

INFORME FINAL

Determinación de la variabilidad genética del paujil de pico azul (*Crax alberti*) por medio de secuencias microsatélites

Contrato 5918

Elaborado por:
Luz Adriana Ramírez Arias
Brian Carl Bock

Interventor:
Gildardo Alberto Franco Sierra
Subdirección Territorial

2005



Entidades de Apoyo

Corporación Autónoma Regional para el Centro de Antioquia, CORANTIOQUIA.

Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt, a través de sus Becas para especies amenazadas.

Laboratorio de Biología Molecular / Banco de Tejidos del Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt.

Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada gracias a la financiación otorgada por la Corporación Autónoma Regional para el Centro de Antioquia, CORANTIOQUIA (contrato 5918) y por el Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt, a través del programa de Becas para especies amenazadas (contrato 23). Los más sinceros agradecimientos al Laboratorio de Biología Molecular / Banco de Tejidos del Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt por permitir el uso de sus equipos e instalaciones y a todo el personal que allí encontré por su colaboración y amistad. Al director de tesis y asesores por su permanente apoyo y paciencia durante la realización de esta investigación; al interventor del proyecto por su disposición permanente para facilitar el normal desarrollo del proyecto. A las Fundaciones: Ecolombia, Zoológico de Cali, Zoológica y Botánica de Barranquilla por permitir la toma de muestras de los ejemplares que allí permanecen; de igual forma a todos las personas que encontré en los diferentes municipios de Antioquia y Córdoba por su amabilidad, colaboración y por permitirme conocer parte de la realidad del país. Finalmente a mis compañero de la Maestría por su apoyo moral, a mi familia, a Juan y a todas las personas que “indirectamente” colaboraron con este sueño.

Contenido

Contenido

Resumen

Lista de Figuras

Lista de Tablas y Anexos

INTRODUCCIÓN

MÉTODOS

Sitio de Muestreo

Extracción ADN

Reacción de PCR

Separación de producto de PCR en gel de archilamida.

RESULTADOS

Extracción ADN

Reacción de PCR

Separación de producto de PCR en gel de acrilamida

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Lista de Figuras

Figura 1. Regiones donde se tomaron muestras de sangre de *Crax alberti*

Figura 2. ADN total de *C. alberti*

Figura 3. Amplificación microsatélite CgAAT62 en *Crax alberti*.

Figura 4. Gel de poliacrilamida microsatélite CgAAT190 en *Crax alberti*

Figura5. Dendrograma similaridad *Crax alberti* Individuos en cautiverio en Colombia

Figura6 Dendrograma similaridad *Crax alberti* Procedencia conocida

Figura7. Dendrograma, similaridad *Crax alberti*

Programa de cría en cautiverio

Figura8. Dendrograma sSimilaridad *Crax alberti*

Individuos en cautiverio en el Zoológico de Cali

Figura8. Dendrograma sSimilaridad *Crax alberti*

Individuos en cautiverio en la

Fundación Zoológica y Botánica de Barranquilla

Lista de Tablas

Tabla 1. Microsatélites evaluados en *Crax alberti*

INTRODUCCIÓN

Se estima que el 11% de la avifauna neotropical (3.800 especies) se encuentra amenazada o en peligro de extinción (Brooks & Strahl 2000, Renjifo *et al.*, 2002), y dentro de este grupo, los paujiles, pavas de monte y guacharacas pertenecientes a la familia Cracidae son las aves más amenazadas (O'Neill 1997, Instituto Alexander von Humboldt 1998; Brooks & Strahl 2000). De las 50 especies que conforman la familia, 24 habitan en Colombia y siete presentan algún grado de amenaza (Brooks & Strahl 2000).

Una de las especies más amenazadas dentro de la familia es el Paujil de Pico Azul (*Crax alberti*), endémico de las zonas bajas del norte de Colombia, el cual cumple un papel muy importante en el mantenimiento de los bosques tropicales al dispersar y/o depredar semillas, afectando la densidad de las plantas involucradas (Brooks & Strahl 2000); es indicadora de calidad de hábitat, lo que la hace útil para estudios de monitoreo y manejo de áreas protegidas en el Neotrópico (Strahl y Grajal 1991) y es fuente importante de proteína para campesinos e indígenas (Ojasti *et al.* 1983).

Crax alberti ha perdido el 50% de sus poblaciones en los últimos 30 años, debido a la destrucción de un alto porcentaje de su hábitat (88%) y a la alta presión de cacería que afronta (Renjifo *et al.* 2002). En 1994 su tamaño de población fue estimado en 1000 a 2500 individuos (Strahl *et al.* 1994) por lo que se considera en peligro crítico de extinción (CR) (Cuervo 2002). Esta disminución de las poblaciones y la pérdida de continuidad en su distribución conducirá a la formación de poblaciones locales aisladas, más susceptible a cambios demográficos, ambientales y genéticos poco predecibles, por lo que tendrán tendencia a sufrir procesos de deriva genética y endogamia, reduciendo su variación genómica y su éxito reproductivo (Caughley 1994, Franklin y Frankham 1998).

