



ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN DE PARENTESCO ENTRE LOS
CÓNDORES (*Vultur gryphus*) EN CAUTIVERIO EN EL ECUADOR A TRAVÉS
DE MICROSATÉLITES

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos
para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía:

César Paz-y-Miño M.D: D.B.

Autor

Jorge Fernando Navarrete Mera

Año

2012

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos para un adecuado desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regula los Trabajos de Titulación”.

César Paz-y-Miño M.D: D.B.

Doctor en Medicina

C.I. 170434509-7

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE:

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Jorge Fernando Navarrete Mera

C.I. 171805218-4

AGRADECIMIENTO:

Gracias a todas las personas que han aportado de diversas formas en la realización de este trabajo: al personal de la Fundación Zoológica que contribuyó con el muestreo; a los compañeros y amigos del Instituto a los que están y a los que se fueron, por todas las ideas aportadas y todos los momentos compartidos Nadia, Majo Muñoz, Santi, Berni, Gaby, Carlita, Majo Guevara, Andrés, Raúl y Mariu, sin ustedes este trabajo no sería lo mismo; al doctor Cesar Paz-y-Miño por sus aportes, su paciencia y recomendaciones que hicieron posible la finalización de este trabajo; a los profesores que compartieron sus valiosas enseñanzas incluso fuera del aula de clases; a Cristina Guerra por su ayuda oportuna y paciencia para que el trabajo sea finalmente presentado; al doctor Oswaldo Albornoz por sus contribuciones, ayuda y consejo durante todos los años de la carrera; A mis entrañables y más queridos amigos Danilo, Carlos y Thiago en donde sea que se encuentren, gracias; a mis hermanos de la música, Santi, David, Jenny, Sebas, Moi, su arte llenó de color estos últimos años; a mis padres Jorge y Sandra por su soporte expresado de varias formas y en varios momentos; y finalmente a quienes son mi luz y mi norte, Sindy y Teva, quienes me dan todos los días invaluable lecciones de amor a veces sin decir una sola palabra. A todos ustedes gracias.

DEDICATORIA:

Dedico este trabajo a mis compañeras de vida, Sindy y Teva por darme el motivo más importante y trascendente para seguir la marcha sin desfallecer, su amor. A mis padres Jorge y Sandra por enseñarme con su infinita paciencia y gran dedicación como ser hijo y a la vez, como ser padre. Y a mi amigo Pocho, no nos dieron tiempo de despedirnos.

RESUMEN

Menos de cincuenta cóndores andinos existen en el territorio del Ecuador, y tan solo veintisiete individuos fueron identificados exitosamente en el último censo por foto identificación, de estos, la mayoría son aves adultas existiendo muy pocos jóvenes para reponer y mantener la especie en el país. Así es como se decide emprender un proyecto con la finalidad de reintroducir al cóndor de nuevo a su territorio antes de que se extinga definitivamente del país. Los diecinueve especímenes mantenidos en cautiverio en centros de tenencia de fauna autorizados y zoológicos fueron muestreados para realizar análisis en diversas áreas de estudio, como parte del proyecto de reintroducción. Parte de este estudio es el análisis de genotipo y caracterización de los individuos por medio de microsatélites con la finalidad de conocer y mantener la diversidad genética y evitar la endogamia y la deriva genética propia de poblaciones pequeñas o aisladas. Los microsatélites usados fueron diseñados previamente para el cóndor californiano, el cual atraviesa por la misma situación de conservación. Se amplificó seis microsatélites en seis loci respectivos, con variaciones de tamaño de 93 a 220 pb, los microsatélites fueron dos trinucleótidos, un dinucleótido y tres tetranucleótidos, de estos dos fueron monomórficos y por tanto no informativos para caracterizar a los individuos. En los locus C5 y A20 se encontraron cinco alelos en cada uno, en el locus B7 se encontró 3 alelos, mientras en el locus H115 se encontraron dos alelos. El análisis de la variabilidad genética reveló un nivel de heterocigosidad aceptable para los cuatro microsatélites. Se encontró que tres locus no estaban en equilibrio Hardy-Weinberg, probablemente por el tamaño de la muestra. La prueba fue suficiente para diferenciar entre individuos, pero no describe con alta precisión la relación de parentesco entre los individuos.

ABSTRACT

Less than fifty Andean condors live in the Ecuadorian territory, and only twenty-seven individuals were identified in the last census by photo identification, most of them were adult birds and there was a little proportion of young birds to replace and maintain the species in the country. In this situation has been decided to begging a project in order to reintroduce the condor back to its territory, before finally become extinct in our country. The nineteen condors kept in captivity in authorized wildlife centers and zoos, were sampled for analysis in some areas of interest as part of the reintroduction project. Part of this study is the analysis of individual genotype and characterization of microsatellites, in order to know and maintain genetic diversity and avoid inbreeding and genetic drift, typical of small or isolated populations. The microsatellites used were previously designed for the Californian condor, which is in the same conservation status. Six microsatellites were amplified in six respective loci, variations in size were from 93 to 220 bp, two microsatellites were trinucleotide, one was dinucleotide, and three were tetranucleotide. We found that two were monomorphic and therefore non-informative to characterize individuals. In the C5 locus and A20 were found, in each one, five alleles in the B7 locus was found 3 alleles, while the H115 locus showed two alleles. The analysis for genetic variability revealed acceptable levels of heterozygosis in our microsatellites. It was found that three loci were not in Hardy-Weinberg equilibrium, probably due to the size of the sample. The microsatellite test was sufficient to differentiate between individuals, but does not describe precisely the kinship between individuals.

ÍNDICE

Introducción	1
1. Capítulo I	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Justificación	4
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1 Objetivos generales	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
2. Capítulo II Marco Teórico	7
2.1 Cóndor Andino: una descripción de la especie	7
2.1.1 Generalidades	7
2.1.2 Distribución y hábitat	7
2.1.3 Características biológicas y etológicas	8
2.1.4 Reproducción.....	9
2.1.4.1 Biología reproductiva	9
2.1.4.2 Etología y reproducción	10
2.1.5 Evolución y filogenia	11
2.1.6 Situación actual	13
2.1.6.1 En Sudamérica	13
2.1.6.2 En el Ecuador	14
2.1.6.3 Razones para que el cóndor andino este en peligro de extinción	15
2.2 Genética y Biología de la conservación.....	16
2.2.1 El Papel de la Genética en la Conservación de especies	17
2.2.1.1 Genética poblacional y el problema de la endogamia en parques zoológicos	18
2.2.1.2 Depresión por Endogamia y Deriva genética..	19
2.2.2 Microsatélites	21

2.2.2.1	Uso de microsatélites en parentesco, paternidad y conservación de especies	22
2.2.3	Experiencia en el Cóndor californiano	23
2.2.3.1	Librería de Microsatélites para el Cóndor californiano	25
2.2.3.2	Aplicación al cóndor andino	25
3.	Capítulo III Metodología.....	27
3.1	Propuesta investigativa	27
3.2	Objetivos	27
3.3	Materiales y métodos	27
3.3.1	Muestreo	28
3.3.2	Técnicas de Biología molecular	30
3.3.2.1	Extracción de ADN	29
3.3.2.2	Análisis cuantitativo y cualitativo de ADN extraído	32
3.3.2.3	PCR (Polymerase Chain Reaction)	33
3.3.2.4	Microsatélites	33
3.3.2.5	Protocolos de PCR para amplificación de microsatélites	35
3.3.2.6	Análisis de Fragmentos	36
3.3.3	Análisis estadístico	39
3.3.3.1	Frecuencias alélicas y genotípicas	39
3.3.3.2	Prueba de bondad de ajuste: Hardy-Weinberg y Chi-cuadrado	39
3.3.3.3	Medidas de variabilidad genética	41
3.3.3.4	Poder de inclusión y discriminación	41
3.3.3.5	Matriz de alelos compartidos	42
4.	Capítulo IV Resultados.....	43
4.1	Extracción de ADN	43

4.1.1	Cuantificación de ADN	43
4.2	Determinación del genotipo	44
4.2.1	PCR para Microsátelites	45
4.2.1.1	C5	45
4.2.1.2	A20	46
4.2.1.3	B7	47
4.2.1.4	H3	47
4.2.1.5	H115	48
4.2.1.6	H269	49
4.2.2	Análisis de Fragmentos	50
4.2.2.1	C5.....	51
4.2.2.2	A20	54
4.2.2.3	B7	60
4.2.2.4	H3	62
4.2.2.5	H115	62
4.2.2.6	H269	64
4.2.3	Genotipos por individuos	65
4.2.3.1	Frecuencias alélicas y genotípicas	69
4.2.3.2	Prueba de bondad de ajuste: Hardy-Weinberg y Chi-cuadrado	71
4.2.3.3	Medidas de variabilidad genética	73
4.2.3.4	Poder de inclusión y discriminación	74
4.2.3.5	Matriz de alelos compartidos	74
5.	Capítulo V Discusión	76
5.1	Recomendaciones para el mantenimiento de la diversidad genética	82
6.	Capítulo VI.....	85
6.1	Conclusiones	85
6.2	Recomendaciones	86

Referencias.....	88
Anexos.....	97

INTRODUCCIÓN

El cóndor andino (*Vultur gryphus*) es una especie de ave nativa de los países andinos: Colombia, Ecuador, Perú, Chile, Bolivia y Argentina. En estos lugares es un animal muy representativo en la mitología y cultura de sus pueblos y además es símbolo de su nacionalidad. Pertenece a la familia de los buitres del nuevo mundo denominada Cathartidae, tradicionalmente ubicada en el orden Falconiformes aunque estudios genéticos demuestran mayor cercanía con los Ciconiiformes que incluye a las cigüeñas y los ibis (Avisé 1994). Se caracteriza por su gran tamaño, es una de las aves voladoras más grandes del mundo. Físicamente se lo identifica como un buitre negro de gran tamaño, con un penacho blanco alrededor del cuello, posee cierto dimorfismo sexual, así, el macho tiene una cresta carnosa en la cabeza y es de mayor tamaño que la hembra.

Actualmente se encuentra incluido en el Apéndice I de CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), su estatus de conservación es casi amenazado (BirdLife International 2004, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources UICN 2004), sin embargo en nuestro país, el cóndor está en peligro de extinción, ya que menos de 50 cóndores surcan nuestros cielos. Esta situación hace imperativo el iniciar un proyecto de conservación de la imponente ave; con este objetivo debe partirse sobre la base de los cóndores en cautiverio en el Ecuador, y sobre las investigaciones en cuanto a la reproducción y genética de los mismos. Las investigaciones relacionadas a dichos temas en los países de origen del cóndor son pocas, por tal motivo es necesario formar una base de datos nacional, que facilite el trabajo de conservación y de reproducción en cautiverio.

Al no poseer información específica sobre los cóndores en cautiverio se ha decidido realizar un estudio multidisciplinario sobre su estado de salud y reproductivo; dentro de este estudio se enmarca la determinación del grado

de variabilidad genética y parentesco que es el propósito del presente proyecto.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

En un censo realizado por la Corporación Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana (SIMBIOE) en el 2002 se identificaron alrededor de 70 cóndores en el Ecuador. En un último censo realizado por foto identificación, se contabilizaron apenas 27 aves surcando los cielos ecuatorianos y aunque se dice que su número podría ser el doble, la situación no deja de ser preocupante. Algunos expertos aseguran que le quedan pocos años a la especie en el país.

El camino a la extinción del cóndor ha sido trazado por el desconocimiento y la ambición. La frontera agrícola se ha extendido paulatinamente, actualmente ocupa mucho del espacio que fue antes el hábitat de venados y dantas andinas, cuyos cadáveres conforman parte del alimento de los cóndores, esta situación sumada a las creencias erróneas acerca del ave cazando el ganado y llevándose a los niños pequeños, creó un ambiente de conflicto con los intereses humanos. Las personas comenzaron a perseguirlos y a envenenar la carroña, diezmando así su población.

Su reproducción es lenta, debido a que generalmente solo ponen un huevo que eclosiona a los 55 días, el polluelo permanecerá con sus padres por dos años hasta alcanzar la madurez. Esta tasa reproductiva es relativamente baja en comparación con la facilidad del hombre para eliminarlo (Lambertucci 2007). Durante los últimos años se han formado parejas con los cóndores cautivos, con la esperanza de que se reproduzcan y que los huevos sean viables. Sin embargo, pocas veces se han obtenido huevos y crías. En el Ecuador, las únicas crías en cautiverio que han llegado a nacer son producto de la pareja del Zoológico en Guayllabamba.

La Fundación Zoológica del Ecuador con el aval del Ministerio del Ambiente ha propuesto un proyecto de salvamento del Cóndor cuya primera fase consiste en la toma de muestras para investigar en áreas tales como

endocrinología, toxicología, etología y genética. Así, dentro de esta última se ha planteado la presente tesis como comienzo de las investigaciones sobre el tema, debido a que es primordial conocer el grado de relación de parentesco entre estos individuos para evitar los problemas relacionados con una alta endogamia y un cuello de botella poblacional. Se ha aprovechado la oportunidad de muestrear los 19 cóndores cautivos para todas las áreas propuestas, tomando las respectivas muestras de sangre para la extracción de ADN y posterior análisis.

La Universidad de las Américas ha puesto a disposición su Instituto de Investigaciones Biomédicas, que presta todas las facilidades y la apertura para realizar las investigaciones necesarias en el área de genética molecular. En esta investigación también se incluirá algunas actividades necesarias para recabar mayor información sobre la genética del cóndor andino, la identificación de algunos polimorfismos en microsatélites y un análisis básico de genética de poblaciones sobre los animales mantenidos en cautiverio y la diferencia básica entre esta especie y otras estudiadas.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes han demostrado la existencia de una relación entre la menor variabilidad genética y el tamaño de una especie tanto en mamíferos como en aves, como muestran estudios en ballenas (Hoelzel y Dover 1991, Murray et al. 1995), osos (Allendorf et al. 1979, Cronin et al. 1991, Paetkau y Strobeck 1994), águila calva (Morizot et al. 1985) y búho Manchado (Barrowclough y Gutierrez 1990). En el caso del cóndor andino, siendo una de las aves voladoras más grandes, una investigación en ADN mitocondrial encontró una variabilidad genética relativamente baja a pesar de su amplia distribución geográfica. (Hendrickson et al. 2003). Estos ejemplos confirman la disminución de la variabilidad genética en la mega fauna en peligro de extinción, probablemente debido a la incremento de la endogamia producto de la reducción de las poblaciones zonales.

Se sabe que en poblaciones genéticamente pequeñas y poco diferenciadas, el riesgo de que el efecto negativo de mutaciones deletéreas es mayor, como resultado del efecto fundador y la deriva genética (Romanov et al. 2009). Como manifestación del incremento de los cruzamientos endogámicos, se han encontrados varios efectos negativos en las poblaciones así como la elevada incidencia de enfermedades genéticas, reducción de la fertilidad en machos y hembras, alta mortalidad prenatal y neonatal, sistema inmunológico poco competente, entre otras. Como en cualquier especie o grupo de individuos, conforme incrementa la endogamia, incrementa también la frecuencia de aparición de estos problemas (Lorimer 2007).

Se ha decidido iniciar esta investigación con el fin de recabar la información necesaria del estado genético de la población de cóndores en cautiverio, para así escoger adecuadamente las parejas reproductivas, que tengan entre si el menor nivel de consanguinidad posible. Dichas parejas producirán crías viables que serán reintroducidas en su hábitat original.

Además se formará una base de datos sobre la genealogía del cóndor andino en el Ecuador, de los animales en cautiverio y sus futuras crías, que permitan ubicar la relación de parentesco entre cada uno para evitar cruces consanguíneos futuros.

También se pretende ser parte de los precursores en las investigaciones referentes a genética de la conservación, abriendo las puertas para futuros proyectos.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivos generales

Determinar la variabilidad genética y el nivel de parentesco entre los cóndores mantenidos en cautiverio en centros de tenencia de fauna del Ecuador, a través de análisis de Microsatélites con el propósito de formar parejas reproductivas con el menor nivel de consanguinidad posible, y así obtener una descendencia genéticamente adaptable en su hábitat natural.

1.3.2 Objetivos específicos

- Iniciar una serie de estudios genéticos de utilidad para programas de conservación de cóndores, por medio de la reproducción en cautiverio.
- Proporcionar una base de datos sobre las relaciones de parentesco que existen entre los cóndores actualmente cautivos en el Ecuador.
- Estandarizar el protocolo microsatélites, para que se utilicen en un futuro en determinación de genotipo de cualquier individuo de la especie.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 EL CÓNDOR ANDINO: UNA DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

2.1.1 Generalidades

El cóndor andino (*Vultur gryphus*), es una especie de ave carroñera que se distribuye en el sector occidental de Sudamérica, a lo largo de la cordillera de los Andes. Se considera una especie cercana a la amenaza según CITES, sin embargo su situación real en todo el continente es poco conocida. Muchos son los esfuerzos que se han hecho con el fin de reintroducir al cóndor a su hábitat original, mayormente en la zona sur del continente en países como Chile y Argentina, donde se ha obtenido cierto éxito, pero es en el norte de los Andes donde la situación es más crítica y donde los países han planeado muy poco para conservar y reintroducir esta ave que está casi extinta.

2.1.2 Distribución y hábitat

Su ubicación histórica está ligada a los Andes, desde el norte en las montañas de Venezuela, hasta Tierra de Fuego en Argentina y Chile en el sur (del Hoyo et al. 1994). En Venezuela y Colombia se ha registrado presencia de cóndores no solo en los Andes sino también en otros sistemas montañosos, como la Sierra de Perijá en la frontera entre estos dos países (Calchi y Vilorio, 1991) y los ecosistemas templados de paramo de la Sierra Nevada colombiana frente al Caribe (Norton, 1975). En el litoral pacífico, a lo largo de la costa desértica de Perú y Chile, era visto con mucha más frecuencia que ahora (Murphy, 1936), incluso hay registros de cóndores bajando desde los Andes, volando hacia las islas cercanas a las costas peruanas para alimentarse de huevos de aves marinas que allí anidan (Murphy, 1925). Otra de las cadenas montañosas donde también habitan es

en el sur en Argentina en la Sierra de Córdoba en el centro del país (Murphy, 1936). También han habido registros históricos de cóndores en la costa atlántica argentina hasta el siglo XIX (Jácome et al. 2005, Adams 1907).

El cóndor andino es un ave propio de ambientes caracterizados por fuertes vientos y corrientes ascendentes de aire caliente que le permitan ascender para volar. Necesita un hábitat de alimentación despejado para encontrar alimento y una cantidad adecuada de carroña para el consumo (Snyder y Snyder 2000). Por eso el cóndor andino habita en ecosistemas como los páramos andinos en el norte (Colombia, Ecuador, Venezuela), en la puna, en la árida Patagonia y en los desiertos costeros del sur (Perú, Chile, Argentina, Bolivia) (Hendrickson et al. 2003) (Parker et al. 1985), aunque sus territorios de anidación y descanso se encuentran en acantilados y lugares altos lejos del litoral, recorren largos trechos en vuelo para ubicar y consumir carroña (Lambertucci y Mastrantuoni 2008) (Lambertucci et al. 2008).

