Beceña, C.P. Rodríguez *et al.* (2008). The bird collections of Cuba. *Bulletin of the British Ornithologists' Club.* 128(1): 17-27.
- Williford, D., R.W. Deyoung, R.L. Honeycutt, L.A. Brennan *et al.* (2016). Phylogeography of the bobwhite (*Colinus*) quails. *Wildlife Monographs.* 193(1): 1-49.
- Yang, H., Y. Tao, Z. Zheng, C. Li *et al.* (2012). Application of next-generation sequencing for rapid marker development in molecular plant breeding: a case study on anthracnose disease resistance in *Lupinus angustifolius* L. *BMC Genomics.* 13(1): 318-329.
- Zhang, G., C. Li, Q. Li, B. Li, *et al.* (2014). Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science.* 346(6215): 1311-1320.