Se requieren por lo tanto, acciones inmediatas para su conservación tanto *in situ*,; desarrollando investigación general sobre su distribución y estatus actual, amenazas, uso humano, viabilidad de su hábitat y biología; programas de educación, y diseño de reservas; como *ex situ*, con programas de manejo en cautiverio, lo cual ha ganado interés en los

últimos años (Todd 1992, Estudillo-López 1997); Angier (1989) por ejemplo opina, que dado que, para mantener poblaciones genéticamente viables de crácidos, hay que proteger áreas de bosque muy grandes, para algunas especies de esta familia, la cría en cautiverio podría ser la única alternativa para su sobrevivencia.

En el país, actualmente, se adelanta un programa de reproducción en cautiverio de *Crax alberti*¹, con miras a evitar su desaparición, asegurando un banco genético que apoye los planes futuros de su reintroducción a la vida silvestre en donde las condiciones lo permitan. Todo esto enmarcado dentro de la Estrategia Nacional para la Conservación de las Aves de Colombia (Renjifo *et al.* 2000).

Dado que el conocer la variabilidad genética de la especie era prioritario, no sólo de los ejemplares del programa de cría en cautiverio, sino también de ejemplares que se encuentran dentro de su rango de distribución; para evaluar la viabilidad de la especie a largo plazo y aportar conocimiento que permita soportar las decisiones sobre futuras reintroducciones, se planteó esta investigación con la cual se pretendía comprobar si había diferencia significativa en las frecuencias alélicas entre los grupos de individuos en cautiverio y comparar la variabilidad genética de *Crax alberti* con la variabilidad genética de otras especies de crácidos, tanto en cautiverio como en poblaciones naturales.

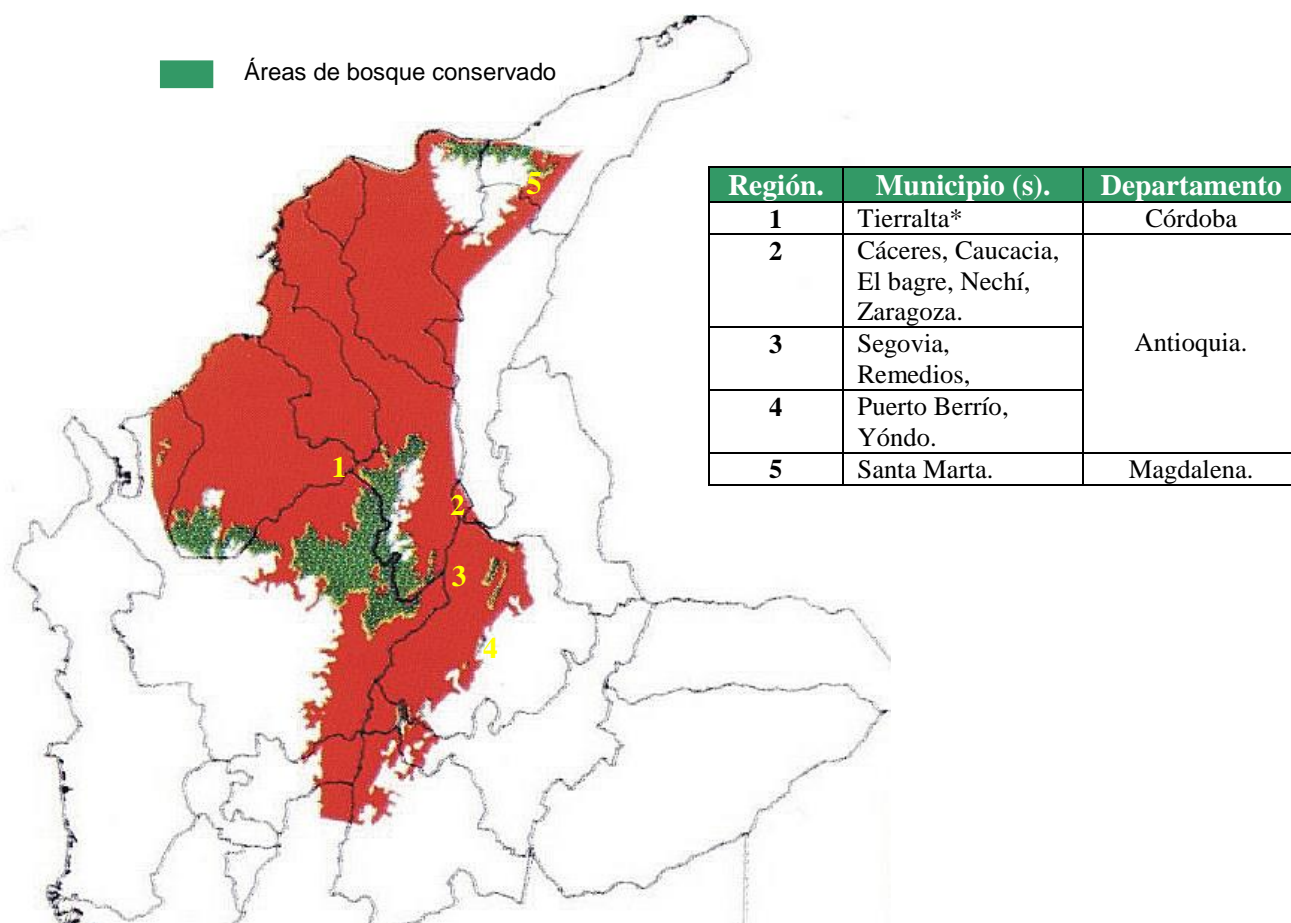
¹ Participan tres instituciones: Fundación Zoológico de Cali, Fundación Zoológica y Botánica de Barranquilla y Fundación Ecolombia en convenio con la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia (CORANTIOQUIA).