2.1.3 Características biológicas y etológicas

El cóndor andino es un ave carroñera de gran tamaño, y una de las mayores aves voladoras del mundo con 3,2 metros de envergadura, 1 a 1.30 m de altura, y de 7 a 12 Kg de peso (Haemig 2008). Es de color negro variando hacia el negro azulado, con líneas de plumas blancas en el borde de las alas. Tiene la cabeza desnuda generalmente de color rojizo a negro aunque el tono puede variar notablemente según su estado de ánimo, tiene un collar de plumas suaves de color blanco alrededor del cuello, las patas poseen uñas cortas y no muy cortantes no aptas para agarrar presas sino mas bien para la marcha. No poseen siringe (del Hoyo et al. 1994) (Mayorga 2009).

Poseen un dimorfismo sexual muy notorio. El macho no solo es más grande que la hembra, es mucho más vistoso también, su plumaje es de un negro muy profundo, a veces azulado mientras que la hembra es de tonos marrones oscuros. El macho posee una carúncula en forma de cresta, sus

ojos son marrones amarillentos mientras que los de las hembras son rojos. (Mayorga 2009)

También son conocidos por su gran longevidad, una de las mayores entre las aves. Se conocen registros de parejas de más de 30 años aun reproduciéndose, y en cautiverio se han registrado individuos de hasta 65 a 70 años de edad, seguramente este valor se ve disminuido en libertad (Lambertucci 2007).

2.1.4 Reproducción

El cóndor es un animal de vida larga y de tasa reproductiva baja, ponen un huevo al cual dedican todo su esfuerzo hasta que eclosiona, después crían al polluelo que pasará con ellos hasta mucho tiempo después de aprender a volar, todo el trabajo de criar al polluelo desde la puesta hasta que se desarrolla completamente, les toma alrededor de dos a tres años (Del Hoyo et al. 1994).

2.1.4.1 Biología reproductiva

Se conoce que son aves monógamas, y que solo cambian de pareja si alguno de los dos muere (Adams 1907) (Pavez y Tala 1995). Alcanzan la madurez sexual alrededor de los 6 a 8 años. La hembra pone un solo huevo que es cuidado por ambos padres (Lambertucci y Mastrantuoni 2008). Si el huevo se perdiese durante la incubación temprana puede ser remplazado por los padres mediante una nueva ovoposición por máximo tres ocasiones (Haemig 2008).

2.1.4.2 Etología y reproducción

El ciclo reproductivo completo del cóndor dura alrededor de 2 a 3 años entre cada puesta en el mejor de los casos. Sin embargo depende mucho de las condiciones ambientales como la disponibilidad de alimento (Wallace et al. 1983, Wallace y Temple 1988). Esta tasa reproductiva es muy baja comparada con otras aves, sin embargo tal característica se ve compensada por la longevidad de la especie. Los datos que se tienen sobre su reproducción corresponden a observaciones de animales en cautiverio, pocos son los datos de animales en libertad (Lambertucci. 2007).

El ciclo comienza cuando la pareja se separa del grupo temporalmente para escoger el nido y comenzar los cortejos y la cópula (Pavez y Tala 1995), todo este periodo durara alrededor de 8 a 9 meses (Lambertucci y Mastrantuoni 2008), los individuos que no están reproduciéndose pueden ser observados en nidos comunales (Lambertucci et al. 2008). Se desconoce cómo se forman las parejas en libertad, por lo que en cautiverio es difícil determinar los individuos que podrían ser idóneos para reproducirse.

Los nidos se ubican en lugares de pendientes altas y poco accesibles (Lambertucci 2007). La nidada es pequeña de tan solo un huevo, cuyo periodo de incubación es de alrededor de 60 días en los cuales es cuidado por ambos padres. Transcurrido este tiempo el huevo eclosiona y el polluelo es alimentado con carroña regurgitada provista por sus progenitores (Lint 1950) (Del Hoyo et al. 1994) (Haemig 2008).

Después de que el polluelo nace es cuidado devotamente por ambos padres. Comienza sus primeros vuelos alrededor de los 6 o 7 meses de edad (Lambertucci y Mastrantuoni 2008), pasado este periodo continuará con sus progenitores durante un tiempo prolongado hasta de un año más, después de cierta madurez, deja el nido (Pavez y Tala 1995).

El Juvenil alcanzará la madurez sexual alrededor de los 6 o 7 años, sin embargo no comienzan la reproducción hasta después de un año de

alcanzarla y los primeros huevos que la pareja produce serán infértiles (Del Hoyo et al. 1994) (Lint 1959).

Estas características biológicas intrínsecas en su reproducción han determinado que las acciones humanas perjudiciales para la especie, tengan un efecto mayor debido a la gran cantidad de tiempo y recursos que necesita una población para recuperarse.

2.1.5 Evolución y Filogenia

La familia Cathartidae fue ubicada originalmente en el orden falconiformes porque ocupan el mismo nicho ecológico que los buitres del viejo mundo de la familia Accitripidae y comparten ciertos rasgos morfológicos, sin embargo estudios genéticos posteriores parecen indicar su filiación con el orden Ciconiiformes al cual pertenecen aves como las cigüeñas y los ibis (Awise et al. 1994).

La relación de los Cathartidos con los Ciconiiformes también parece ser confirmada por los registros fósiles (Emslie 1988). Su historia paleontológica es antigua en el continente, primero con los Teratornidos, una familia de Ciconiiformes emparentada con los Cathartidos quienes son posiblemente sus ancestros o descendientes de un ancestro común con los primeros (Cambell y Tonni 1983). Éstas familias contaban con los ejemplares majestuosos como el Teratornis merriami, el ave voladora más grande que ha convivido con el hombre (Miller 1909) (Cambell y Tonni 1983), y el Argentavis magnificens el ave voladora más grande que ha existido (Palmqvist y Vizcaíno 2003).

Los Cathartidae más antiguos del continente han sido encontrados en Norteamérica, estos ingresaron muy probablemente a Sudamérica en el Gran Intercambio Biótico Americano (Emslie 1988). Existieron varias especies de cathartes fósiles, entre los más notables están Brasilogyps faustoi, en el sur y Phasmagyps patritus, en el norte; los más antiguos del

clado en América (Feduccia 1999). Sin embargo entre los más antiguos en denotar semejanza con los actuales cóndores están *Dryornis pampeanus* de Argentina y *Pliogyps charon* de la Florida (Emslie 1988).

Juntamente con los cóndores actuales existieron otras especies de Cathartidos que vivieron con estos en relación simpátrica, tales como *Breagyps clarki*, *Geronogyps reliquus*, *Vultur fossilis* y *Vultur patruus* entre los más documentados, siendo las dos últimas especies sinónimos tempranos de *Vultur gryphus* (Emslie 1988). Estas especies se extinguieron juntamente con la desaparición de la megafauna de mamíferos herbívoros quienes constituía su alimento, y al no poder adaptarse al cambio climático decayeron hasta desaparecer (Tonni y Noriega 1998). Los cóndores actuales pudieron adaptarse a este cambio pero su área de distribución disminuyó considerablemente de su distribución prehistórica hasta el Atlántico a su área de distribución actual (Emslie 1987) (Tonni y Noriega 1998)

La familia Cathartidae actualmente está compuesta por siete especies distribuidas desde América del norte hasta la Patagonia (Del Hoyo et al. 1994). Los géneros supervivientes actuales son:

Género Cathartes

- *Cathartes aura* Gallinazo de cabeza roja.
- *Cathartes burrovianus* Gallinazo cabeza amarilla menor.
- *Cathartes melambrotus* Gallinazo cabeza amarilla mayor.

Género Coragyps

- *Coragyps atratus* Gallinazo negro

Género Gymnogyps

- *Gymnogyps californianus* Cóndor californiano

Género Sarcoramphus

- *Sarcoramphus papa* Gallinazo rey.

Género Vultur

- Vultur gryphus Cóndor andino.

2.1.6 Situación actual

El cóndor andino se encuentra incluido en el Apéndice I de CITES, lo que significa que es considerado dentro del mayor nivel de amenaza dentro de la lista (CITES Apéndice I 2011), y según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN desde el año 2004 es una especie casi amenazada, con poblaciones en disminución, por causa de la persecución humana (Birdlife International IUCN 2004). Se estima una población de 6200 individuos en todo el continente (Díaz et al. 2000).

2.1.6.1 En Sudamérica

Alrededor de su área de distribución, su densidad varía notablemente lo que hace que su estatus como especie en cada región y país varíe mucho, aunque su estatus en toda Sudamérica sea registrado como el oficial internacionalmente.

En la parte norte de Sudamérica su hábitat es extremadamente disperso. Los páramos interandinos son ecosistemas demasiado fragmentados, esto hace que su población sea la menor del continente siendo difícil de identificar a los animales y de encontrar nidos (Parker et al. 1985).

Los ecosistemas sureños son más continuos lo que hace que su distribución y densidad sean mayores y más conocidas. La puna, los desiertos, la pampa y antiguamente la Patagonia, proporcionan un hábitat ideal para el vuelo del cóndor (Sarno et al. 2000). Además los países del sur son los de mayores recursos en el área andina, han tomado iniciativas con programas de reintroducción y reproducción exitosos (Escobar 2007). Por esta razón entre

Argentina y Chile están viven la mayoría de los individuos de la especie (Astore 2010).

En Venezuela su número bajó tanto que se consideró extinto en estado libre, y a principios de los noventa se inició un programa de reintroducción poco exitoso. Actualmente, algunos investigadores aseguran que el cóndor solo fue un visitante ocasional desde los andes colombianos y que nunca hubo suficiente alimento para mantener una población autóctona libre (Aguilar, 2000). En Colombia se han registrado 50 individuos y un número similar ha sido liberado (Astore 2010). En Perú, desde Cajamarca hacia el sur, habitan en la puna y parece que su número es mayor que en el norte, no obstante ya no es un habitante regular de las costas peruanas (Wallace 1983). En Bolivia su número es desconocido, pero han habido ciertas estimaciones de sus poblaciones, en el 2007 se calculó que existían por lo menos 78 cóndores en las montañas de Apolobamba (Ríos-Uzeda y Wallace 2007).

En el sur Argentina y en Chile, donde se encuentra en menor riesgo, se considera que hay datos insuficientes para estimar la población total la cual superaría con creces a la del norte (Díaz et al. 2000) (Sarno et al. 2000). En un conteo realizado en la Patagonia Argentina, en una sola población se pudieron cuantificar 196 cóndores entre jóvenes y adultos sin contabilizar los individuos con crías y huevos (Lambertucci et al. 2008). Posteriormente en la misma área, un nuevo censo contabilizó 246 a 296 individuos. Considerando que la población estimada para Sudamérica es de 6200, este grupo de cóndores corresponderían al 4,8 % de la población total, en un área de tan solo 6300 Km² (Lambertucci 2010).

2.1.6.2 En el Ecuador

La situación actual de esta especie en nuestro país es considerada crítica. Se han realizados varios estudios y esfuerzos para tener una estimación lo más real posible.

Las primeras estimaciones dieron como resultado una posible población de 42 cóndores para principios de los noventa, posteriormente en el 2002 se catalogaron alrededor de 50 cóndores en libertad (Meza et al. 2009). Un estudio hecho en el norte del Ecuador a finales de los noventa reveló que la proporción en la población, era de un juvenil por cada cuatro adultos (Koenen et al. 2000). Esto indica que la población ecuatoriana de cóndores está en declive puesto que no existe el suficiente número de juveniles para remplazar a los adultos que llegan al final de su vida (Wallace y Temple, 1988). Se debe tomar en cuenta también que los cóndores en Ecuador están sujetos a un alta mortalidad por causa de la acción humana, por varias razones que serán expuestas posteriormente (Koenen et al. 2000).

En el último censo realizado el 2008, fueron registrados apenas 27 cóndores en libertad, y aunque su número podría ser mayor, la proporción de adultos y juveniles sigue siendo poco alentadora, aún la población de juveniles es insuficiente para remplazar a los adultos (Meza et al. 2009), evidenciando el claro declive del cóndor ecuatoriano.

2.1.6.3 Razones para que el Cóndor andino este en peligro de extinción

Las causas que han llevado al cóndor a la extinción son de origen antrópico, el desconocimiento, el incremento demográfico, el aumento de la frontera agrícola, la caza y la persecución directa e indirecta son algunos ejemplos que podemos citar para dar una idea del papel del hombre en el estado poblacional de esta ave.

Podemos enumerar varias de las causas que ha llevado al cóndor a la extinción, entre las principales podemos citar la creencia errónea sobre una conducta cazadora del cóndor, éste hecho ha producido la persecución y caza del ave con el afán de proteger el ganado (del Hoyo et al. 1994). Con el mismo fin, se suele colocar carroña envenenada para matar a predadores

como los pumas o los lobos de páramo (Lambertucci 2007); el envenenamiento por plomo de municiones consumido de animales abatidos por cazadores humanos (Snyder y Snyder 2000). La disminución del alimento en el norte de Sudamérica debido a la extensión de la frontera agrícola, es una causa importante de la extinción en esta área, esta situación no se da en el sur debido a que persisten poblaciones de mamíferos autóctonos y grandes extensiones ganaderas (Lambertucci 2007), también se cita colisiones contra alambrados eléctricos (Haemig 2008), Finalmente la caza directa del hombre con fines recreativos, ya sea como premio de cacería al dar muerte a un ave gigante (Haemig 2008), o para fiestas populares, como es el caso de la Yawar fiesta en el Perú, donde se atrapa y ata un cóndor al lomo de un toro bravo, para que le de muerte a picotazos mientras el toro es incitado a dar lucha por los que bajan a la arena, cuando el bovino muere el ave es liberada y continúa la fiesta. En muchos casos el cóndor también muere y es tomado como señal de desgracia por el pueblo (Mayorga 2009).

2.2 GENÉTICA Y BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN

El efecto perjudicial de la acción humana sobre las poblaciones animales ha ido en aumento el último siglo. Innumerables especies han desaparecido por la mano del hombre, muchas otras están en peligro de desaparecer, y algunas ya se han extinguido en su hábitat natural.

Como respuesta a la pérdida de la biodiversidad, se comenzó a gestar una nueva disciplina científica alrededor de la década de 1980 conocida como biología de la conservación, esta rama reciente de la ciencia se encarga de investigar las causas por las cuales disminuyen las poblaciones de las especies y propone soluciones para evitar su extinción de las mismas por causas humanas (Simberloff, 1988).

Para lograr su objetivo, la biología de la conservación recurre a varias otras ramas de la ciencias biológicas como la ecología, la etología, la biogeografía, la genética, y otras no biológicas como la sociología, la antropología, o las ciencias políticas (Groom et al. 2006). Juntas se integran para contribuir en el análisis de especies y ecosistemas o proponer soluciones para revertir el curso de las extinciones causadas por la mano del hombre.

2.2.1 El papel de la Genética en la conservación de las especies

Todos los organismos tienen mecanismos para adaptarse a los distintos cambios en su ecosistema y evolucionar para evitar la extinción, pero en la época actual donde los hábitats se ven modelados por la acción directa o indirecta del hombre, se ha intensificado la presión selectiva sobre los individuos, aumentando el ritmo de extinciones de especies que no alcanzan a adaptarse a un mundo dominado por humanos

Las poblaciones de grandes animales con bajas tasas reproductivas son las que enfrentan mayor peligro, puesto que sus poblaciones de pocos individuos pueden disminuir aún más en los ecosistemas fragmentados por la acción humana. Una población muy baja no podrá mantener la suficiente variabilidad genética para asegurar la adaptación o evolución de la especie, según se expresa en el Teorema Fundamental de la Selección Natural (Fisher, 1930), la tasa de cambio y evolución es directamente proporcional a la varianza genética aditiva del valor adaptativo de la población. Si se reduce la diversidad genética de una población, su potencial evolutivo disminuye invariablemente, y con este también disminuye la capacidad del organismo de adaptarse a la presión selectiva ejercida por los futuros medio ambientes. Por tanto la única manera de garantizar la adaptación y evolución de una especie es mantener una variabilidad genética razonable.

Es en este punto donde la genética como ciencia se convierte en el auxilio necesario para la biología de la conservación, proporcionando información sobre cómo está constituida una población o especie amenazada y su viabilidad genética. Todo esto no sería posible sin las modernas técnicas de genética molecular que se han desarrollado en los últimos decenios, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), el desarrollo de marcadores genéticos polimórficos como los microsatélites, y los analizadores de secuencia, que han puesto esta información encriptada en cada célula de un individuo al alcance de nuestras mentes.

2.2.1.1 Genética poblacional y el problema de la endogamia en parques zoológicos.

Las poblaciones que cuentan con pocos individuos para mantener la especie, entran en un fenómeno poblacional conocido como “cuello de botella” (Maruyama y Chakraborty 1975), donde la diversidad genética se ve disminuida dramáticamente, produciendo una población genéticamente muy homogénea (Bryant et al. 1986). Generalmente una población suele entrar en un cuello de botella cuando un evento causa la pérdida de la mayor parte de los individuos disminuyendo la variabilidad genética, pero también puede darse el mismo fenómeno genético cuando una pequeña parte de la población se separa de la original para colonizar un nuevo territorio, evento conocido como efecto fundador (Maruyama y Chakraborty 1975), o cuando se forma una colonia de cría a partir de pocos individuos (Bryant et al. 1986).

La formación de colonias de poblaciones para cría, ha sido practicada por los humanos desde que comenzó la domesticación de plantas y animales, y es en parte el origen de las razas domesticas que el hombre ha creado a partir de las variedades salvajes. También ha sido una de las prácticas frecuentes en parques zoológicos como método para criar animales en peligro de extinción (Caughley y Sinclair 1994). Esta cría en cautiverio de pequeños grupos poblacionales puede causar los mismos efectos que un

cuello de botella, porque generalmente no se posee muchos animales que den origen a la población. Una población con estas características podría ser poco viable debido al incremento de la depresión por endogamia (Shaffer 1981).

2.2.1.2 Depresión por Endogamia y Deriva Genética.

La endogamia se define como el cruce o apareamiento de individuos con uno o varios ancestros recientes en común (Lorimer 2007). Un hijo de padres emparentados tenderá a una mayor homocigosis para todos los alelos en relación a la población en general, esto también es aplicable para una población altamente endogámica donde la proporción de individuos homocigóticos es la predominante (Antich et al. 1978). La endogamia podría entenderse también como una consecuencia del cuello de botella

Las poblaciones sometidas a cruces endogámicos presentaran incremento de la frecuencia de genes recesivos perjudiciales y letales, que en homocigosis serán expresados más frecuentemente que en una población no endogámica en equilibrio (Nicholas, 1998) (Lorimer, 1997) (Antich et al. 1987).

Esta incontable cantidad de genes perjudiciales acumulados tienen varios efectos sobre las poblaciones y los individuos, que condicionan su calidad de vida y también pueden determinar su supervivencia. Entre estos podemos mencionar los siguientes (Lorimer 1997):

- Elevada incidencia de enfermedades genéticas recesivas
- Reducción de fertilidad femenina y viabilidad espermática
- Fenómenos de asimetría física
- Alta mortandad prenatal y de recién nacidos
- Lento ritmo de crecimiento
- Menor talla de adulto
- Debilidad del sistema inmunológico
- Alteraciones del comportamiento

A todos estos efectos derivados, se les conoce como depresión por endogamia (Nicholas 1998). Aunque no necesariamente una población endogámica entrará en depresión, es muy probable que ocurra, esto depende mucho de un proceso denominado deriva genética (Charlesworth y Charlesworth 1987).