MÉTODOS

Sitio de muestreo

El estudio fue realizado en Colombia entre diciembre y julio de 2005. Se tomaron 150 μ l de sangre en 1.5 ml de buffer de lisis (Jonathan L. *et al* 1997). La toma de muestras de sangre se hizo en las fundaciones que participan en el programa de cría en cautiverio: Ecolombia (departamento de Antioquia), Zoológico de Cali (departamento del Valle) y Zoológica y Botánica de Barranquilla (departamento de Atlántico), y en la zona de distribución de la especie (Fig. 1), a individuos mantenidos como mascotas por los campesinos en los departamentos de Antioquia y Córdoba. También se obtuvieron muestras de plumas de individuos cazados recientemente de los departamentos de Antioquia, Córdoba y Magdalena (Anexo 1).

Figura 1. Regiones donde se tomaron muestras de sangre de *Crax alberti*



(Tomado de Renjifo *et al*, 2002)

Extracción de ADN

Se le realizó a 31 muestras de sangre de diferentes individuos, mediante el protocolo de extracción con sales de FitzSimmons modificado (Sambrook J, E.F. Fritch & T. Maniatus 1989), se partía de 50 µl de tejido y se dejó en digestión toda la noche. Para la extracción a partir de plumas se siguió el protocolo empleado por Segelbacher (2002). Finalmente la extracción a partir de una muestra de piel se realizó con el protocolo empleado en el centro de ciencias biológicas de Alaska (Pearce, J. 2003). Se evaluó el ADN en un gel de agarosa 0.8% para verificar una banda única y sin barrido. El ADN se cuantificó por comparación y se diluyó cada muestra en agua a una concentración de 4 ng/µl.

Reacción de PCR

Las reacciones fueron de 25 µl que contenían: 20 ng de ADN molde, 2.5 µl de solución tampón 1X (20mM de Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM de KCl), 2 µl de MgCl₂ 2mM, 0.5 µl de cebador hacia delante 0.2µM, 0.5 µl de cebador hacia atrás 0.2uM, 1 µl de dNTP's 1 mM, 0.2 µl Taq polimerasa 0.8 unidades y se completaba volumen final con agua.

Se emplearon 10 microsátélites, seis desarrollados para *Crax globulosa* y cuatro desarrollados para *Meleagris gallopavo*. Para cada juego de cebadores, se estandarizaron las condiciones del PCR, las amplificaciones se llevaron a cabo en un PTC-100 (MJ Research USA) utilizando el siguiente programa de amplificación: Una desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos., alineamiento a 52 °C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Se realizó una extensión final a 72°C por 3 minutos y enfriamiento a 4°C.

Para evaluar el producto de PCR se utilizó agarosa al 1.5% y un voltaje de 70V.

Separación de producto de PCR en gel de acrilamida

El producto de PCR se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 4% en condiciones denaturantes y visualizados mediante tinción con nitrato de plata (Bassam et al., 1991 y Promega corp. 1995) (Figura 4)

Los tamaños de los alelos fueron obtenidos por comparación con el estándar 10-330 pb de Promega. El tamaño de los microsatélites será convertido a alelos en números de repeticiones (1,2,...n) tomando como base el de menor tamaño.

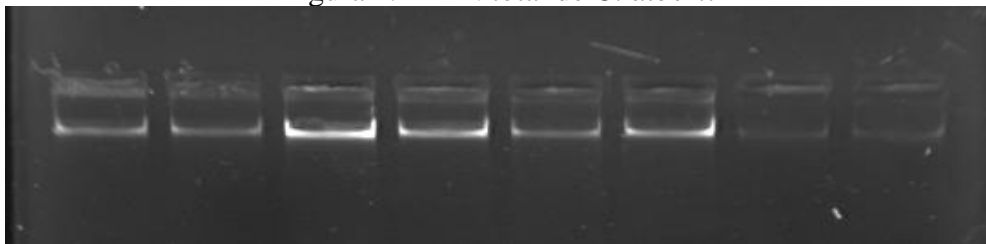
Para cada microsatélite se realizó la lectura de los alelos en el gel y se creó una matriz de presencia (1), ausencia (0) y finalmente se genotipificaron todos los individuos.

RESULTADOS

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN a partir de sangre, piel y plumas fue exitosa; obteniendo bandas brillantes y sin barrido para sangre (Fig. 2). En cuanto a la concentración del ADN extraído, se obtuvieron productos de hasta 150 ng/μl con sangre, sin embargo para plumas la concentración fue muy baja, tomando en cuenta que eran plumas viejas y mudadas, no se cuantificó su concentración, ni se hicieron diluciones. Según el protocolo utilizado se obtienen concentraciones de hasta 15 ng/μl cantidad que es de difícil observación en agarosa, sin embargo al utilizar el producto de extracción para el PCR se obtenían amplificados de buena calidad. Durante el tiempo de trabajo en laboratorio no se presentó degradación del ADN.