La deriva genética es un proceso estocástico (al azar) que cambia la frecuencia de los alelos en una población, fija los alelos más comunes y tiende a la desaparición de los alelos más raros (Nicholas 1998), en una población grande interactúa junto con otras fuerzas de selección como la mutación y la selección natural que equilibran el flujo genético, pero en una población pequeña tiende a disminuir la variabilidad genética (Caughley y Sinclair, 1994).

Es cierto que una población pequeña tiene mayor riesgo de extinguirse que una grande, pero esto también depende de cada especie. El punto de no retorno para una especie en peligro de extinción es conocido como Tamaño Mínimo de Población Viable o MVP por sus siglas en inglés, y se define como el mínimo tamaño que una población requiere para mantener una variabilidad genética suficiente para no caer en la extinción (Shaffer 1981). Es decir, la menor población aislada que posea una probabilidad del 99% de persistir durante 1000 años a pesar de los efectos de la aleatoriedad demográfica, ambiental y genética, y de los desastres naturales. Para determinar cuál es la MVP de cada especie se utilizan modelos de viabilidad poblacional, estos modelos exploran la relación entre tamaño poblacional y riesgo de extinción.

El riesgo de extinción naturalmente es mayor cuanto menor es la población, sin embargo esto también depende de cada especie y del estado de su hábitat. En el caso del cóndor andino, el cual no es considerado en riesgo inmediato de extinción, debido a que el tamaño poblacional de la especie en toda su extensión no lo amerita así, debe ser examinada la situación individual de cada país para tomar acciones adecuadas por región. En el

Ecuador el número de individuos no podría sostener la población ni siquiera en los próximos cincuenta años como se ha explicado anteriormente.

El efecto de la pérdida de variabilidad genética ha sido durante mucho tiempo conocido aunque se desconocía sus causas exactas, un testimonio de esto es el tabú que representaba para las sociedades humanas los matrimonios endogámicos originado probablemente de los problemas observados en los hijos de estas uniones (Antich 1978), pero ha sido poco lo que se había podido conocer en profundidad hasta el descubrimiento del ADN y la invención de las modernas técnicas de genética molecular, lo cual se desarrolla paralelamente a la pérdida de diversidad biológica por causas antropogénicas, dándonos nuevas herramientas para analizar y enfrentar el panorama ecológico actual.

2.2.2 Microsatélites

Los microsatélites o STR (Short Tandem Repeats) son secuencias pequeñas (<13 pb) repetitivas de ADN no codificante, que se encuentran distribuidas por todo el genoma de todas las especies. En el ser humano representa cerca del 3% del genoma, son neutros, codominantes y altamente polimórficos. (Watson 2008). Su polimorfismo viene dado gracias al aumento o disminución del número de las repeticiones de las secuencias repetitivas, esta cualidad les capacita para ser útiles como marcadores moleculares en diversas áreas de estudio, como la genética forense, genética poblacional, marcadores para alelos predisponentes para enfermedades, marcadores relacionadas a características de interés comercial en animales domésticos y como herramienta de análisis para diversidad genética de fauna silvestre (Hajeer A et al. 2000) (Aranguren-Méndez et al. 2005).

Algunas características para que un microsatélite sea un marcador útil para diversos estudios son, además de su polimorfismo, la capacidad de

mantener las secuencias flanqueantes muy conservadas y relativamente invariables en relación con la variación de la secuencia pequeña repetida (Hancock 1999), debido a que a partir de éstas se debe diseñar los primers, y además que el ensayo para amplificar la secuencia sea altamente repetible (Hajeer A et al. 2000). En el caso de que el microsátelite sirva como marcador de alguna característica o alguna enfermedad debe tomarse en cuenta el nivel de ligamiento entre la existencia del microsátelite y la ubicación del gen en estudio, para esto es necesario que se encuentren obligatoriamente en el mismo cromosoma y que estén extremadamente cercanos, cuanto menor la distancia entre el gen y su marcador mayor el nivel de ligamiento y su utilidad (Cheng y Crittenden 1994) (Cheng et al. 1994).

2.2.2.1 Uso de microsátelites en parentesco, paternidad y conservación de especies.

Dentro del espectro de usos para los microsátelites como herramientas para el análisis de individuos y poblaciones más que de características y enfermedades, están las pruebas de filiación, En el caso de los humanos el uso más común que se le ha dado ha sido como una forma de confirmar paternidad, y parentesco (Hancock 1999). Esta metodología ha sido transpolada con éxito a diversos estudios en animales (Cheng y Crittenden 1994) (Aranguren et al. 2005) y plantas (Hernández et al. 2008) (Hurtado et al. 2004) para los cuales han sido diseñados microsátelites específicos, y comprobado su efectividad en diversos estudios.

Los microsátelites se han convertido también en una útil herramienta para analizar la dinámica de las poblaciones, donde se vuelve un objeto de estudio muy interesante las poblaciones pequeñas, sometidas a cuello de botella o aislamiento geográfico y posterior efecto fundador como modelador de la población. Sin embargo no es solo el mero estudio y conocimiento lo que vuelve necesario el uso de esta metodología, sino también la necesidad

imperante de conservar la diversidad genética de especies y variedades que podrían enfrentar la extinción por causa de la acción humana. Así la información útil y necesaria sobre la población en estudio, nos da pautas claras sobre como mantener mayor diversidad genética y como esto contribuye al mantenimiento de poblaciones sanas y con alta probabilidad de sobrevivir (Aranguren et al. 2005).

2.2.3 Experiencia con el cóndor californiano

El cóndor californiano (*Gymnogyps californianus*) es una especie de ave carroñera de la familia Cathartidae, la misma que el cóndor andino, con quien también comparte cierta características biológicas y ecológicas (Del Hoyo et al. 1994). Ocupan nichos ecológicos muy similares en territorios distintos, lo que los ha hecho sensibles a los mismos peligros y los ha enfrentado a los mismas acciones humanas que en los dos casos los ha llevado a estar en peligro de extinción (Lambertucci 2007) (Snyder y Snyder 2000). Su área de distribución histórica abarcaba gran parte del sureste de los Estados Unidos y parte del noreste de México, siempre circunscrito a la costa del Pacífico (Haemig 2008), aunque se han encontrado registros fósiles de la especie en la costa atlántica (Emslie 1988). Actualmente su distribución se encuentra restringida a ciertas áreas en parques nacionales en los Estados Unidos, en los estados de California y Arizona; y en México en el estado de Baja California (Rojo et al. 2003).

A diferencia del cóndor andino, la menor distribución territorial y menor población, junto con el rápido crecimiento demográfico y consecuente demanda de recursos en Norteamérica, aceleró el declive del cóndor californiano (Snyder y Snyder 2000), entonces a finales de los ochenta la población fue considerada inviable en libertad y por tanto muy cercana a la extinción. Es así que como parte del programa de reintroducción, los 27 individuos en libertad fueron puestos en cautiverio para iniciar la

reproducción y posterior reintroducción de los nacidos en cautividad (Rojo et al. 2003).

Con la ventaja de pertenecer a un país del primer mundo y con la mejor tecnología existente en esa época, se inició la caracterización genética de todos los individuos existentes. Inicialmente se usó un protocolo conocido como DNA Fingerprinting por RFLP's o Huella genética con digestión enzimática (Geyer et al. 1993) muy usado en genética forense. Mediante este trabajo se hizo la primera caracterización genética y la primera genealogía teórica de los animales. Posteriormente además de estas metodologías, se procedió a hacer un estudio de ADN mitocondrial (Chemnick et al. 2000) y también se diseñaron microsatélites específicos amplificando regiones aleatorias mediante Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC), y sí se diseñaron primers específicos en regiones que presentaron repeticiones en tándem de pequeñas secuencias (Romanov et al. 2009).

El resultado en el análisis ampliado de la población demostró que ésta estaba dividida en tres clanes claramente diferenciados, de los cuales procede el total de los individuos actuales (Romanov et al. 2009). Gracias a este estudio se pudo hacer frente adecuadamente al efecto obvio del cuello de botella: la pérdida de diversidad genética y el incremento de alelos deletéreos, en la población de cóndor californiano comenzó a expresarse de forma inesperada, una enfermedad a conocida como condrodistrofia (Ralls et al. 2000), que afecta el desarrollo de los miembros y que ha sido diagnosticada en otras aves y mamíferos, incluso en el ser humano se observa con frecuencia. Se encontró que la condición embrionaria letal de la condrodistrofia se segregaba en el árbol genealógico del cóndor californiano con carácter mendeliano, de forma consistente con una herencia autosómica recesiva (Ralls et al. 2000). Posteriormente ha sido posible estudiar y ubicar locus de genes encontrados en otras especies modelo (Li et al. 1993) (Dannenberg et al. 1982) (Hermes et al. 1990) y que probablemente estén relacionados con la dolencia en el cóndor californiano. De esta manera se ha

podido realizar diagnósticos del riesgo de que los cruzamientos mantengan y dispersen este alelo letal (Romanov 2009).

2.2.3.1 Librería de Microsatélites para el cóndor californiano

La librería de microsatélites fue creada por Genetic Identification Services, en Chatsworth California-Estados Unidos, siguiendo los protocolos de la compañía, e incluye 8 sublibrerías nombradas de la A a la H, entre cuyos motivos repetitivos se encuentran CA, ATG, TACA, TAGA, AAG, AAT, AAAT y CATC. Para el diseño de los marcadores, unos 180 clones (creados mediante BAC) al azar fueron secuenciados, para dar un total de 17 microsatélites informativos (Romanov et al. 2009).

Entre éstos, según la cantidad de nucleótidos en cada repetición, se encontraron: 13 tetranucleótidos, 2 trinucleótidos y 2 dinucleótidos. En el análisis de la diversidad genética y el ligamiento de cada marcador se determinó que en el pedigrí de los 121 individuos relacionados, comprendiendo cuatro generaciones y siete familias, el promedio en el número de alelos fue 2.41 por locus, el número efectivo de alelos fue de 1.85, el promedio de heterocigocidad fue 0.45 y la diversidad genética fue de 0.42. Para ocho de los 17 loci, hubo desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg y en un análisis preliminar de ligamiento, se sugiere una relación entre los loci D10 y D6, entre A20 y D9 y entre B7 y H238 (Romanov et al. 2009). La relación de todos los microsatélites usados en el estudio de Romanov et al. Se puede consultar en el Anexo 1.

2.2.3.2 Aplicación al cóndor andino

Dentro de la familia Cathartidae, conocidos como los buitres del nuevo mundo, existen especies muy distribuidas a lo largo del continente, en muchos casos conviviendo en relación simpátrica. También existen especies

restringidas a ciertas áreas geográficas y otras diseminadas por casi todo el continente como es el caso del gallinazo negro (*Coragyps atratus*). Todas estas situaciones han creado distintas relaciones con el ser humano y esa interacción ha tenido distinto efecto sobre cada especie. Dentro de estas interacciones podemos contemplar como el tema que nos compete, las acciones humanas que han llevado a ciertas especies a encontrarse en peligro y los estudios sobre el genoma de cada especie. Es en este punto en el que para proceder con el trabajo de investigación, se debe escoger desde que punto partir y que estudios existen previamente sobre genética en cada una de las especies que comprenden la familia.

Se ha tomado como una especie base para el estudio al cóndor californiano, quien debido a que su situación geográfica, su significado simbólico en su tierra de origen y su cercana extinción (Snyder y Snyder 1994), lo convirtieron en candidato óptimo para utilizar las mejores técnicas disponibles para caracterización genética durante la década de los noventa, época en la que apenas investigación en genética en Sudamérica estaba asentando sus bases de forma incipiente. Este hecho hizo que a pesar de que las investigación sobre la filiación entre las dos especies de cóndores de Norte y Sudamérica sugieren que no son los más cercanos dentro de la familia (Awise et al. 1994), la información existente, el trabajo realizado y la similitud de características que los ha llevado a la extinción proporciona la mas grande y antigua base sobre la cual construir la tarea de caracterizar a los cóndores andinos e incluso podría ser aplicado sin problema a otros individuos de la familia. La intención del proyecto es también escoger que información seria usada, de forma empírica al desconocer como es el genoma del cóndor andino.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 PROPUESTA INVESTIGATIVA

Con objeto de dar una base técnica para mantener la diversidad genética en el programa de reproducción en cautiverio de los cóndores andinos del Ecuador, se procedió a iniciar un proyecto que pretende preparar marcadores moleculares útiles para realizar un mapeo genético de la población disponible, basándose en librerías genéticas de aves emparentadas como *Gymnogyps californianus*, *Coragyps atratus* y no emparentadas como *Hirundo rustica*, como primeras especies utilizadas.

Se pretende estandarizar varios microsátélites para el genotipaje, y utilizar la técnica de análisis de fragmentos para conocer los alelos existentes en cada marcador, y finalmente comparar del genotipo de los individuos para determinar su nivel de parentesco.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo final perseguido en el presente trabajo es estimar la diversidad genética y el nivel de parentesco de la población de cóndores ecuatorianos cautivos como base del proyecto de reintroducción y conservación de la especie en el país, y recomendar cuales serían los emparejamientos mas recomendables para disminuir los efectos de la endogamia.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el proyecto se contó con 19 individuos distribuidos en diversos zoológicos y centros de tenencia de fauna en el país, entre estos tenemos:

- 4 Individuos del Parque Cóndor en Otavalo, Provincia de Imbabura
- 8 Individuos de la Hacienda Zuleta en el Cantón Cayambe-Pichincha

- 2 Individuos del Zoológico de Guayllabamba Cantón Quito-Pichincha
- 2 Individuos de la Hacienda Ilitio Provincia del Cotopaxi
- 3 Individuos del Zoológico de Baños, Baños de Agua Santa Provincia de Tungurahua

El proceso de extracción de ADN, amplificación de los microsatélites y análisis de fragmento se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de las Américas.

3.3.1 Muestreo

El muestreo se realizó con la ayuda de los doctores Andrés Ortega y Pablo Arias, Médicos Veterinarios especializados en fauna silvestre. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena metatarsial medial, con las aves en decúbito lateral. Se utilizó vacutainer, jeringas y tubos con EDTA al vacío para tomar las muestras las mismas que fueron almacenadas en un contenedor con hielo hasta su llegada al laboratorio.

Las muestras fueron almacenadas a 4° C para inmediatamente proceder a la extracción de ADN. La sangre restante después de la extracción de ADN fue tratada y lavada con PBS para eliminar el suero, y almacenada a -20° C para posteriores extracciones de ADN de ser necesario.

Para facilitar el manejo e identificación de los individuos, se les otorgó un número y código interno. Los individuos fueron identificados de la siguiente forma:

Tabla 3.1. Total de Individuos de cóndor andino cautivos en el Ecuador, usados para el trabajo de genotipificación

Nro. ID.	Cod. UDLA	Nro. Chip	Ubicación	Sexo
1	ZGM	026056108	Zoológico de Guayllabamba	Masculino
2	ZGH	094123612		Femenino
3	HZH-0	026780623	Hacienda Zuleta	Femenino
4	HZM-1	098012358		Masculino
5	HZM-2	097874874		Masculino
6	HZH-2	097880288		Femenino
7	CIM-1	082768040	Hacienda Iltio	Masculino
8	CIH-2	094267370		Femenino
9	CPO-1	037788328	Parque Cóndor	
10	CPO-2	025876614		
11	CPO-3	094120126		
12	CPO-4	026054856		
13	Z2H-3	097871322	Hacienda Zuleta	Femenino
14	Z2M-3	098007811		Masculino
15	Z2M-4	097883568		Masculino
16	Z2M-5	097885316		Masculino
17	CB-1	026811888	Zoológico de Baños	
18	CB-2	112869247a		
19	CB-3	026779347		

Elaborado por: El Autor

3.3.2 Técnicas de Biología molecular

A partir del descubrimiento del ADN una nueva forma de abordar la ciencia de la herencia se abrió paso en el conocimiento humano, así pudimos conocer íntimamente el secreto del cual emanaba toda forma de vida. La genética se adentró profundamente en conocer las estructuras y dinámicas de esta molécula y la complejidad de la información que se codifica dentro de ella. Entonces se idearon distintas formas y técnicas que nos permitieron atestiguar la mecánica de la herencia, el ADN fue analizado, replicado, modificado y estudiado como nunca antes gracias a dichas técnicas que le dieron al hombre la posibilidad de comenzar a entender algo que hasta ese momento solo había imaginado.

3.3.2.1 Extracción de ADN

El ADN de las muestras fue extraído mediante el kit PureLink™ Genomic DNA Kits de Invitrogen™, siguiendo el protocolo establecido para muestras de sangre con ligeras modificaciones:

La sangre fue lavada con PBS 1x (Phosphate Buffer Saline) y centrifugada para eliminar el suero y conservar los elementos figurados de la sangre, posteriormente fue tratada con solución de lisis de eritrocitos. Este proceso fue necesario ya que el suero de la sangre de las muestras de cóndor es mucho más denso que el de la sangre humana y esto ocasionaba un taponamiento de la membrana de las columnas del kit. Se especuló posteriormente que la aparente mayor densidad de la sangre del cóndor es debido a una mayor concentración de proteínas en el suero causada por un bajo consumo de agua, situación observada en aves rapaces en cautiverio y causada por el estrés del encierro lo que llevaba a una mayor densidad sanguínea comparada con aves de vida libre de la misma especie (Toro et al. 1997).

A continuación se coloca hasta 100 µl de la sangre lavada y resuspendida en PBS en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml donde se añade también 20 µl de Proteinasa K y 20 µl de RNAsa A, se homogeniza el contenido del tubo mediante vortex y se incuba a temperatura ambiente durante dos minutos. Luego se añade 200 µl de Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezcla bien hasta obtener un producto homogéneo. Se incuba a 55° C por 10 minutos para promover la digestión de las proteínas. Finalmente se añade 200 µl de Etanol al 95-100% y se mezcla nuevamente mediante vortex.

Para la fase de enlace del ADN en la membrana de la columna se debe colocar la mezcla del lisado en la columna dentro del tubo de colección, y se centrifuga a 10000 g por un minuto a temperatura ambiente. Posterior a esto se descarta el tubo de colección con su contenido y se coloca la columna en un nuevo tubo de colección, donde se añade 500 µl de Wash Buffer 1 previamente añadido etanol, después se centrifuga la columna a 10000 g por un minuto a temperatura ambiente. Se descarta el tubo de colección con todo su contenido, se coloca la columna en un nuevo tubo de colección y se procede a añadir Wash Buffer 2 preparado con etanol en la columna, se centrifuga a máxima velocidad por tres minutos a temperatura ambiente para eliminar todo el buffer. Se descarta este último tubo de colección.

Finalmente para la elución del ADN, se coloca la columna en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, se añade de 25 a 200 µl de Genomic Elution Buffer a la columna y se deja incubar por un minuto a temperatura ambiente, luego se centrifuga por dos minutos a máxima velocidad para liberar el ADN purificado en el tubo eppendorf, ahora puede ser almacenado a -20° C. Si se desea obtener mas ADN se puede repetir el proceso de elución, sin embargo la concentración disminuye al incrementar el volumen de elución.

3.3.2.2 Análisis cuantitativo y cualitativo de ADN extraído.

La comprobación de la presencia de ADN fue realizada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se tomó 10 μ l de cada muestra extraída y fue corrido en gel aproximadamente 20 minutos. Después se observó en transiluminador UV y se anotó cuales muestras habrían sido exitosas en su extracción.

Para determinar la cantidad de ADN en las muestras se usó el equipo Qubit[®] Fluorometer y los kits Quant-it[™] dsDNA BR Assay para rangos de 2 a 1000 ng y Quant-it[™] dsDNA HS Assay para rangos de 0.2 a 100 ng, dependiendo de la calidad de ADN observada en el gel. Para el proceso de cuantificación se debe preparar la solución de trabajo que consiste en el Buffer y el fluoróforo según el kit que hayamos elegido. Las cantidades son las siguientes: 1 μ l de buffer por reacción, de 1 a 20 μ l de ADN y de 180 a 198 de buffer hasta completar 200 μ l por reacción, todo se coloca en tubos eppendorf de 0.5 ml que vienen especialmente para uso en el Qubit[®] luego de ser mezclado en el vortex por unos segundos se deja incubar por un minuto. Después se coloca en el equipo para la lectura, y se siguen las instrucciones del equipo para determinar la cantidad de material contenido. Si se desea se puede hacer el cálculo de la concentración directamente en el equipo se ingresa el volumen de ADN que fue añadido a la mix.

De ser necesario se puede calibrar nuevamente el equipo con las soluciones estándar para este objetivo, de igual manera que para el análisis de concentración de ADN se coloca 10 μ l las soluciones estándar junto con la solución de trabajo preparada previamente como se indicó antes, en lugar de correr el programa para lectura se debe correr el programa de calibración y seguir los pasos según se indique en el equipo.

3.3.2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) fue desarrollada y perfeccionada por Kary Mullis en 1986, la técnica se basa en obtener un fragmento dado de ADN por medio de la acción de las polimerasas para obtener un gran número de copias y facilitar su estudio (Bartlett y Stirling 2003). La efectividad de esta técnica contribuyó a su popularización y abaratamiento de los costos, convirtiéndola en una herramienta básica para cualquier estudio e investigación en genética.

Las polimerasas son las enzimas encargadas de replicar el ADN, en la PCR se usan juntamente con ciclos alternados de temperaturas que abren la doble hélice para permitir la acción de la polimerasa y dejan que se vuelvan a unir para después volver a duplicarlas (Watson et al. 2008). De esta forma se consiguen un gran número de copias de una región específica del ADN listas para ser analizadas.

Se usó como base para el diseño de la PCR, un protocolo modelo para microsatélites, la temperatura de anillamiento inicial fue tomada de los datos proporcionados con las secuencias, sin embargo se realizó un gradiente de temperatura para corroborar que la temperatura sugerida servía para la amplificación. Si no se conseguía amplificación se modificaba los protocolos comenzando por la concentración de los reactivos, y después con la duración de los ciclos.

3.3.2.4 Microsatélites

Para la elección de los marcadores moleculares a ser utilizados se contó con la ayuda de la Dra. Sher Hendrickson (Laboratory of Genomic Diversity National Cancer Institute), quien había asistido en algunos trabajos en biología molecular en el proyecto de reintroducción del Cóndor Californiano. A través de ella se pudo acceder a las secuencias de los primers que fueron usados en la especie californiana incluyendo secuencias cuyos diseños no

se encontraban publicados en NCBI. En especies de animales emparentados, se espera cierta conservación de amplias regiones del genoma, sin embargo no se puede saber exactamente cuántas regiones comparten dos especies hasta amplificar mediante PCR los locus en cuestión.

Se recibieron secuencias de 20 pares de primers que incluían tres microsatélites no pertenecientes al cóndor californiano. Todos los microsatélites fueron nombrados según el locus donde se ubicaban en la especie original. El número de repeticiones varía desde dinucleótidos hasta tetranucleótidos siendo estos últimos el tipo más común. Se usaron diversas PCR para determinar qué microsatélites se lograban amplificar en el ADN del cóndor andino y serían usados en el siguiente procedimiento. Finalmente seis microsatélites fueron escogidos para el análisis de fragmento. Los microsatélites escogidos fueron los siguientes:

Tabla 3.2. Descripción de los microsatélites amplificados con éxito en ADN de cóndor andino, con sus primers (forward y reverse) y características.

LOCUS	SECUENCIA PRIMER FORWARD	SECUENCIA PRIMER REVERSE	TIPO REPETICIÓN	TAMAÑO pb <i>Gymnogyps californianus</i>
A20	TCAGCACCAT TAGTGTCAGAG	AAAGGTCCAA GTGTTTTTACG	Dinucleótido	206-208 pb
B7	AAGCCAGGAT AATGTAGGAGG	AACCCCATAC TGGAACCAG	Trinucleótido	165 pb
C5	GATACGGGG CACAGAGTT	CGCAAGCAGTC AAATAGATAG	Trinucleótido	179-191 pb
H3	CCAGGTCAT GTCCACTTTTT	AATCCCCAGT ATCAATGCAG	Tetranucleótido	119-127 pb
H115	GCACAGAGTG AGAGAGCATTTC	AGGAGGAGGG AGATATTCAGC	Tetranucleótido	196 pb
H269	CTCTGCTGT CCGTTTGTTT	AGGATGGCT GGATGAATG	Tetranucleótido	215-223 pb

Elaborado por: El Autor

3.3.2.5 Protocolos de PCR para amplificación de microsatélites

Con el objetivo de estandarizar el protocolo para la amplificación mediante PCR de los microsatélites necesarios para el estudio, se realizó un proceso sistemático donde se testó las secuencias sugeridas para el estudio. Se usó inicialmente un protocolo estándar para amplificar microsatélites (Hajeer A et al. 2000), tanto en las concentraciones de los reactivos en PCR, como de las temperaturas, duración y número de ciclos.

El protocolo de las concentraciones de reactivos consistió en utilizar un volumen final de 15 a 25 μ l, donde el contenido y la concentración de los reactivos variaban ligeramente en cada microsatélite. Tomando como volumen final 25 μ l, los volúmenes de los reactivos fueron los siguientes: 2,5 μ l de Buffer de PCR 10x y con concentración final 1x, 1 μ l de $MgCl_2$ a 50 mM y una concentración final de 2.0 mM (dependiendo del microsatélite amplificado puede ser menor o mayor), 1 μ l de dNTP's (dideoxinucleótidos trifosfato) a 10mM cada uno, alcanzando una concentración final de 0.4 mM cada uno, 1 μ l de cada primer, forward y reverse, a 10 μ M y a una concentración final de 0.4 μ M, 0.3 μ l de Taq Polimerasa, y 4 μ l de ADN a 4ng/ μ l para alcanzar 100 ng de ADN en la reacción, para llegar hasta el volumen final requerido se usa 14,2 μ l de agua MiliQ en esta caso.

El programa de amplificación contempla ciclos que fueron probados en cuanto a temperatura y duración para ser los mas adecuados para el propósito requerido. El programa de ciclos está conformado de la siguiente manera: un ciclo inicial de 95°C por diez minutos para la denaturación del ADN y activación de la Taq Polimerasa, el siguiente ciclo de 95° C durante 45 segundos es donde comienza la repetición de los ciclos, el siguiente ciclo para anillamiento contempla temperaturas desde 58° C hasta 63° C durante 45 segundos, la mayoría de los microsatélites amplifican bien en cualquier rango de estas temperaturas, siendo la mejor amplificación para PCR multiplex la temperatura de 59° C, la temperatura de extensión es 72° C durante 45 segundos donde terminan los ciclos repetitivos, y finalmente la ultima extensión a 72° C por 7 minutos. El número de ciclos es de 35. Los

fragmentos amplificados se comprueban mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio por 30 a 45 minutos, y finalmente se observa en un transiluminador UV.

3.3.2.6 Análisis de fragmentos

El protocolo de análisis de fragmento fue realizado en el Equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems de cuatro capilares, se trata de una electroforesis capilar en poliacrilamida de los fragmento amplificados y marcados en un extremo por un fluorocromo que reacciona a la excitación de un laser y que es leído por un lente especial, la alta resolución que se logra en este protocolo hace que puedan ser distinguidos fragmentos de hasta un nucleótido de diferencia.

Para el análisis de fragmentos el primer forward debe ser sintetizado con un fluorocromo específico. Los seis primers marcados fueron agrupados según su tamaño en tres pares para evitar que los picos de fluorescencia se sobrelapen en microsatélites con tamaño similar. Cabe señalar que los grupos fueron ideados basándose en las diferencias de tamaño encontrado en el cóndor californiano debido a que en algunos casos las diferencias de tamaños entre un microsatélite y otro en el gel de agarosa no eran apreciables en los ensayos con ADN de cóndor andino.

Se utilizaron los siguientes fluorocromos NED de color amarillo, PET de color rojo y VIC de color verde, con la siguiente disposición:

- NED: C5 y H269
- PET: B7 y A20
- VIC: H3 y H115

La preparación de las muestras para el análisis de fragmento consiste en realizar nuevas PCR's remplazando el primer forward original por el primer forward marcado con fluorocromo. Para facilitar el trabajo para el análisis de

fragmento se usó el mismo protocolo de amplificación para todos los microsátélites, y se usaron PCR's multiplex con el fin de facilitar el análisis por parte del equipo y optimizar recursos. El volumen final de PCR con primers marcados fue de 10 μ l, conformado por: 1 μ l de Buffer de PCR 10x alcanzando una concentración final de 1x, 0.4 μ l de $MgCl_2$ a 50 mM para alcanzar una concentración final de 2 mM, 0.5 μ l de dNTP's a 10 mM cada uno y con concentración final de 0.5 mM, 0.4 μ l de cada uno de los dos primers forward marcados con fluorocromo que vayan a ser usados, a una concentración de 10 mM y concentración final en la PCR de 0.4 mM, igualmente se coloca 0,4 μ l de los dos primers reverse a 10 mM sin marcar correspondientes a los dos microsátélites para la reacción, para alcanzar una concentración final de 0.4 mM, se añade también 0,2 μ l de Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen USA), 2,5 μ l de ADN a 4 μ g/ μ l para obtener 10 μ g por reacción, y finalmente se completa el volumen con agua usando 4.6 μ l de agua MiliQ. Los microsátélites para PCR multiplex fueron agrupados de la siguiente manera: C5 y A20 en una PCR, H3 y B7 para otra, y H115 y H269 en la última PCR.

El programa de amplificación no varía mucho con el programa inicial presentado para los primers sin marcar, y consiste en un ciclo inicial de 95°C por diez minutos para denaturar el ADN, un segundo ciclo de 95° C durante 45 segundos para dar comienzo a repetición, el siguiente ciclo para anillamiento contempla temperaturas de 58° C para la PCR multiplex de C5 y A20, y 60° C para las PCR's multiplex de H3 y B7y de H115 y H269, la duración de esta ciclo es de 45 segundos, luego la extensión a 72° C durante 45 segundos aquí finalizan la repetición de ciclos, la última extensión es de 72° C por 7 minutos. El número de ciclos es de 35. De ser necesario los fragmentos amplificados pueden ser testados en una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio por 30 a 45 minutos, y se usa en un transiluminador UV para observar las bandas correspondientes al amplificado.

El siguiente procedimiento antes de pasar al análisis que hace el equipo es el choque térmico, este proceso consiste en calentar los productos de PCR a 95° C para lograr que el amplificado se denature de la misma manera que en la PCR y después se enfría rápidamente a temperaturas menores de 20° C, al denaturarse la cadena se abre y al enfriarse rápidamente cada lado de la cadena se dobla sobre si misma creando una estructura tridimensional única que depende de la secuencia de cada cadena, esto hace posible que fragmentos del mismo peso y donde solo varia un nucleótido tomen formas tridimensionales diferentes, lo cual cambia la forma en que fragmentos similares pero con distinta secuencia migran a través de un gel o de un capilar facilitando su separación y análisis (Orita et al. 1989).

Para preparar la muestra para el choque térmico se parte de un volumen de 10 µl por muestra analizada que se compone de: 9.1 µl de HI DI ® formamida que ayuda en la denaturación, 0.4 µl de marcador de peso interno LIZ® Estándar 500 que consiste en secuencias de pesos específicos y marcadas previamente con fluorocromo de color naranja cuya función es ser leído por el equipo y ser tomado como referencia de tamaños para comparar con los productos amplificados de PCR y 0.5 µl de la PCR previamente realizada. Todo esto se hace en la placa de 96 pocillos del analizador genético. Cabe señalar que se debe hacer un mínimo de cuatro análisis por vez o múltiplos de cuatro, porque el equipo es de cuatro capilares, si se deja al equipo absorber por un capilar un pocillo vacío se podría dañar a dicho capilar y al equipo, en caso de no tener más muestras para analizar se puede llenar el pocillo vacío con agua o con formamida para evitar los daños antes mencionados. El choque térmico se realiza colocando la placa del analizador genético dentro de un termociclador de 96 pocillos donde se programa un ciclo de 95° C durante 3 a 5 minutos, transcurrido ese tiempo se traslada la placa de inmediato a un base congelante para tubos de 0.2 µl que se encuentra a -20° C o a un envase con hielo, se mantiene a la placa en el frío por 3 minutos y se seca con una toalla el exceso de humedad en el exterior de la placa para prevenir cualquier humedecimiento del equipo. Finalmente se la coloca en el analizador genético y se procede a la

electroforesis capilar y adquisición de datos por medio de la cámara de detección del Analizador Genético.

3.3.3 Análisis Estadístico

Con la finalidad de dar el proceso adecuado a los resultados finales obtenidos, se procederá a usar diversas herramientas estadísticas que nos permitan visualizar adecuadamente el estado de la población,

Los resultados serán analizados con varias herramientas usadas en genética de poblaciones para determinar el estado de la población. Para dicha tarea se contara con la ayuda de programas computarizados que nos facilitan el procesamiento de datos, como Microsatellite Toolkit for Excel versión 3.1 y POPGENE versión 1.31.

3.3.3.1 Frecuencias alélicas y genotípicas

La determinación de la frecuencia de alelos y genotipos de los marcadores utilizados en el estudio, es el primer paso sobre el cual se basa todo el análisis estadístico. La frecuencia se calcula dividiendo el número de veces que aparece cada alelo o genotipo para el total de alelos o genotipos respectivamente. El resultado es siempre menor que uno, número que representa la frecuencia sumada de todos los alelos/genotipos.

3.3.3.2 Prueba de bondad de ajuste: Hardy-Weinberg y Chi-cuadrado

El modelo de equilibrio Hardy- Weinberg, es un modelo básico de genética de poblaciones que estudia la dinámica de las leyes de Mendel sobre la variabilidad de las mismas. El equilibrio HW define una población ideal como aquella donde existe un apareamiento aleatorio y la migración, mutación y

deriva genética no existen, permitiendo a las frecuencias genotípicas eventualmente alcanzar valores que se mantienen estables. Por supuesto una población en tales condiciones no existe sin embargo esta visión nos ayuda a entender como se encuentran distribuidos los alelos y genotipos dentro de la misma. El equilibrio Hardy-Weinberg se define de la siguiente manera:

$$pA^2+2pAqB+qB^2$$

Donde pA es la frecuencia del primer alelo en un locus dado y qB es la frecuencia del segundo alelo. Para locus con mayor polimorfismo se expresa de la siguiente manera:

$$pA^2+2pAqB+qB^2+2pArC+2qBrC+rC^2$$

Aquí rC es la frecuencia de un tercer alelo, así se puede extender para varios alelos, sumando las frecuencias elevadas al cuadrado de cada alelo, más las frecuencias de las combinaciones de dos alelos multiplicadas entre ellas y para dos.

$$pA^2+qB^2+rC^2+tD^2+uE^2+2pAqB+2pArC+2pAtD+2pAuE+2qBrC+2qBtD+2qBuE+2rCtD+2rCuE+2tDuE$$

En cuanto a Chi-cuadrado (χ^2) se utiliza cuando se analizan los resultados de un cruce y se necesita conocer si los resultados obtenidos se desvían significativamente de los resultados esperados, en este caso los resultados obtenidos son las frecuencias genotípicas reales determinadas anteriormente, y los resultados esperados son las frecuencias genotípicas derivas de la utilización de HW con las frecuencias alélicas obtenidas. La formula para obtener Chi-cuadrado es la siguiente:

$$\chi^2 = \sum \frac{(F \text{ observada} - F \text{ esperada})^2}{F \text{ esperada}}$$

3.3.3.3 Medidas de variabilidad genética

Las medidas de variabilidad genética que se van a utilizar para analizar los locus en estudio son número efectivo de alelos (A_e), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e), contenido de información polimórfica (PIC siglas en inglés).

El número efectivo de alelos determina el número esperado de alelos en el locus y se toma como la inversa de la homocigosidad del mismo. La heterocigosis observada es el nivel de heterocigosidad encontrado en el locus donde 1 determina que todos los individuos son heterocigotos y 0 que todos los individuos son homocigotos. La heterocigosidad esperada es la probabilidad de que un individuo de la población sea heterocigoto para ese locus. El contenido de información polimórfica es una medida que se usa para conocer el poder de discriminación del marcador dentro de la población. Con estas estimaciones se puede tener una idea clara del estado genético de la población.

3.3.3.4 Poder de inclusión y discriminación

El poder de inclusión y discriminación de la prueba son dos probabilidades relacionadas que indican la capacidad de los locus usados para discriminar individuos. El poder de inclusión (P_i) nos da la probabilidad de que dos individuos escogidos al azar dentro de una población compartan el mismo genotipo, un valor de P_i menor indica una mejor herramienta para analizar genotipos de poblaciones debido a que discrimina de mejor manera entre un individuo y otro. El poder de discriminación (P_d) es la probabilidad de que dos individuos posean diferente genotipo en la prueba usada.

El valor de P_i se define como la suma de las frecuencias esperadas elevadas al cuadrado, es decir:

$$P_i = pA^2 + qB^2 + rC^2 + sD^2 + uE^2$$

Mientras que P_d se define como la diferencia de uno menos P_i , podemos decir que:

$$P_d = 1 - P_i$$

3.3.3.5 Matriz de alelos compartidos

Es una matriz donde se comparan todos los individuos con el objetivo de determinar cuantos alelos comparten y expresar esta información por medio de un número, donde 0 significa que no comparten ningún alelo y 1 significa que comparten todos los alelos.

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN extraído de las muestras de sangre fue de buena calidad y concentración debido a la naturaleza de los eritrocitos en las aves que a diferencia de los mamíferos poseen núcleo, y por tanto material genético.

Se realizaron varias extracciones por cada muestra de sangre, para tener varias alícuotas en caso de contaminación y como reserva para cuando se agote la alícuota que este en uso.

4.1.1 Cuantificación de ADN

La calidad y concentración de material genético extraído y utilizado, permitió trabajar con diluciones que incrementaron el volumen de las alícuotas dando mucho material sobre el cual trabajar. Se tomó una alícuota al azar por cada individuo la cual fue cuantificada y diluida posteriormente, en algunos casos fue necesario tomar material de otra alícuota debido a problemas con la concentración o deterioro del ADN. La concentración de las alícuotas usadas fue la siguiente:

Tabla 4.1. Concentración de ADN en alícuotas usadas para amplificación de microsatélites.