Figura 2. ADN total de *C. alberti*



Reacción de PCR

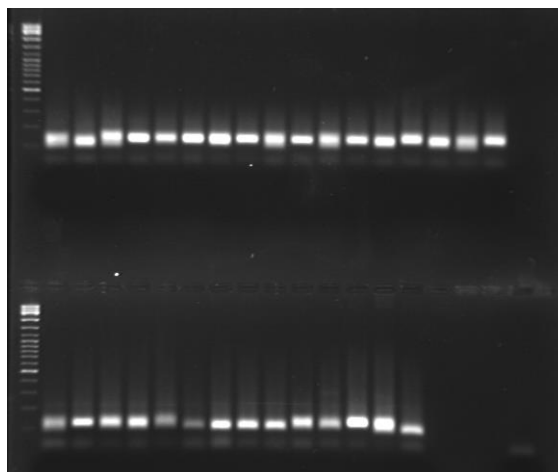
Se estandarizaron condiciones para seis de los diez microsatélites a evaluar (Tabla 1), de estos cinco fueron desarrollados para *Crax globulosa* y uno para *Meleagris gallopav*. Para el microsatélite CgAAT190 se cambiaron las condiciones de la PCR, disminuyendo la

cantidad de MgCl₂ a 1.6 µl /tubo de reacción, para aumentar la astringencia. Dos microsatélites, CgAAT82 y el MNT226 presentaron muchas bandas inespecíficas, se cambiaron condiciones del PCR en varias ocasiones, pero no se logró obtener amplificado único. Sólo el ADN de dos individuos (32 y 34), no amplificó para dos micros CgAAT32 y CgAAT85 respectivamente. Para todos los otros individuos se obtuvieron amplificados con los seis microsatélites (Fig.3)

Tabla 1. Microsatélites evaluados en *Crax alberti*

Locus	Secuencia Repetida	Secuencia de los Cebadores 5'-3'	No. Alelos	Referencia	No. Alelos obtenidos
CgAAT11	AAT ₁₃	F: GGCCATTTGTTGCACAGTAG R: GATCTGGAGCTGCTTTTATTA	4	Hughes y Larson,1999	2
CgAAT32	AAT ₁₄	F: GTGCCCCAGCAGTAATAATA R: CCATTGTACCAAAGTCACAGTA	6	Hughes y Larson,1999	9
CgAAT62	AAT ₆ GATAAT ₇	F: GTCATAAAGCGTAGTTTCTATA R: GCCCAATAATAAGCATCTA	6	Hughes y Larson,1999 Modificado	6
CgAAT82	ATT ₁₆	F: GGTCCCTTCCAAGTTGAATCAT R: AAGCCAAGCATGGAAAGAAAATA	6	Hughes y Larson,1999	No amplificó
CgAAT85	AAT ₁₆	F: CCATAGGTGGGGTTGTATTA R: AGCAGAGCCAATATGAAGTAA	6	Hughes y Larson,1999 Modificado	6
CgAAT190	AAT ₁₃	F: TCACCACCATTTCCTAACAG R: ATGAGATTTACCTTCAGTTCT	6	Hughes y Larson,1999	9
MNT-1	CA ₂₆	F: ATCTCCCTCAGGCAGGTATC R: AGACTCTTGTGGCCTGGAG	12	Reed <i>et al.</i> , 2000	No amplificó
MNT-139	GA ₁₈	F: AATTAATTGACAGCAACAGAAAAA R: TCCCTGAGCTGGGAAAAGTA	7	Reed <i>et al.</i> ,in press	2
MNT-215	TG ₂₉	F: GTGGCCAATGCCTTCTGTAG R: CACACAGCAGCAGTTCCATC	10	Reed <i>et al.</i> ,in press	No amplificó
MNT-226	CA ₂₄	F: AAAGCACAAGCTGCTGCAC R: TCCACCCACTTCACACTCAC	7	Reed <i>et al.</i> ,in press	No amplificó

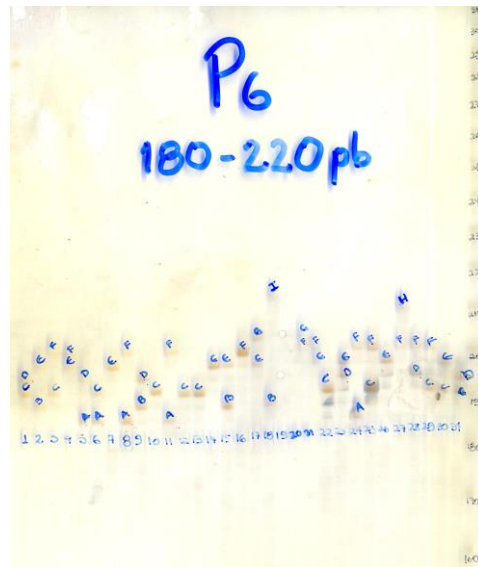
Figura 3. Amplificación microsatélite CgAAT62 en *Crax alberti*.