Nro.	Cod. UDLA	Concentración µg/ml
1	ZGM	8,07
2	ZGH	28,1
3	HZH-0	4,85
4	HZM-1	52,16
5	HZM-2	3,72
6	HZH-2	3,02
7	CIM-1	200
8	CIH-2	11,3
9	CPO-1	11
10	CPO-2	4,81
11	CPO-3	5,2
12	CPO-4	4,37
13	Z2H-3	21,5
14	Z2M-3	53,8
15	Z2M-4	19,4
16	Z2M-5	99,4
17	CB-1	8,38
18	CB-2	66,1
19	CB-3	75,3

Elaborado por: El Autor

4.2 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

Después de haber probado varios microsatélites para amplificar regiones en ADN de cóndor andino (*Vultur gryphus*), se pudo estandarizar con éxito seis microsatélites que amplificaron satisfactoriamente y cuyo protocolo demostró alta repetibilidad y ausencia de amplificaciones inespecíficas. A partir de

estos seis microsátélites que fueron analizados mediante el protocolo de análisis de fragmento se realizó la comparación de los alelos de los individuos para identificar que parentesco tienen entre cada uno y el nivel de variabilidad que existe en la población, para a partir de esos resultados recomendar acciones adecuadas para mantener la mayor diversidad posible en la población.

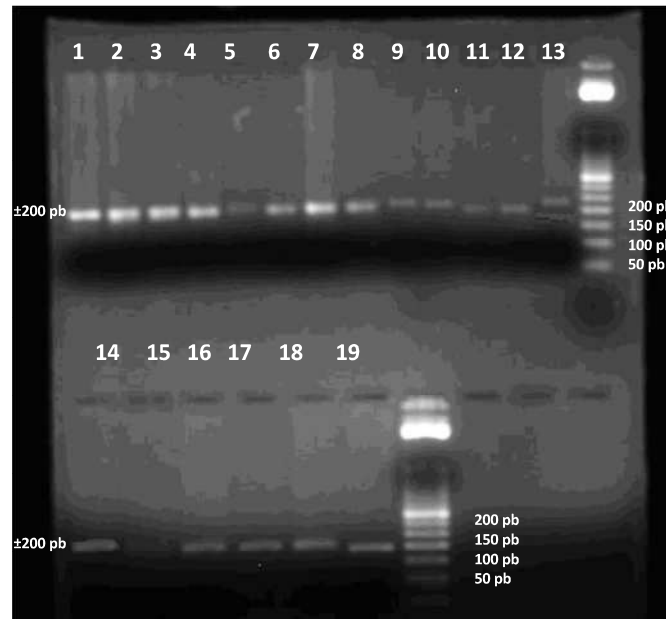
4.2.1 PCR para Microsátélites

Los fragmentos amplificados por PCR comprendían pesos entre 90 y 220 pb de peso, los microsátélites fueron nombrados según su locus en el cóndor californiano, se desconoce si comprende el mismo locus en el cóndor andino, a pesar de tener un cariotipo similar (Raudsepp et al. 2002) (Williams y Benirschke 1976) no se puede asegurar que los locus sean exactamente iguales en las dos especies.

4.2.1.1 C5

Es un microsátelite trinucleótido, cuyo motivo repetitivo es ATG; el tamaño aproximado en el cóndor californiano es de 179 a 191 pb. La temperatura de annealing usada fue de 58° C aunque amplifica en rangos de temperatura desde 57 a 60° C. Se consiguió una banda clara de alrededor de 200 pb. El ensayo fue muy sensible a la concentración de ADN.

Figura 4.1. Ejemplo de amplificado en el locus C5

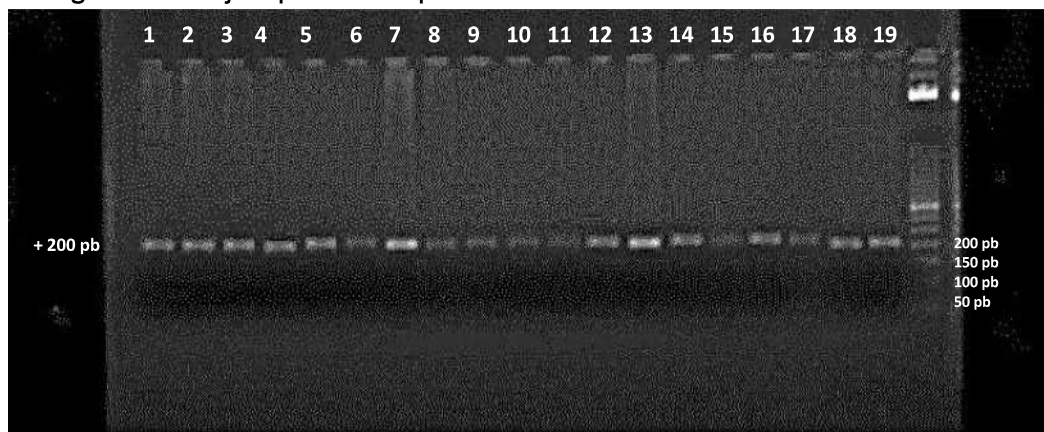


Elaborada por: El Autor

4.2.1.2 A20

El microsatélite del locus A20 posee un motivo repetitivo dinucleótido y su repetición es CA. El tamaño en el cóndor californiano es desde 206 hasta 208 pb, el amplificado en el cóndor andino tenía un tamaño un poco superior a 200 pb. Para amplificar se uso una temperatura de 58° C de annealing, sin embargo amplifica aunque con menor éxito desde 57 hasta 60° C.

Figura 4.2. Ejemplo de amplificación con el microsatélite del locus A20

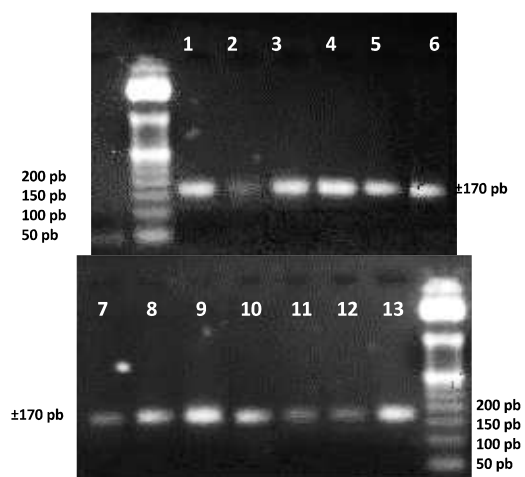


Elaborado por: El autor

4.2.1.3 B7

En el marcador molecular del locus B7 se encontró un motivo de repetición trinucleótido, sin embargo los autores no especifican cual es la secuencia de dicho motivo. La temperatura de annealing fue de 60° C aunque amplifico también en temperaturas menores hasta 58° C. El tamaño del fragmento fue de alrededor de 170 pb para el cóndor andino.

Figura 4.3. Ejemplo de Amplificación locus B7



Elaborada por: El Autor

4.2.1.4 H3

El microsátelite H3 es un tetranucleótido, su tamaño en la literatura es de 119-127 pb en el cóndor californiano, en el gel de agarosa se aprecia tamaños de alrededor de 100 pb. La temperatura óptima de annealing fue de 63° C, sin embargo se pudo obtener amplificación desde 56° C hasta 65° C. Para amplificación en PCR Multiplex se amplifico con 60° C.

Figura 4.4. Ejemplo de amplificación de H3



Elaborada por: El Autor

4.2.1.5 H115

El motivo repetitivo de este microsátelite es un tetranucleótido y la secuencia de la repetición es CATC. El tamaño estimado en el cóndor californiano es de 196 pb, en el cóndor andino también es consistente un tamaño alrededor de los 200 pb. La temperatura de annealing fue de 60° C aunque amplifica sin ningún problema en temperaturas alrededor de esta temperatura.

Figura 4.5. Ejemplo de amplificación del microsatélite H115

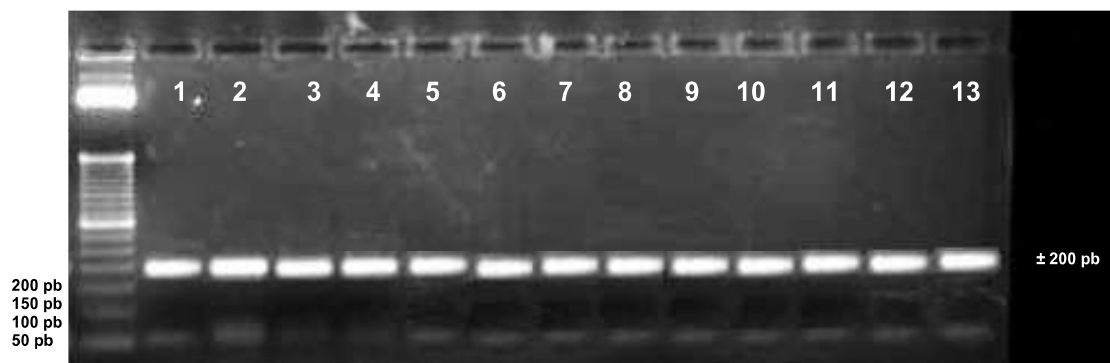


Elaborada por: El Autor

4.2.1.6 H269

El motivo repetido del microsatélite H269 es un tetranucleótido, la secuencia de la repetición es CATC. El tamaño establecido para el microsatélite es de 215 a 223 pb en cóndor californiano, y en el cóndor andino el peso estimado inicialmente fue de alrededor de 200 pb. Al igual que los anteriores microsatélites se estimó la temperatura óptima para el annealing en 60° C y también conseguía amplificar a temperaturas cercanas a este rango.

Figura 4.6. Ejemplo de Amplificación del Microsátelite H269



Elaborada por: El Autor

4.2.2 Análisis de fragmentos

El protocolo del análisis de fragmentos permitió visualizar definitivamente los alelos correspondientes a cada microsátelite, y contar con los resultados definitivos para realizar las estimaciones necesarias sobre la población. Se encontró varias diferencias de tamaño entre los alelos del cóndor californiano y del cóndor andino, y también varias diferencias en cuanto al número de alelos.

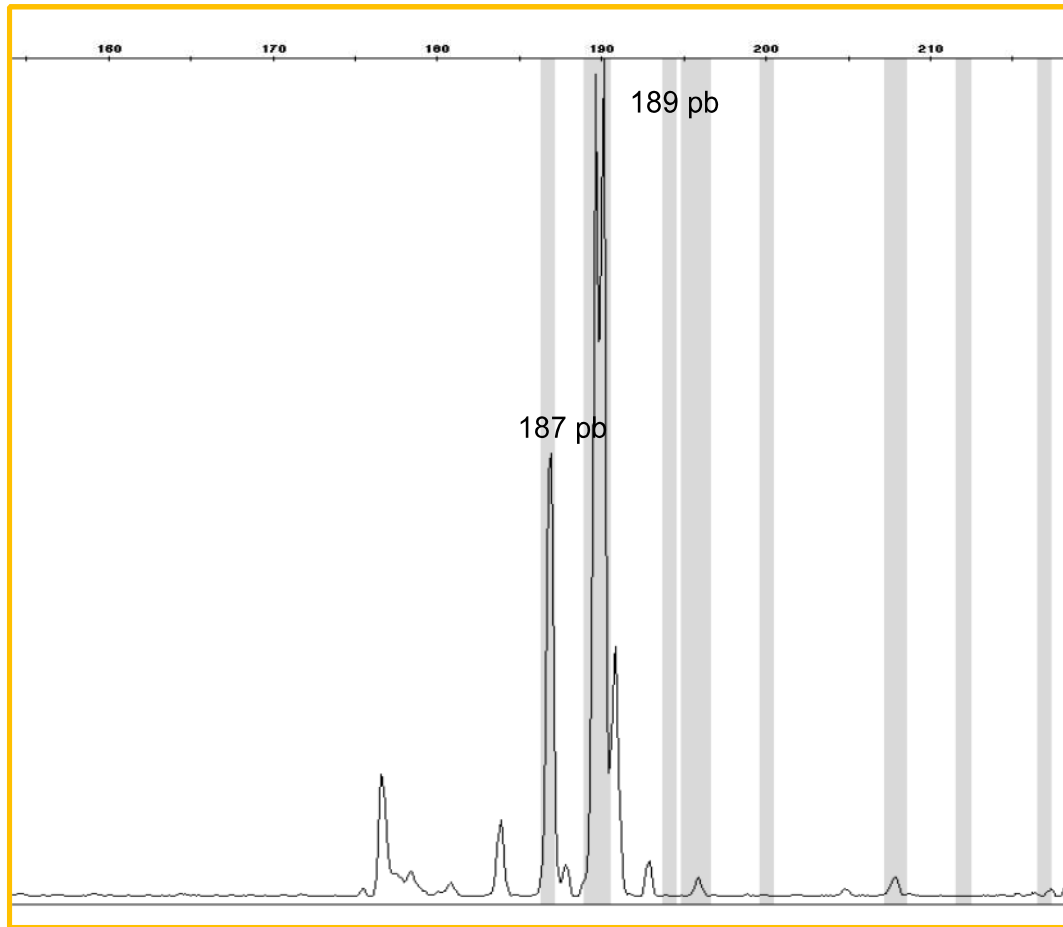
El diseño de primers marcados con fluorocromos fue realizada basándose en las diferencias halladas en cóndor californiano debido a la dificultad de identificar previamente en el gel de agarosa diferencias entre los pesos de los seis microsátélites, por esta razón el grupo de microsátélites marcados con el fluorocromo NED de color amarillo, C5 y H269, en realidad poseen tamaños similares en el análisis de fragmento en el equipo y no hubo la diferencia de veinte pares de bases sugerida por la información original.

4.2.2.1 C5

Este microsátelite trinucleótido fue marcado con el fluorocromo NED, de color amarillo. El tamaño del marcador en el cóndor andino fue de 187 a 217 pb a mientras que en el cóndor californiano fue menor, en los rangos de 179 a 191 pb. Otra diferencia importante encontrada es el número de alelos, en el cóndor californiano existen tres alelos, mientras que en el cóndor andino se encontraron cinco diferentes distribuidos en la población estudiada.

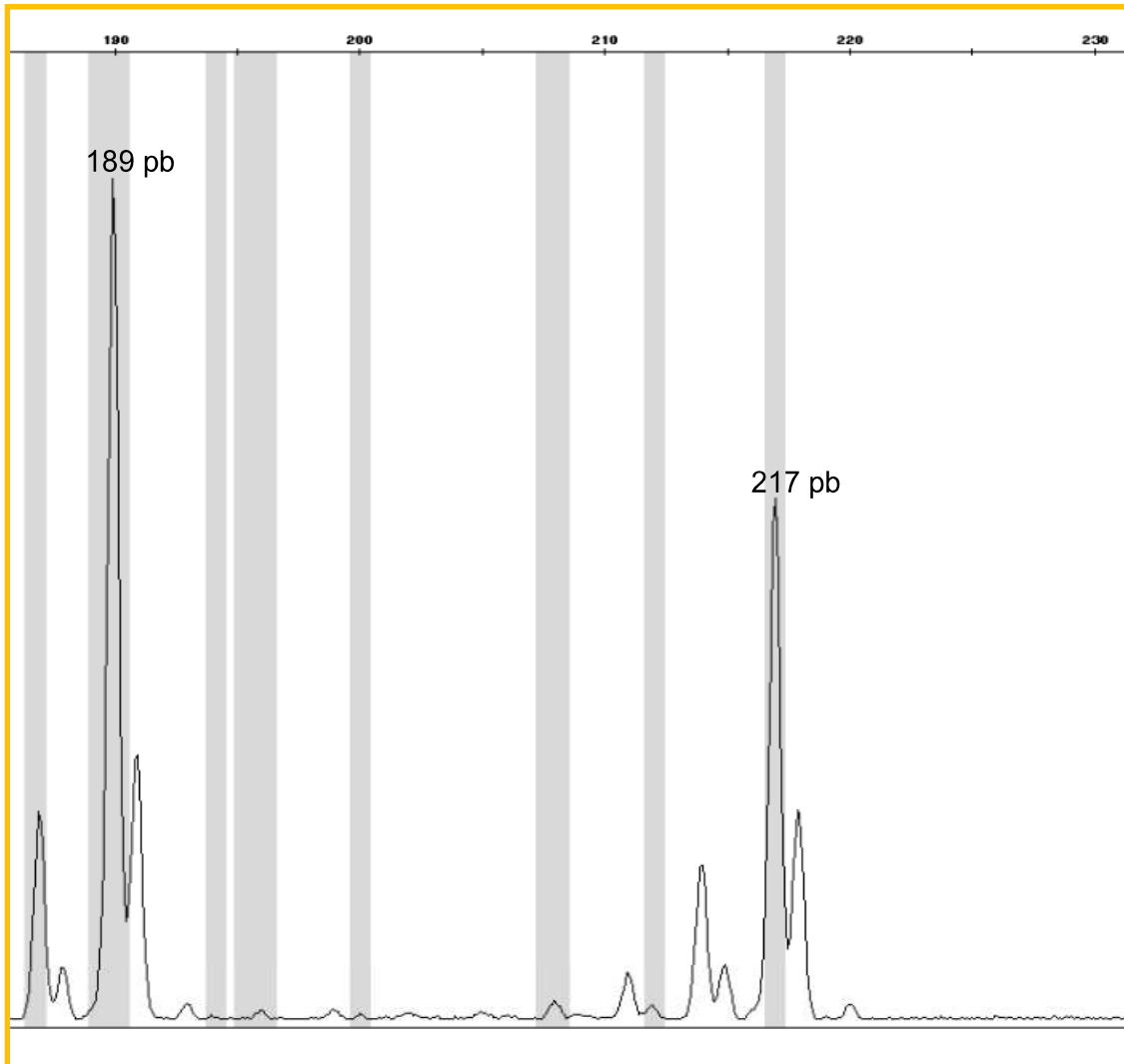
En cuanto a los alelos, el más pesado tuvo 217 pb de tamaño y fue encontrado en un solo individuo en heterocigosis, el segundo alelo bastante frecuente fue el de 208 pb, y está presente en diez aves, en tres de los cuales se presenta en homocigosis, mientras que los restantes siete son heterocigotos para el locus en cuestión. El siguiente alelo tiene 195 pb de tamaño y fue encontrado en siete individuos todos heterocigotos. El alelo más frecuente fue el de 189 pb que se halló en catorce individuos uno de los cuales fue homocigoto. Finalmente el de menor tamaño tiene 187 pb y se halló en dos individuos heterocigotos en este locus.

Figura 4.7. Alelos 187 y 189 pb encontrados en C5



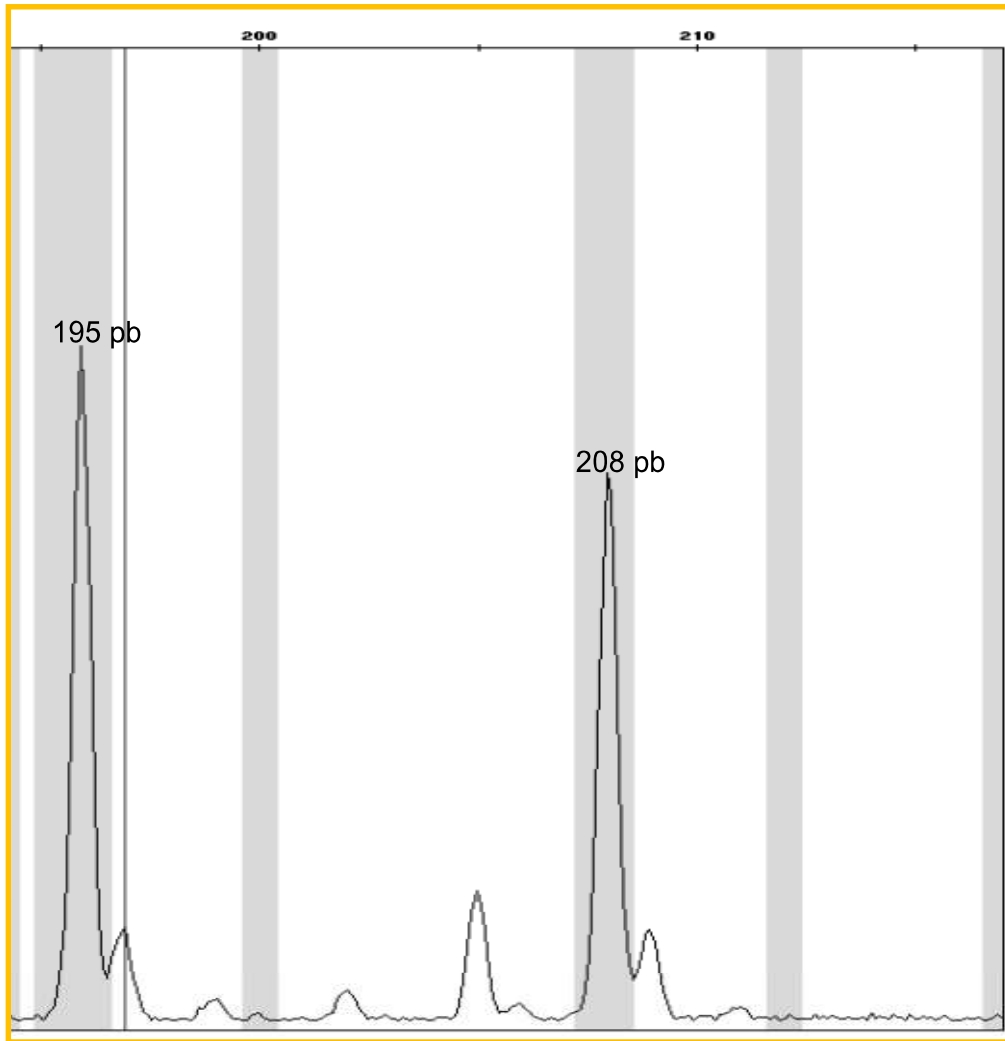
Elaborado por: El Autor, en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.8. Alelo 217 pb de C5



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.9. Alelos 195 y 208 pb de C5



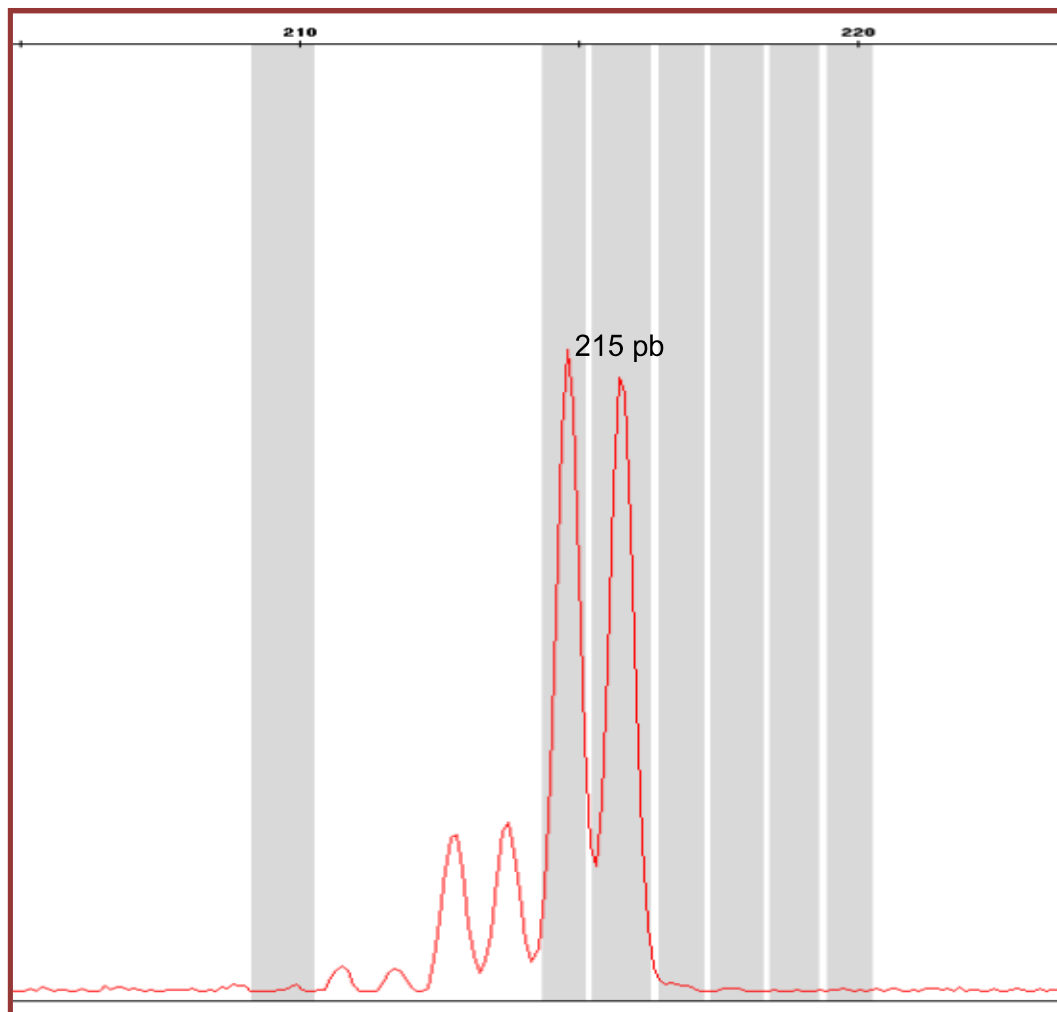
Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

4.2.2.2 A20

En este microsátelite se encontró que el tamaño en cóndor andino es superior al del cóndor californiano, en el primero se encontró tamaños de 209 a 220 pb en tanto en el segundo eran de 206 a 208 pb. En cuanto a los alelos en el cóndor californiano se registran dos alelos diferentes, mientras que en el cóndor andino se hallaron 5 diferentes alelos.

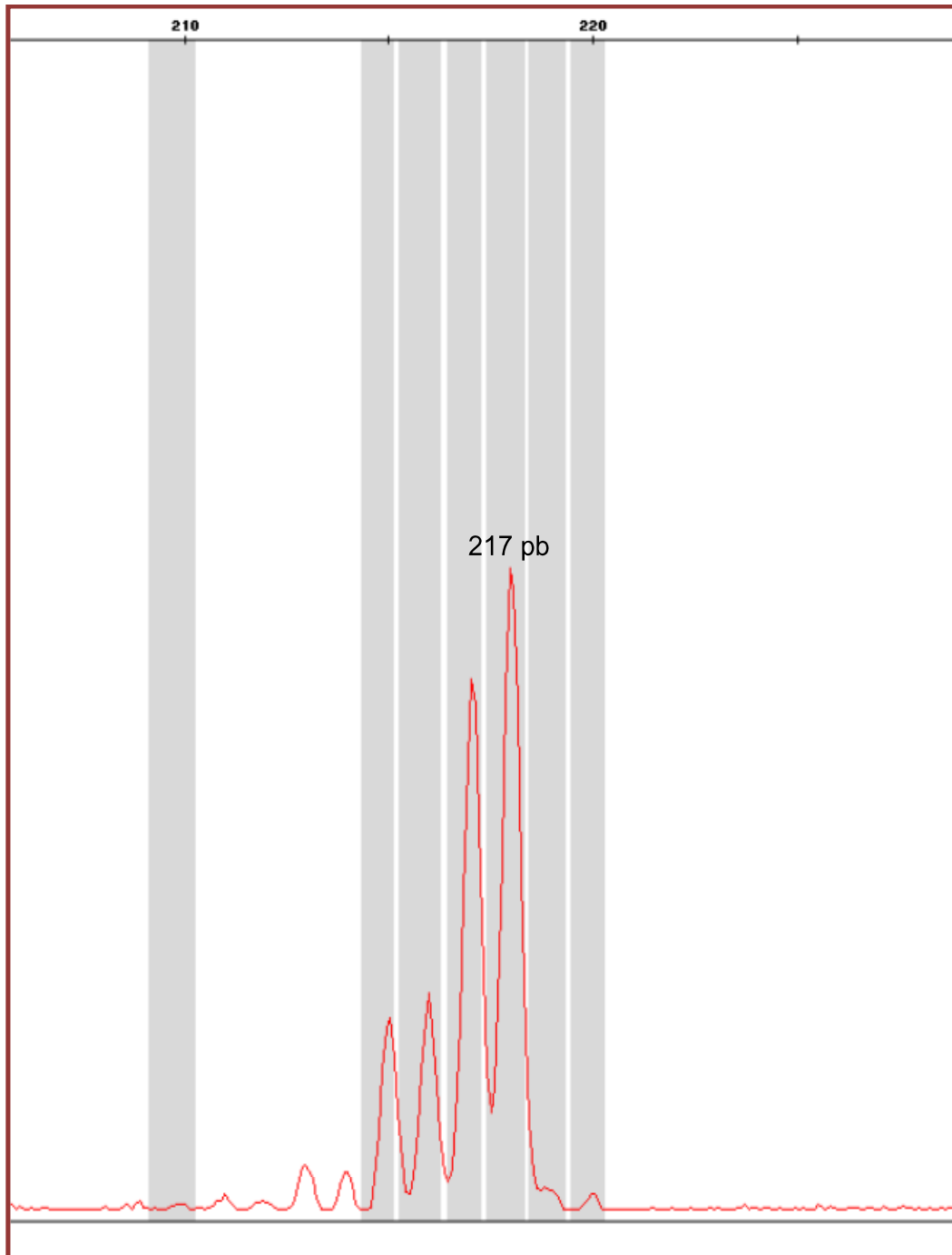
Tan solo tres individuos fueron homocigotos, el resto fueron heterocigotos, y los alelos hallados estuvieron distribuidos de la siguiente forma: en doce individuos se halló el alelo con un tamaño de 220 pb el más pesado para este microsátelite, uno de los individuos fue homocigoto para este alelo. El siguiente alelo encontrado fue de 217 pb y se halló en quince individuos, donde uno de los cuales fue homocigoto. Otro de los alelos fue de 215 pb y fue encontrado en tres especímenes y uno de estos homocigoto.; El alelo con un tamaño de 212 pb se halló en dos individuos, ambos como heterocigotos; el último fue de 209 pb hallado en dos individuos siendo estos heterocigotos para este alelo.

Figura 4.10. Alelo 215 pb en A20



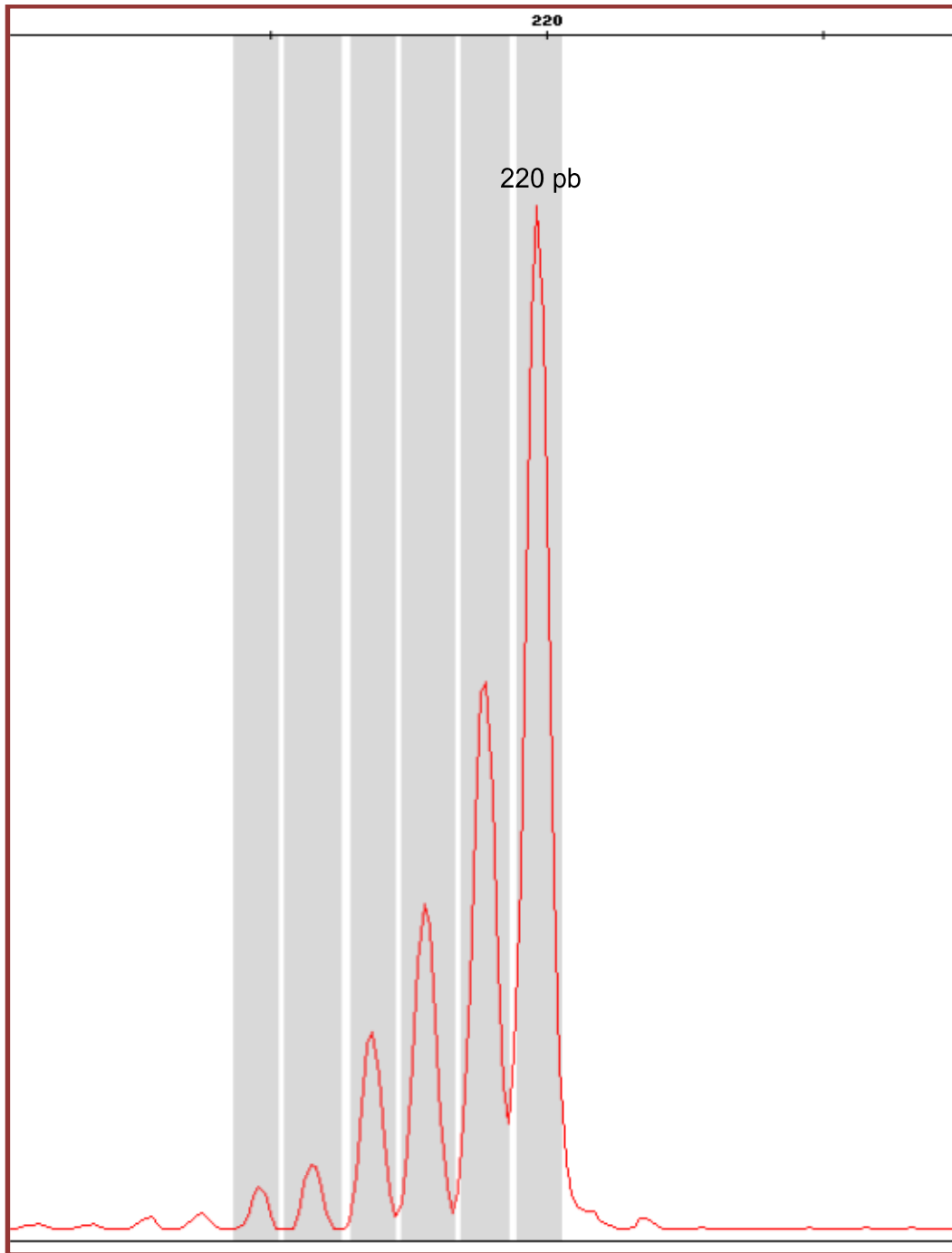
Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.11. Alelo 217 pb en A20



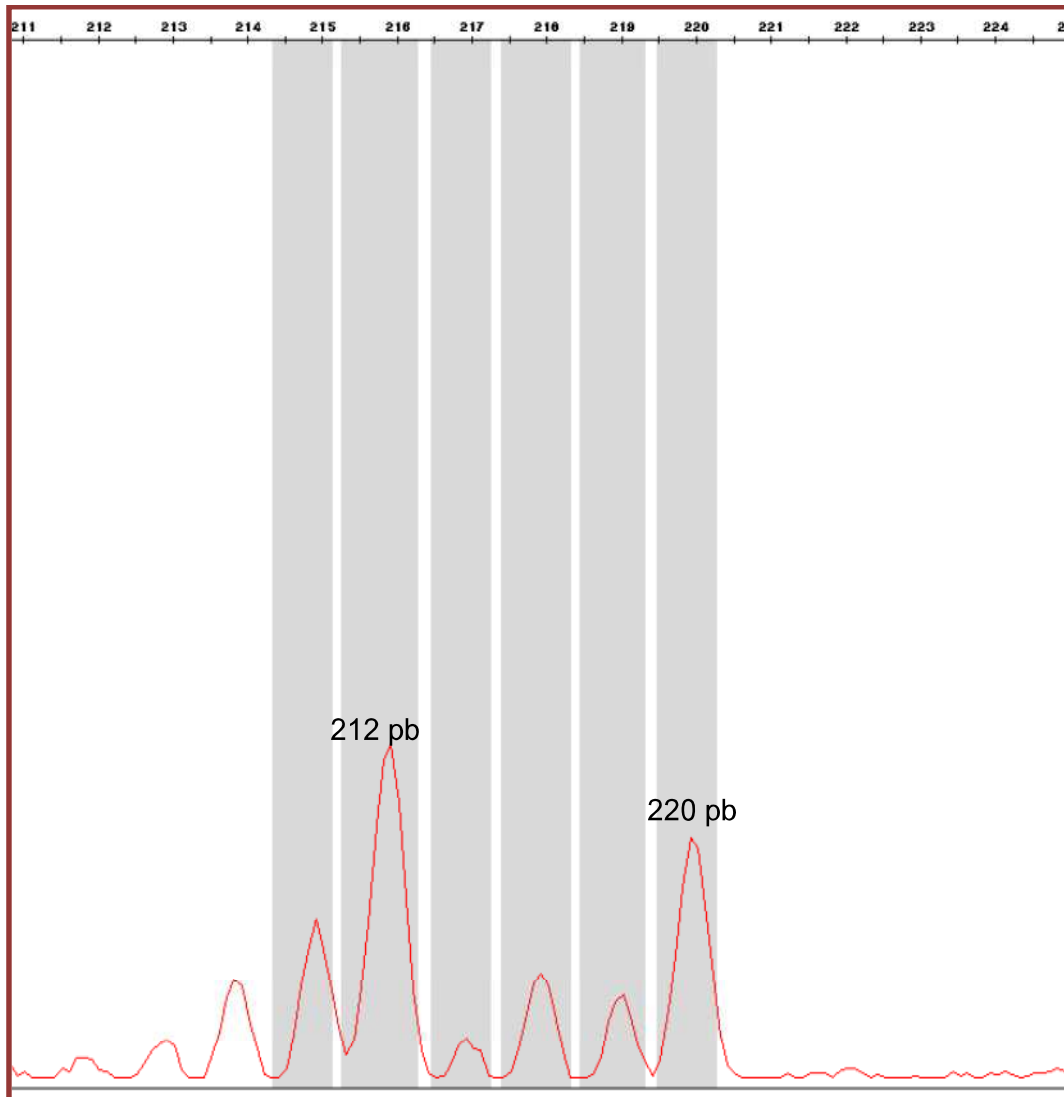
Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.12. Alelo 220 pb en A20