Separación de producto de PCR en gel de acrilamida

Para los seis microsatélites se obtuvieron geles de agarosa de fácil lectura por la resolución de las bandas, el tamaño de los microsatélites concuerda con lo reportado por Hughes & Larson (1999).

Figura 4. Gel de poliacrilamida microsatélite CgAAT190 en *Crax alberti*.



A partir de las matrices construídas en Excel se realizaron los análisis con los programas NTSYSpc 2.1 y Popgen32 que arrojaron los siguientes dendrogramas y valores

En la figura 5 se aprecia el dendrograma de todos los individuos a los se les extrajo ADN, tanto los cautivos en su área de distribución como los que se encuentran en las fundaciones del programa de cría en cautiverio.

En la figura 6 se incluyen los individuos cautivos en su área de distribución.

En la figura 7 se agrupan los individuos en cautiverio en la Fundación Ecolombia.

En la figura 8 se agrupan los individuos en cautiverio en la Fundación Zoológica de Cali.

En la figura 9 se agrupan los individuos en cautiverio en la Fundación Zoológica y Botánica de Barranquilla.

Figura 5. Dendrograma similaridad *Crax alberti*
Individuos en cautiverio en Colombia

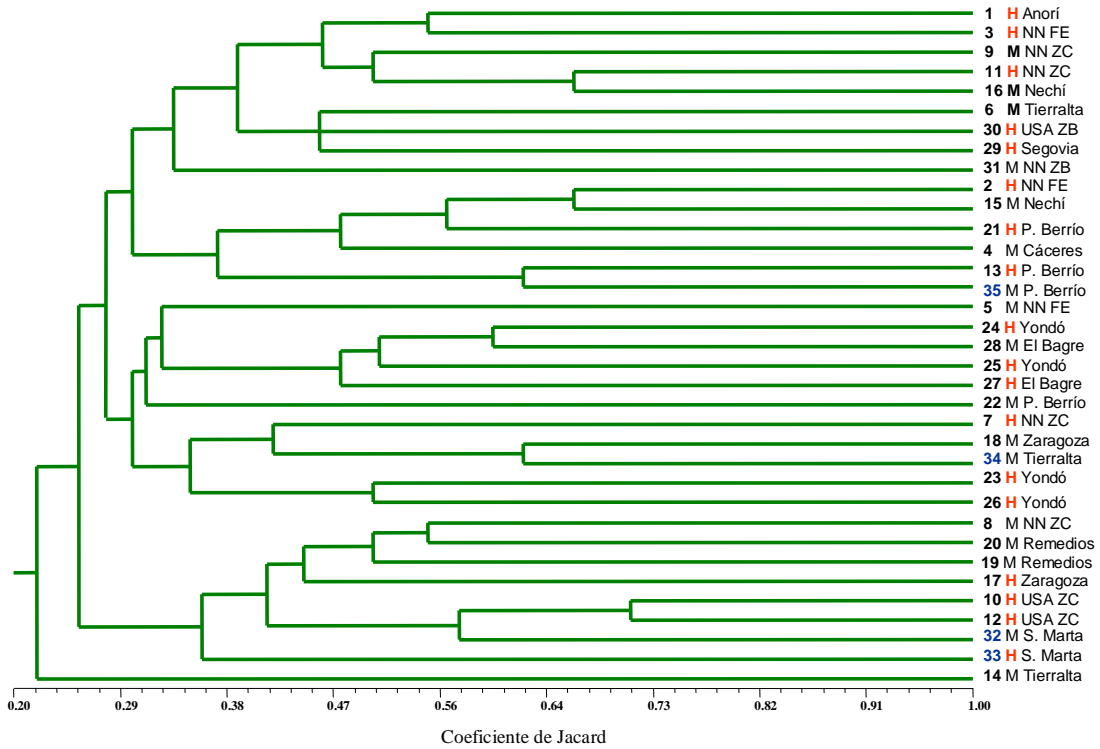


Figura 6. Dendrograma similaridad *Crax alberti*
Individuos procedencia conocida

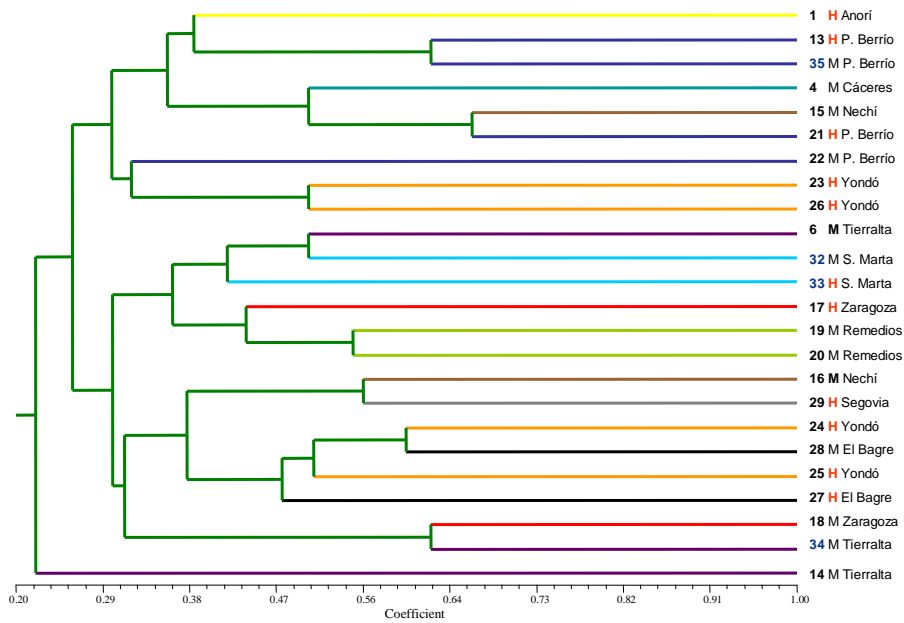


Figura 7. Dendrograma similaridad *Crax alberti*
Programa de cría en cautiverio Fundación Ecolombia

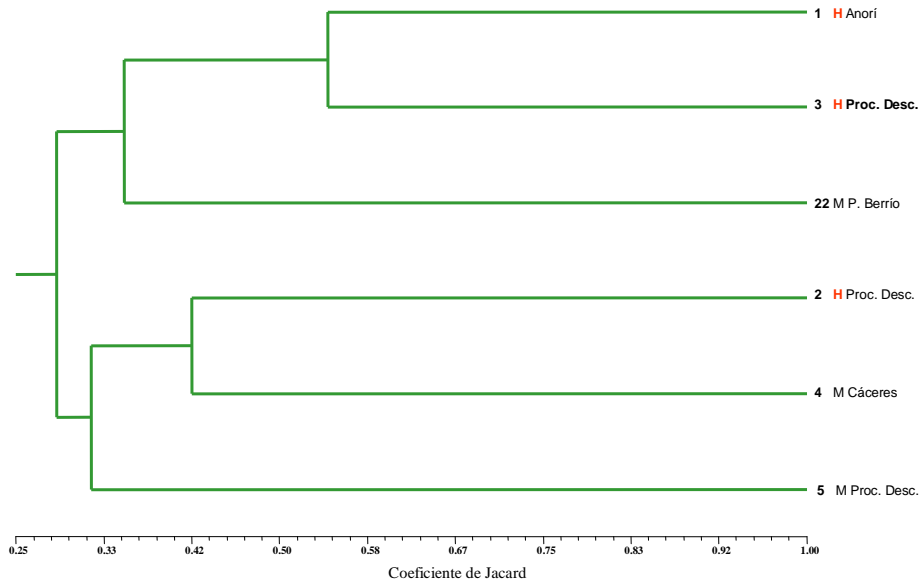


Figura 8. Dendrograma similaridad *Crax alberti*
Individuos en cautiverio en el Zoológico de Cali.

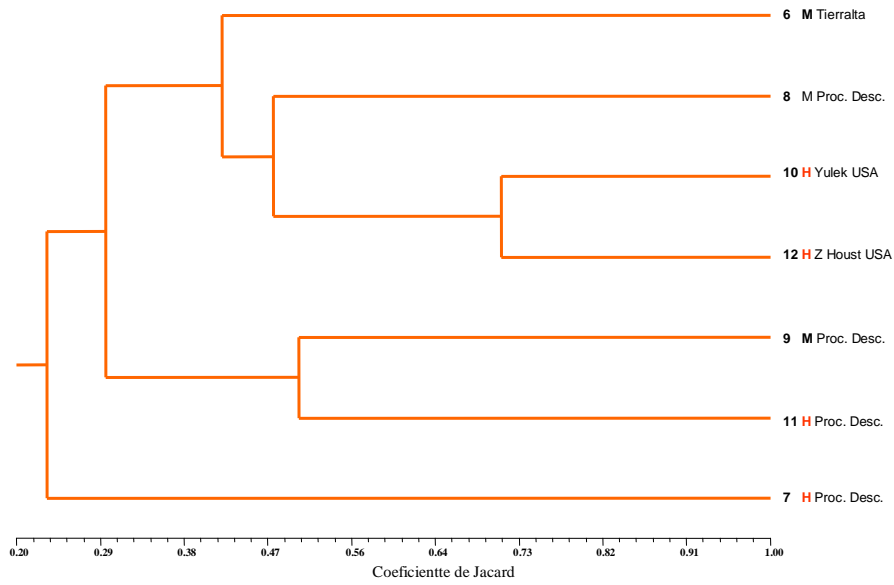
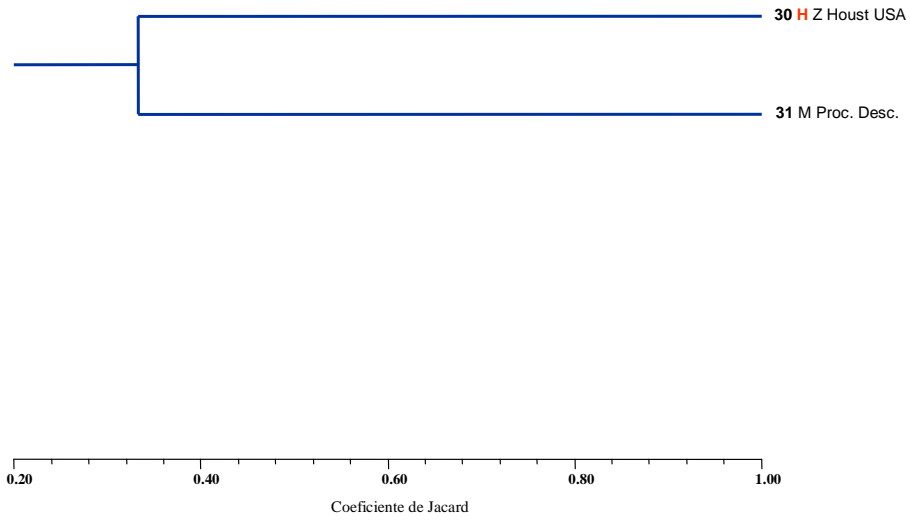