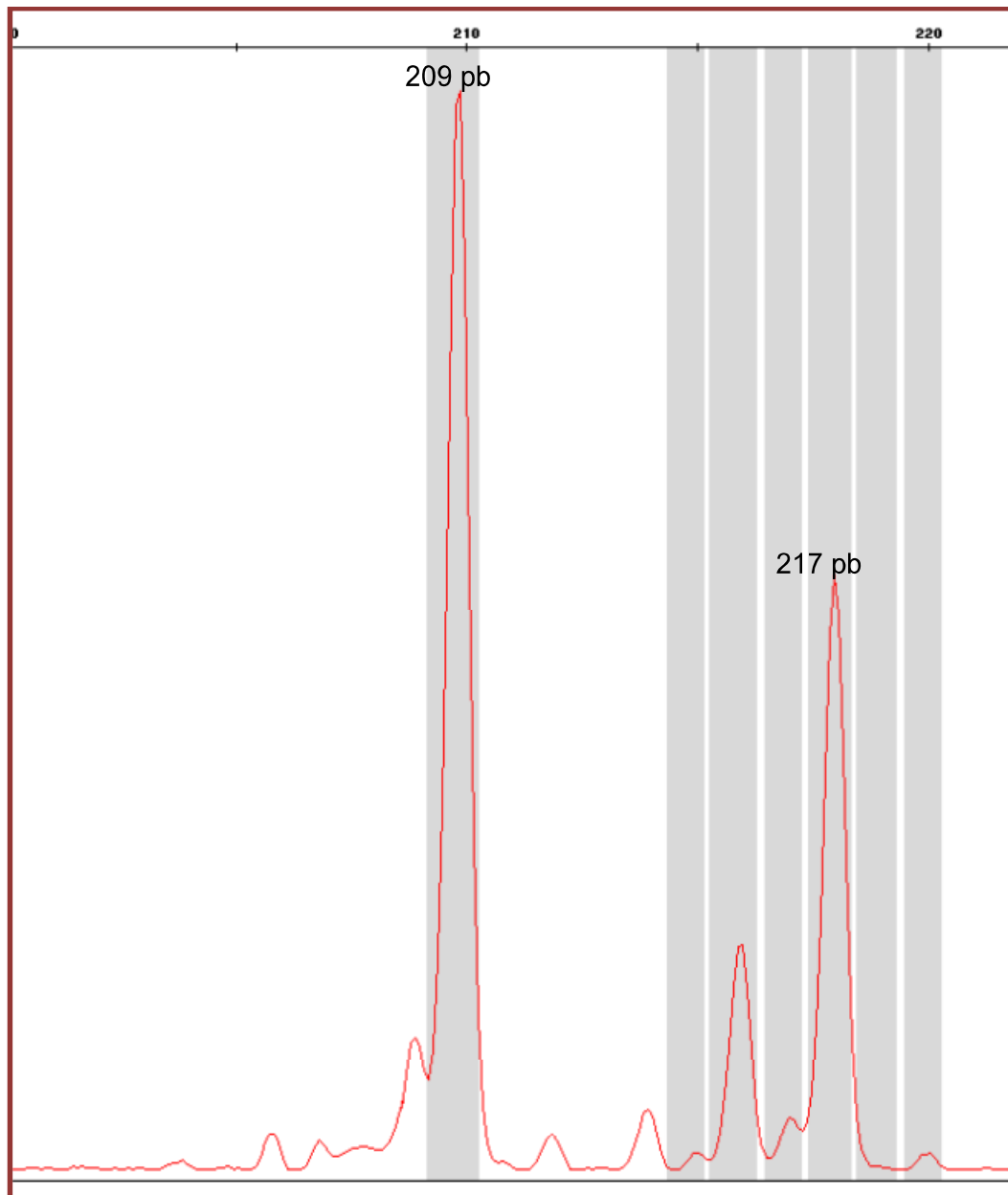
Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.13. Alelo 212 pb en A20



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.14. Alelo 209 en A20



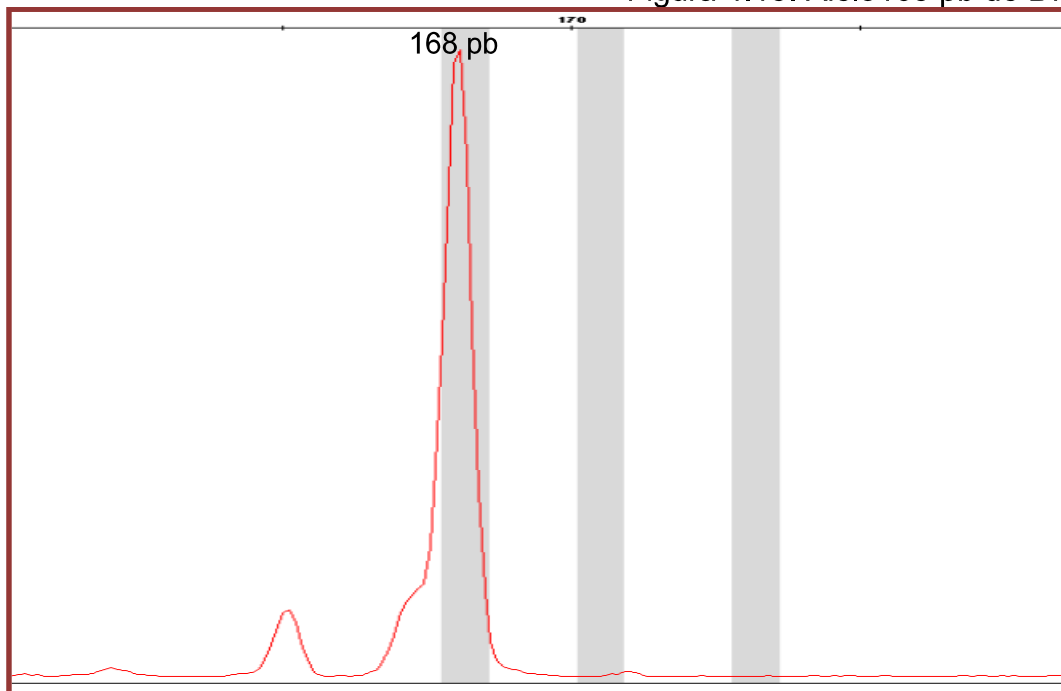
Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

4.2.2.3 B7

En cuanto al tamaño de este microsátelite se encontró que es apenas un poco mayor que en el cóndor californiano en el cual el tamaño es de alrededor de 165 pb, mientras que en el cóndor andino se halló rangos de 168 a 173 pb. En cuanto a los alelos encontrados también se halló más que en la especie original, en esta existen dos alelos y en el cóndor andino tres.

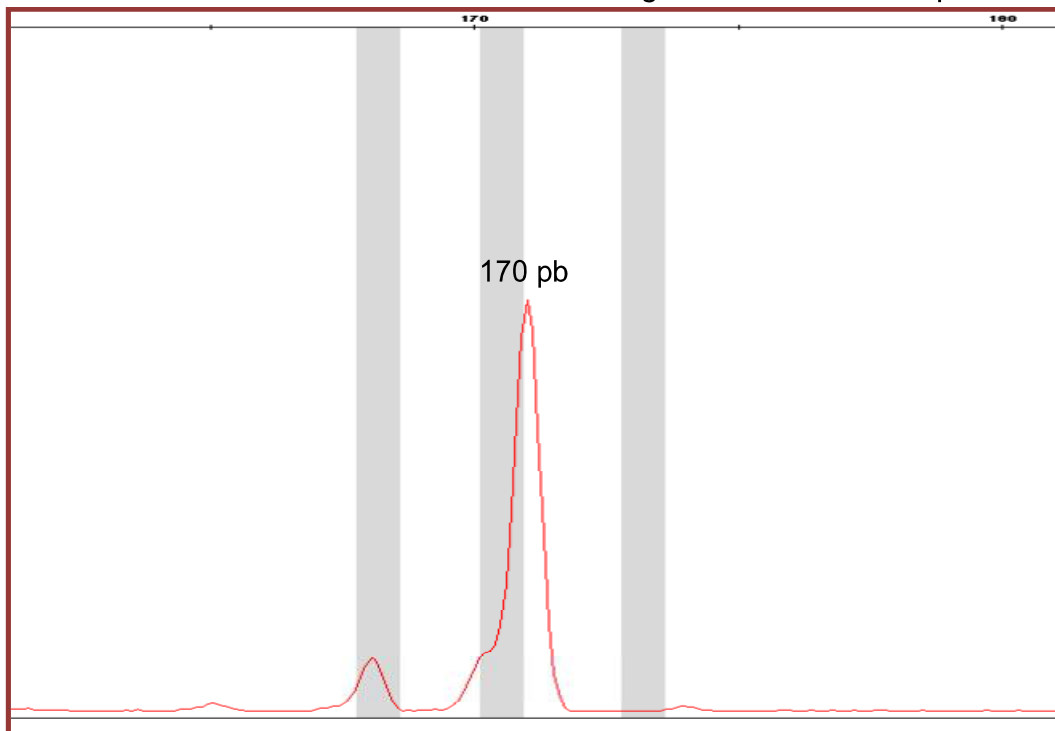
Este marcador molecular es menos polimórfico que los anteriores, tiene menos alelos y muchos individuos son homocigotos. Los alelos encontrados fueron los siguientes: el de mayor tamaño fue el de 173 pb, y también fue el alelo más común aparece en quince individuos en los cuales se encuentra en homocigosis en seis, los restantes nueve individuos son heterocigotos en este locus. El segundo alelo es el de 170 pb de tamaño que se encuentra en cinco especímenes, donde tan solo uno de ellos lo presenta en homocigosis, que el resto son heterocigotos. El último alelo tiene 168 pb; está presente en nueve individuos, donde dos son homocigotos para este alelo, los restantes siete son heterocigotos.

Figura 4.15. Alelo 168 pb de B7



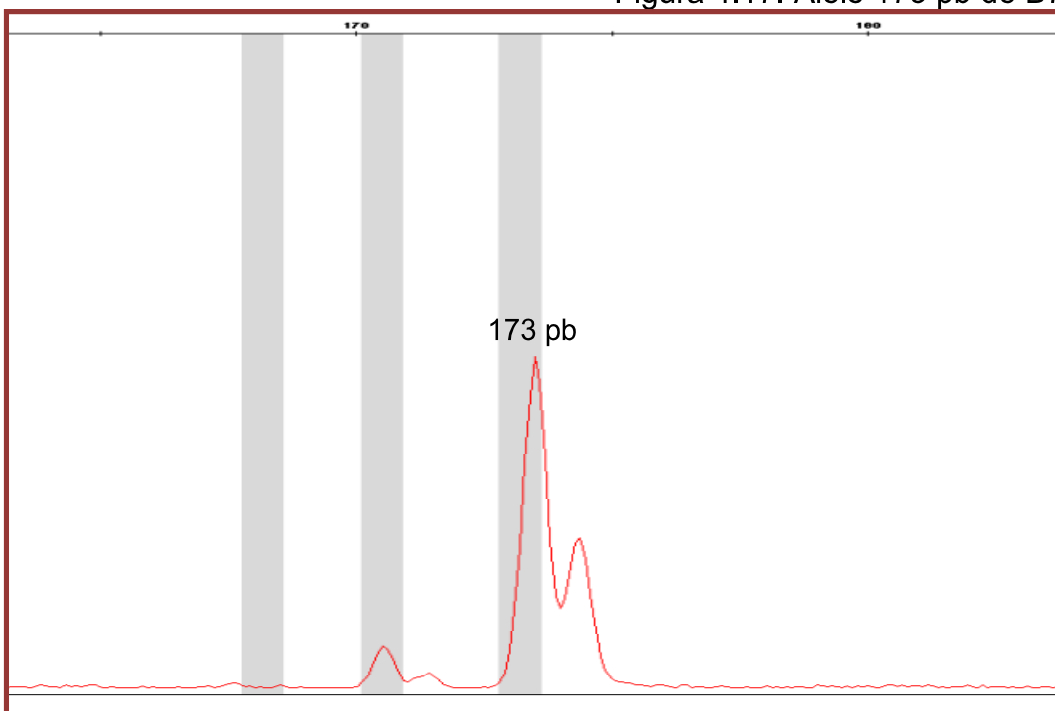
Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0

Figura 4.16. Alelo 170 pb de B7



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0

Figura 4.17. Alelo 173 pb de B7

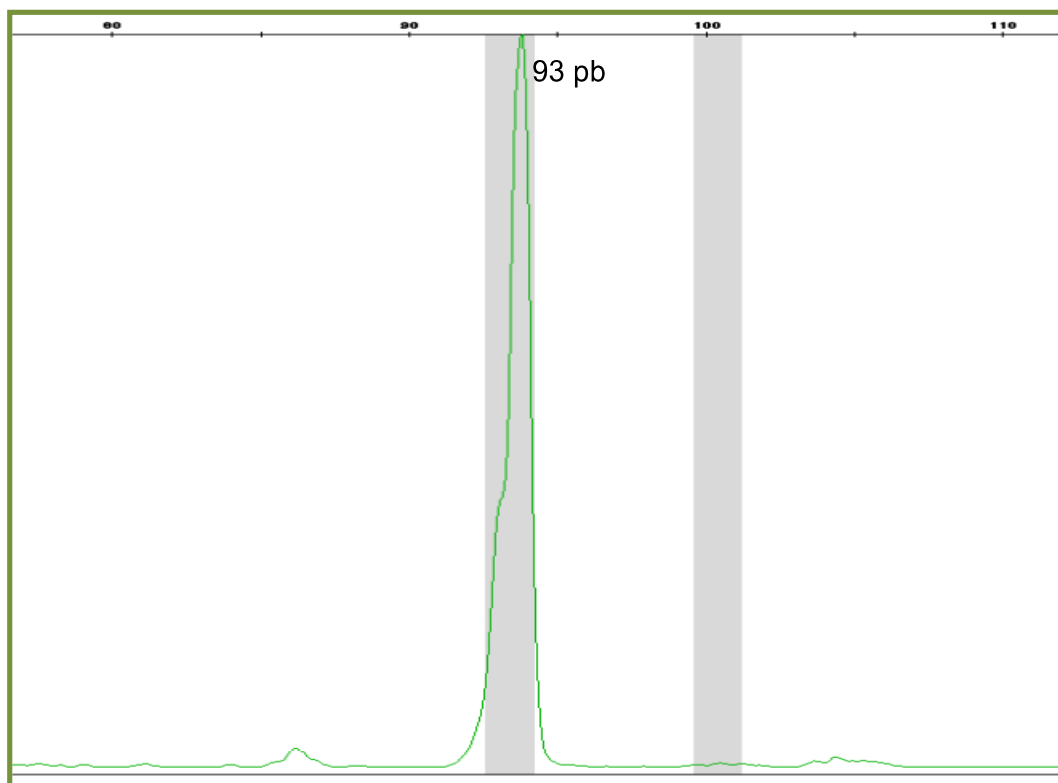


Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0

4.2.2.4 H3

El microsátelite de este locus, mostró desde los geles de agarosa que era el más corto de tamaño, tan solo tiene 93 pb bastante menor comparado con el tamaño en cóndor californiano que fue de 119 a 127 pb, además fue el único alelo para este locus en todos los individuos mientras que en la especie original existían dos alelos distintos. Este hecho hace que este microsátelite no sea útil para identificación individual

Figura 4.18. Alelo de 93 pb encontrado en H3



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0

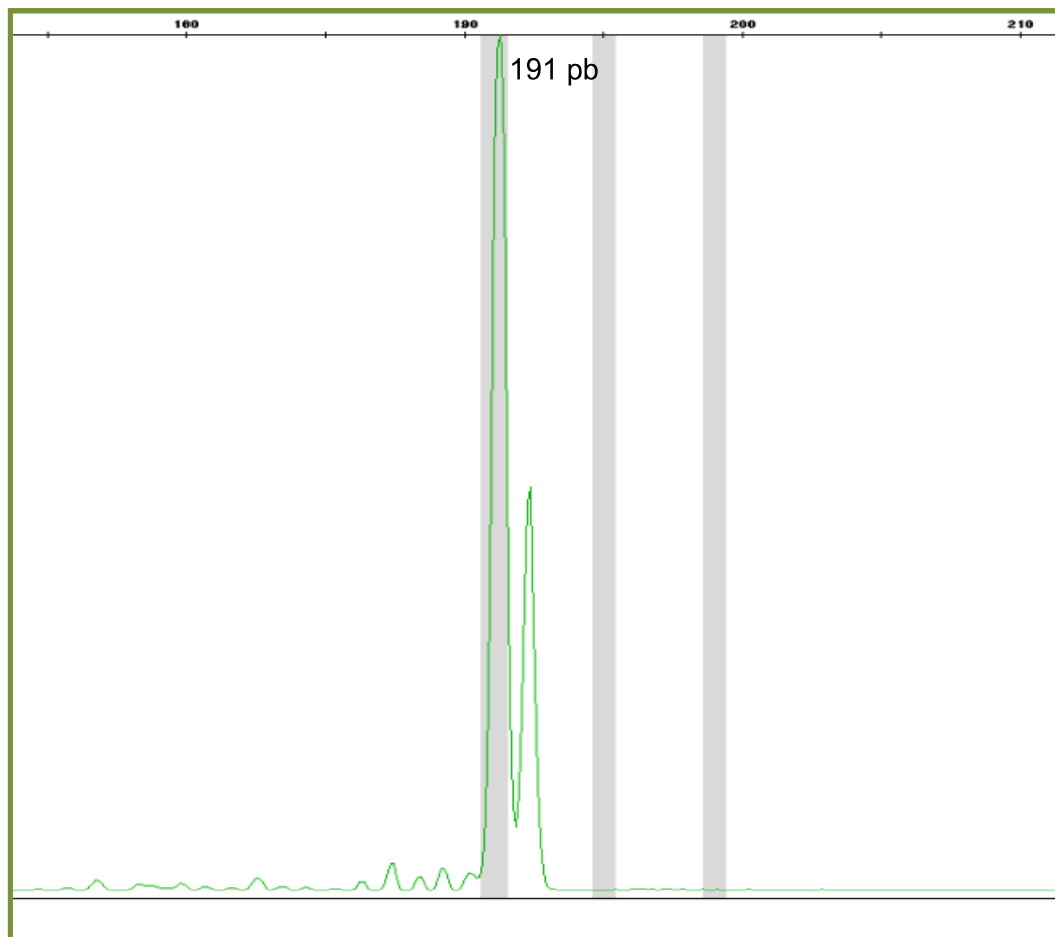
4.2.2.5 H115

En este caso el número de alelos en cóndor andino fue igual al número de alelos en cóndor californiano. El tamaño indicado en la especie californiana

fue de 196 pb, en cambio en el cóndor andino su rango de tamaño fue entre 191 y 199 pb.