Figura 9. Dendrograma similaridad *Crax alberti*
Individuos en cautiverio en la
Fundación Zoológica y Botánica de Barranquilla.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angier, N. 1989. Saving the cracids: for many of these birds private zoos may be the only hope. *The Atlantic*, 264 (2): 26-29.
- Awise, J. C. 1993. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall. New York, U.S.A. p. 44-91.
- Bassam, D. J. y G. Caetano-Anolles. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal Biochem.* 19: 680-683.
- Bertranpetit, J. 1997. El pasado está en los genes. *Mundo Científico* 179: 425-431.
- Brooks, D. M. y S. D. Strahl (eds.). 2000. Curassows, Guans and Chachalacas. Status Survey and Conservation Action Plan for Cracids (2000-2004), IUCN/SSC Cracid Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 182p.
- BirdLife International. 2000. Threatened Birds of the World. Lynx Edicions, BirdLife International. Barcelona y Cambridge.
- Caughley, G. 1994. Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology* 63: 215-244.
- Collar, N. J., L. P. Gonzaga, N. Krabbe, A. Madroño-Nieto, L. G. Naranjo, T. A. Parker III y D. C. Wege (eds.). 1992. Threatened Birds of the Americas: the IUCN/ICBP Red Data Book. Pp: 154-156. 3a. ed, Part 2. Smithsonian Institution Press. Washington y Londres, en Cooperación con el Consejo Internacional para la Preservación de Aves, Cambridge.
- Cuervo, A. M. 2002. *Crax alberti*. En: Renjifo, L. M., A. M. Franco-Maya, J. D. Amaya-Espinel, G. H. Catan y B. López-Lanús (eds.). Libro Rojo de Aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia.
- Cuervo, A. M. y P. Salaman. 1999. Natural history of the Blue-billed Curassow (*Crax alberti*). *Bol. CSG* 8: 3-10.
- Cuervo, A. M., J. M. Ochoa y P. Salaman. 1999. Últimas evidencias del Paujil de Pico Azul (*Crax alberti*) con anotaciones sobre su historia natural, distribución actual y amenazas específicas. Pp. 69-80. En: Boletín SAO 10: 18-19.
- Delacour, J. y D. Amadon. 1973. Curassows and Related Birds. American Museum of Natural History. New York.
- del Hoyo, J. 1996. Cracidae. Pp. 310-363. En: Handbook of the Birds of the World, Vol. 2. Lynx Ediciones. Barcelona.
- Dowling, T. E., C. Moritz, J. D. Palmer y L. H. Rieseberg. 1996. Analysis of fragments and restriction sites. p. 249-320. En: Molecular Systematics. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Estudillo-López, J. 1997. Los Crácidos: La Familia de Aves Neotropicales más Amenazadas de Extinción y su Posible Restablecimiento por la Reproducción en Cautiverio. Pp. 117-123. En: Strahl, S. D., S. Beaujon, D. M. Brooks, A. Bagazo, G. Sedaghatkish and F. Olmos (eds.). The Cracidae: their Biology and Conservation. Hancock House Publ. Washington, D. C., USA.
- Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1998. Marcadores Basados en la Amplificación de Microsatélites. Pp. 55-60. En: Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. 1 ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia.

- Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge Univ. Press.
- Franklin, I. R., R. Frankham. 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation* 1: 69-73.
- Grau, E. T., S. L. Pereira, Silveira, L. F. y Wajntal A. 2003. Molecular markers contribute to a breeding programme of the extinct-in-the-wild Alagoas Curassow *Mitu mitu* and confirm the validity of the species. *Bird Conservation International* 13: 115-126.
- Haig, S. M. 1998. Molecular Contributions to Conservation. *Ecology* 79(2): 413-425.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Sunderland. Sinauer Associates, Inc.
- Hillis, D. M., C. Moriz, y B. K. Mable (eds.). 1996. Molecular Systematics. Sinauer Associates. Massachusetts, USA.
- Hilty, S. L. y W. L. Brown. 1986. A Field Guide to the Birds of Colombia. Princeton Univ. Press.
- Hughes, C. R. y E. D. Larson. 1999. Characterization of microsatellites loci developed for the wattled curassow, *Crax globulosa*. *Molecular Ecology* 9: 629-644.
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 1998. Informe Nacional Sobre El Estado de La Biodiversidad 1997- Colombia (Vol I). Las aves endémicas de Colombia. Especies de aves amenazadas y casi amenazadas de extinción en Colombia. En: Cháves, M. E. y N. Arango (eds.). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, PNUMA, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá.
- Jiménez, P. y C. Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.: Fuera de Serie*. No. 2.
- Karp, A., K. J. Edwards, M. Bruford, S. Funk, B. Vosman, M. Morgante, O. Seberg, A. Kremer, P. Boursot, P. Arctander, D. Tautz y G. Hewitt. 1997. Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature Biotechnology* 15: 625-629.
- Moore, S. S., L. L. Sargeant, T. J. King, J. S. Mattick, M. Georges y D. J. S. Hetzel. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivide populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(12): 3321-3323.
- Ojasti, J. G., F. Fajardo y M. Cova. 1983. Consumo de fauna por una comunidad indígena en el Estado Bolívia, Venezuela. Pp. 45-50. En: Cons. Man. Fauna Silv. Neotrop., IX Congr. Latino-americano Zool. Lima.
- O'Neill, J. 1997. Los Crácidos: una sobrevista. Pp. 410. En: Strahl, S. D., S. Beaujon, D. M. Brooks, A. Bagazo, G. Sedaghatkish y F. Olmos (eds.). *The Cracidae: their Biology and Conservation*. Hancock House Publ. Washington, D. C., USA.
- Parker, P. G., A. Snow, M. Schug, G. Booton y P. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79 (2): 361-382.
- Pereira, S. L. y A. Wajntal. 1999. Reintroduction of guans of the genus *Penelope* (Cracidae, Aves) in reforested areas in Brazil: assessment by DNA fingerprinting. *Biological Conservation* 87: 31-38.

- _____. 2001. Estimates of the genetic variability in a natural population of Bare-faced Curassow *Crax fasciolata* (Aves, Galliformes, Cracidae). *Bird Conservation International* 11: 301-308.
- Primmer, C. R., A. P. Møller y H. Ellegren. 1995. Resolving genetic relationships with microsatellite markers a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Molecular Ecology* 4: 493-498.
- Reed, K. M., M. C. Roberts, J. Murtaugh, C. W. Beattie y L. J. Alexander. 2000. Eight new dinucleotide microsatellite loci in turkey (*Meleagris gallopavo*). *Animal Genet.* 31: 140.
- Reed, K. M., L. D. Chaves, M. K. Hall, T. P. Knutson, J. A. Rowe y A. J. Torgerson. Microsatellite loci for genetic mapping in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Animal Biotech.* In press.
- Renjifo, L. M., A. M. Franco, H. Álvarez-López, M. Álvarez, R. Borja, J. E. Botero, S. Córdoba, S. de la Zerda, G. Didier, F. Estela, G. Catan, E. Londoño, C. Márquez, M. I. Montenegro, C. Murcia, J. V. Rodríguez, C. Samper y W. H. Weber. 2000. Estrategia nacional para la conservación de las aves de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 36p.
- Santamaría, M. y A. M. Franco. 2000. Frugivory of Salvin's Curassow in a rainforest of the Colombian Amazon. *Wilson Bulletin.* 112(4): 473-481.
- Silva, J. L. y S. D. Strahl. 1991. Human impact on populations of chachalacas, guans and curassows (Galliformes: Cracidae) in Venezuela. Pp. 37-52. En: Robinson, J. G. y K. H. Redford (eds.). *Neotropical Wildlife Use and Conservation.* Univ. Chicago Press.
- Sokal, R. R., y F. J. Rohlf. 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* 2° ed. W. H. Freeman and Company (eds.) New York. 859p.
- Strahl, S. D., J. L. Silva y R. Buchholz. 1997. Variación estacional en el uso de hábitat, comportamiento de grupo y un sistema aparentemente polígamo en el Paují Copete de Plumas, *Crax daubentoni*. En: Strahl, S. D., S. Beaujon, D. M. Brooks, A. Bagazo, G. Sedaghatkish y F. Olmos (eds.). *The Cracidae: their Biology and Conservation.* Hancock House Publ. Washington, D. C., USA.
- Strahl, S. D. y A. Grajal. 1991. Conservation of large avian frugivores and the management of Neotropical protected areas. *Oryx* 25: 50-55.
- Taylor, A. C., W. B. Sherwin y R. K. Wayne. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiornis krefftii*. *Molecular Ecology* 3: 277-290.
- Todd, W., R. Plassé y C. Eckart. 1992. *Curassow Husbandry: Suggested protocols.* Houston Zoological Gardens, Houston. 16p.
- Vaurie, C. 1968. Taxonomy of the Cracidae. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 138(4): 135-253.
- Zimmer, B. 1999. Observations on a barred morph of the Greater Curassow (*Crax rubra*) in Belize. *Bol. CSG* 8:18-20.