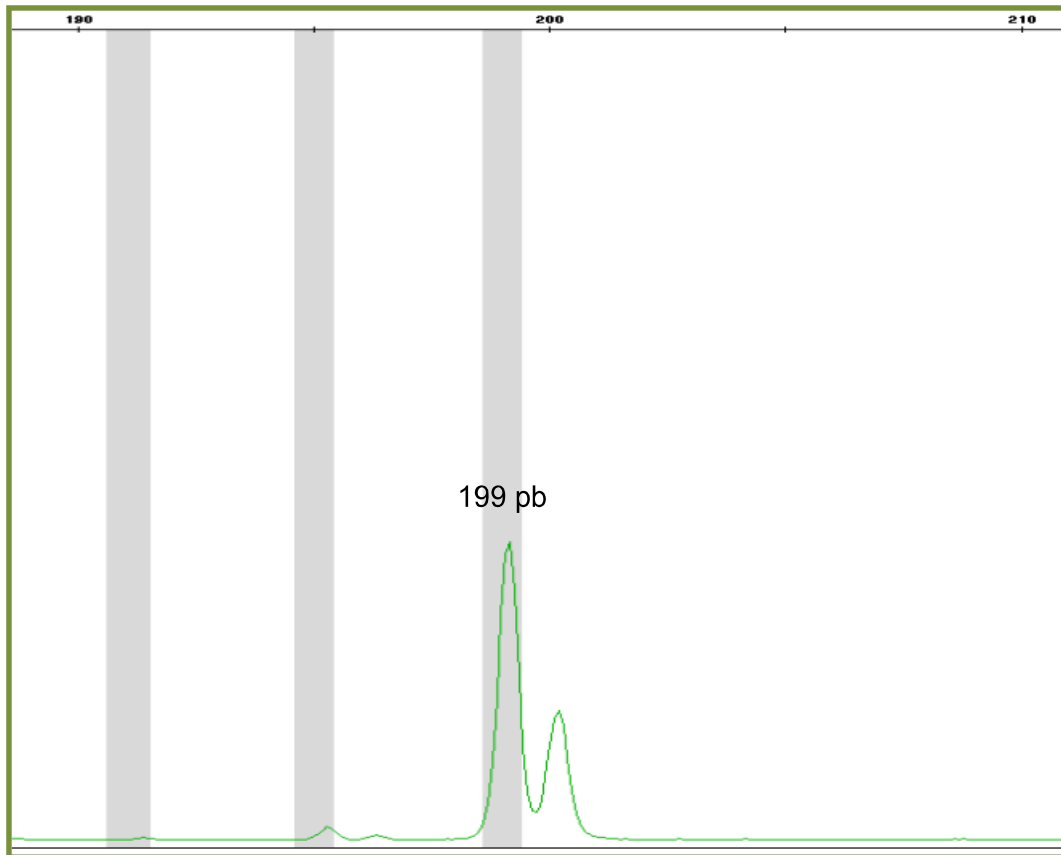
Los dos alelos existentes mostraron gran diferencia en cuanto a su distribución en los individuos analizados. El primero y el más común de 191 pb se encontró en dieciocho de los diecinueve animales estudiados, entre los cuales dieciséis fueron homocigotos en este locus. El otro hallado en tan solo tres individuos tuvo un peso de 199 pb y solo uno de los individuos era homocigoto. Dos especímenes de los diecinueve fueron heterocigotos y poseen los dos alelos.

Figura 4.19. Alelo de 191 pb en H115



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0

Figura 4.20. Alelo de 199 pb en H115

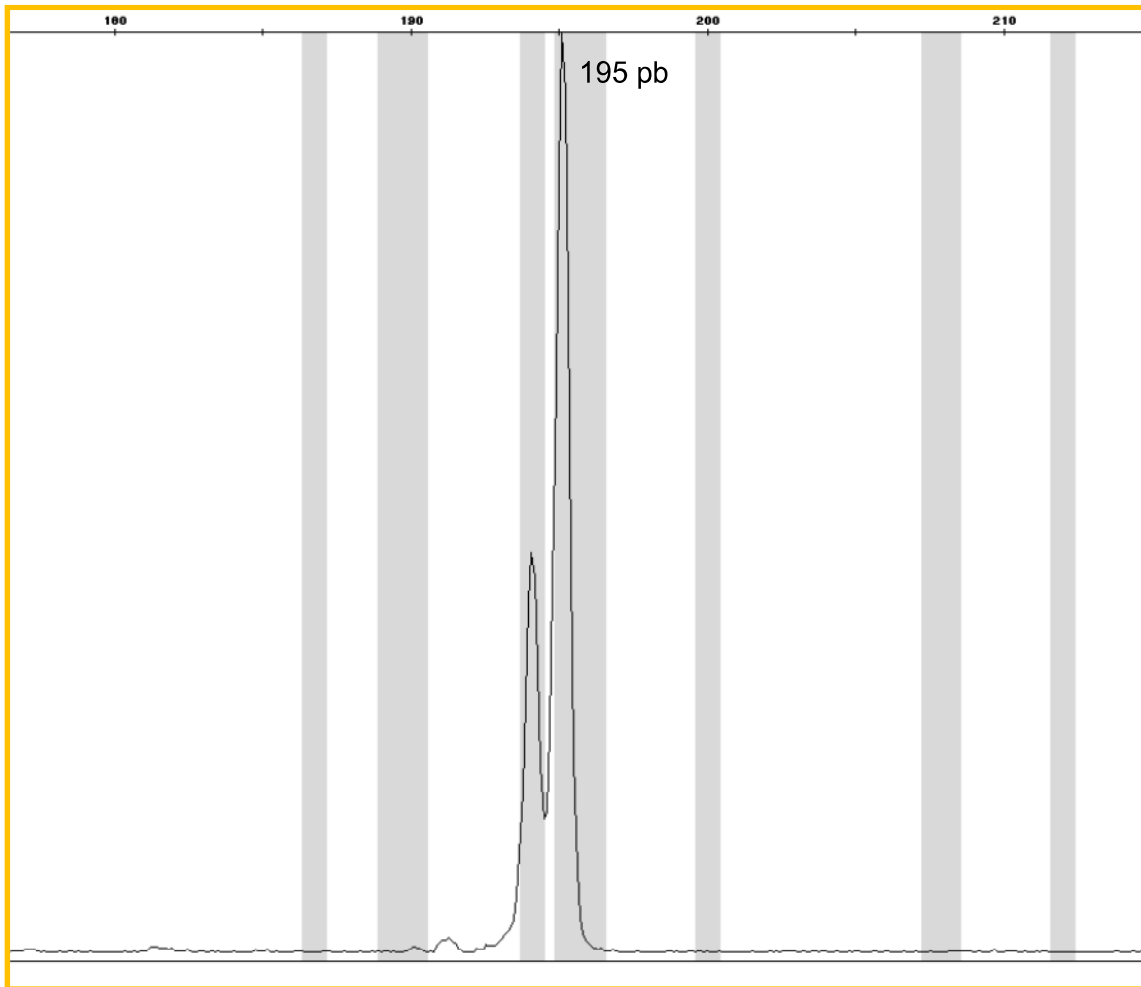


Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0

4.2.2.6 H269

Este microsatélite tiene un peso de 195 pb siendo menor que en el cóndor californiano cuyo tamaño es de 215 a 223 pb. En este microsatélite el tamaño en pares de bases mencionado anteriormente constituye el único alelo encontrado en todos los individuos, descartando su uso para caracterizar individuos.

Figura 4.21. Alelo de 195 pb encontrado en H269



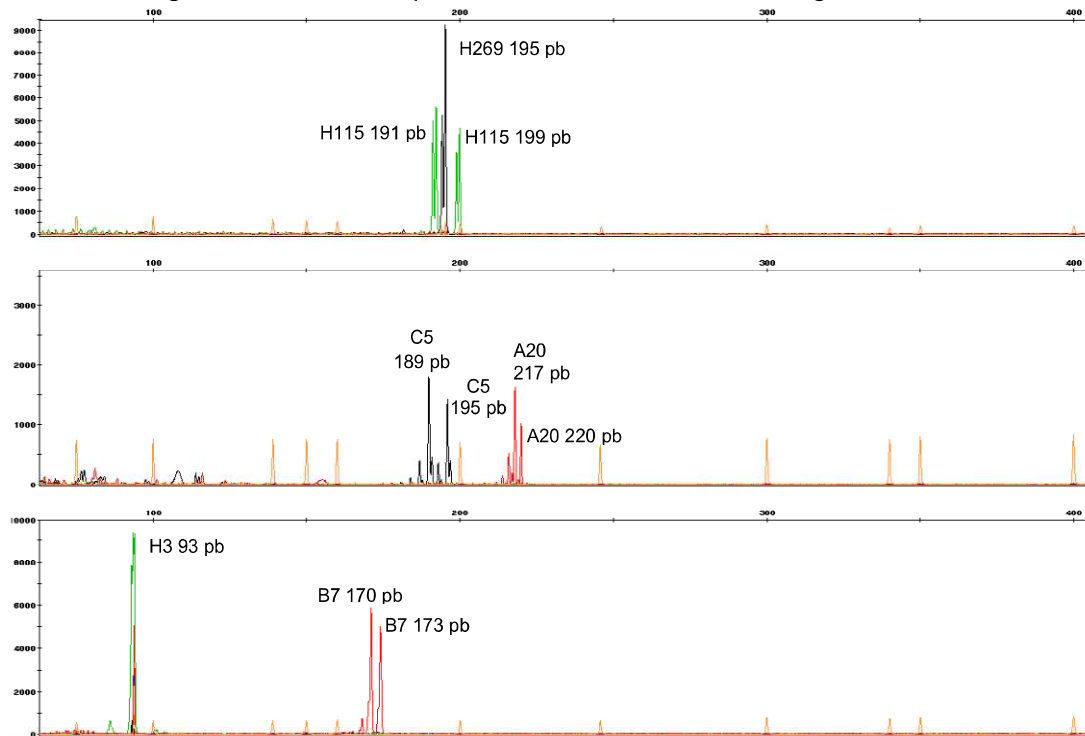
Elaborado por: Imagen generada por el Programa GeneMapper 2.0

4.2.3 Genotipos por individuo

El resultado del análisis de fragmentos arrojó que los locus elegidos sirven para comparación de individuos sin embargo el número de locus analizados es pequeño y por tanto poco descriptivo. Dos locus resultaron ser monomórficos en todos los cóndores andinos estudiados y por ésta razón no son útiles para el análisis final.

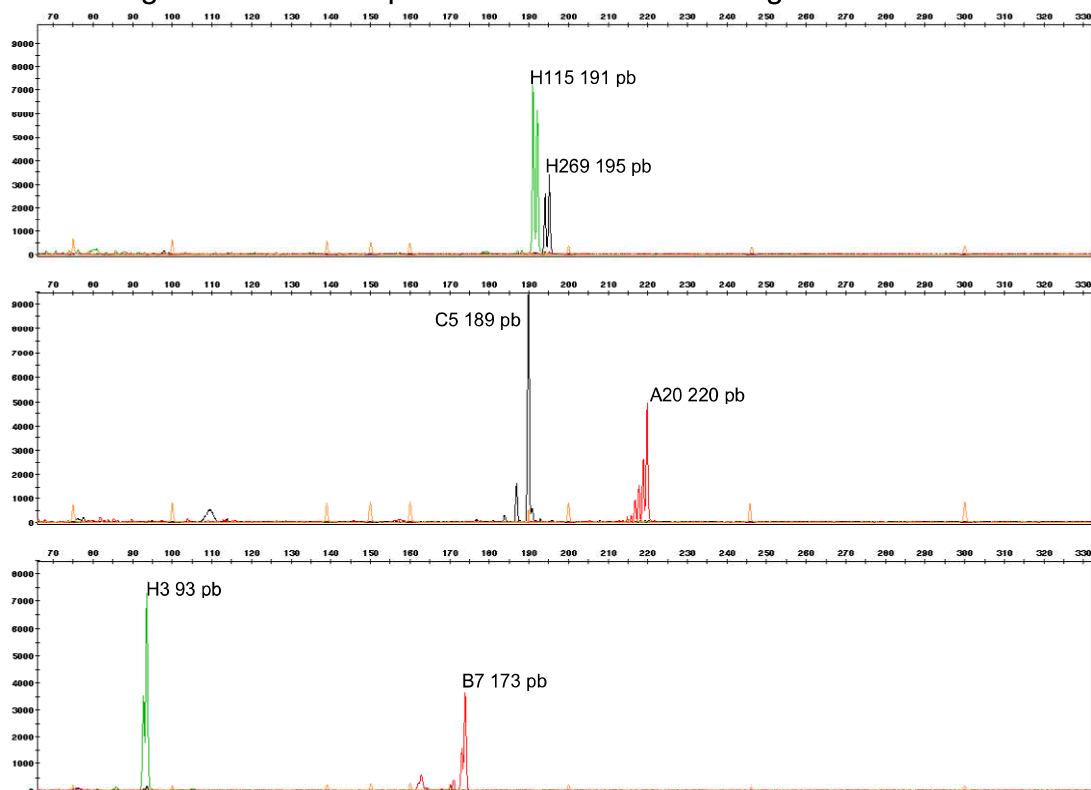
A continuación se muestra cómo se visualiza el genotipo homocigoto y un heterocigoto en cuatro locus, en el programa GeneMapper 2.0. Y una tabla con los genotipos de todos los individuos en estudios.

Figura 4.22. Genotipo del individuo 13, heterocigoto en cuatro locus



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Figura 4.23. Genotipo del individuo 17 homocigoto en todos los locus



Elaborado por: El Autor en el programa GeneMapper 2.0.

Tabla 4.2. Resultados de los alelos encontrados en la población estudiada.

Código		Microsátelites											
		C5		H269		A20		B7		H115		H3	
1	026056108	208,5	208,5	195	195	217,4	215	168	173	191	191	93	93
2	094123612	189	208,5	195	195	217,4	220	168	173	191	191	93	93
3	026780623	189	208,5	195	195	212,3	220	173	173	191	191	93	93
4	098012358	189	195	195	195	209,5	217,4	170	173	191	191	93	93
5	097874874	189	208,5	195	195	217,4	220	168	170	191	191	93	93
6	097880288	189	195	195	195	217,4	220	168	173	199	199	93	93
7	082768040	189	195	195	195	215	215,3	168	173	191	191	93	93
8	094267370	189	208,5	195	195	215	217,4	168	173	191	191	93	93
9	037788328	208,5	208,5	195	195	212,3	217,4	168	168	191	191	93	93
10	025876614	208,5	208,5	195	195	217,4	220	173	173	191	191	93	93
11	094120126	189	195	195	195	217,4	220	173	173	191	191	93	93
12	026054856	189	208,5	195	195	217,4	217,4	173	173	191	191	93	93
13	097871322	189	195	195	195	217,4	220	170	173	191	199	93	93
14	098007811	187	189	195	195	217,4	220	173	173	191	191	93	93
15	097883568	195	208,5	195	195	217,4	220	168	173	191	191	93	93
16	097885316	189	217	195	195	217,4	220	170,5	170,5	191	191	93	93
17	026811888	189	189	195	195	220	220	173	173	191	191	93	93
18	112869247a	195	208	195	195	209,5	217,4	170	173	191	199	93	93
19	026779347	187	189	195	195	217,4	220	168	168	191	191	93	93

Elaborada por: El Autor

4.2.3.1 Frecuencias alélicas y genotípicas

Los genotipos observados fueron ordenados con el objetivo de realizar el cálculo de las frecuencias. Se utilizó la fórmula que se explicó anteriormente. En el caso de los alelos, al ser tan pocos individuos se comprobó su número observándolos directamente de los resultados para obtener las frecuencias alélicas respectivas. En cuanto a los microsatélites se encontraron frecuencias muy altas para algunos genotipos heterocigotos y bajas e incluso nulas en algunos genotipos homocigotos teóricos que no existen en la población analizada. Los locos monomórficos no fueron tomados en cuenta en este análisis.

En el microsatélite C5 se encontraron como genotipos más frecuentes a 189/208 y 189/195. Un dato interesante es que la frecuencia alélica más alta fue en el alelo 189 y que el genotipo menos frecuente fue el homocigoto para este alelo, debido a que la mayoría de veces que el alelo aparece en la población es en homocigosis. Para el alelo A20 se encontró que la frecuencia genotípica más alta fue la de 217/220 hallada en más de la mitad de la población, mientras que el resto de genotipos tuvieron frecuencias bajas, y en cuanto a los alelos la frecuencia más alta fue encontrada en el alelo 217. Una diferencia importante la marcó el microsatélite B7 puesto que presentó todos los genotipos posibles a diferencia de los marcadores descritos anteriormente. Las frecuencias más altas se hallaron en los genotipos 168/173 y 173/173, y el alelo más frecuente fue el 173 hallado en alrededor de la mitad de la población. Finalmente en el locus H115 alrededor del ochenta por ciento de la población se halló en el genotipo homocigoto 191/191, de la misma forma el alelo correspondiente a este genotipo también fue el más frecuente.

Tabla 4.3. Frecuencias alélicas y fenotípicas por microsatélite

C5						
Genotipo	Nro. Individuos	Porcentaje	Nro. de alelos	F. Genotípicas	Alelo	F. Alélica
208/208	3	15,79	6	0,16	217	0,03
189/208	5	26,32	10	0,26	208,5	0,34
189/195	5	26,32	10	0,26	195	0,18
187/189	2	10,53	4	0,11	189	0,39
195/208	2	10,53	4	0,11	187	0,05
189/217	1	5,26	2	0,05		1,00
189/189	1	5,26	2	0,05		
	19			1,00		

A20						
Genotipo	Nro. Individuos	Porcentaje	Nro. de alelos	F. Genotípicas	Alelo	F. Alélica
209/217	2	10,53	4	0,11	220	0,34
212/220	1	5,26	2	0,05	217,4	0,45
212/217	1	5,26	2	0,05	215	0,11
215/215	1	5,26	2	0,05	212,3	0,05
215/217	2	10,53	4	0,11	209,5	0,05
217/217	1	5,26	2	0,05		1,00
217/220	10	52,63	20	0,53		
220/220	1	5,26	2	0,05		
	19			1,00		

B7						
Genotipo	Nro. Individuos	Porcentaje	Nro. de alelos	F. Genotípicas	Alelo	F. Alélica
168/168	2	10,53	4	0,11	173	0,55
168/170	1	5,26	2	0,05	170	0,16
168/173	6	31,58	12	0,32	168	0,29
170/170	1	5,26	2	0,05		1,00
170/173	3	15,79	6	0,16		
173/173	6	31,58	12	0,32		
	19			1,00		

H115						
Genotipo	Nro. Individuos	Porcentaje	Nro. de alelos	F. Genotípicas	Alelo	F. Alélica
191/191	16	84,21	32	0,84	191	0,89
191/199	2	10,53	4	0,11	199	0,11
199/199	1	5,26	2	0,05		1,00
	19			1,00		

Elaborado por: El autor

4.2.3.2 Prueba de bondad de ajuste: Hardy-Weinberg y Chi-cuadrado

Los resultados de la prueba de bondad de ajuste para los locus analizados demostraron que la población no está en equilibrio Hardy-Weinberg en ninguno de los locus. Los que registraron mayor desviación del equilibrio fueron los locus C5 y A20 con valores de Chi-cuadrado de 45.13 y 68.12 respectivamente. El locus B7 fue el más cercano al equilibrio con un valor de 5.47 de Chi-cuadrado mientras que el locus H115 presentó un valor de 19.46 debido a la baja frecuencia del genotipo heterocigoto 199/199. Es probable que los resultados obtenidos en este análisis estén influenciados por el tamaño de la muestra.

Tabla 4.4. Cálculo de Hardy-Weinberg y Chi cuadrado

C5				
Genotipo	F. Esperada en Hardy-Weinberg	F. Observada	F. Esperada	(O-E) ² /E
217/217	0,0007	0,00	0,07	0,07
208/208	0,1170	15,79	11,70	1,43
195/195	0,0339	0,00	3,39	3,39
189/189	0,1558	5,26	15,58	6,83
187/187	0,0028	0,00	0,28	0,28
217/208	0,0180	0,00	1,80	1,80
217/195	0,0097	0,00	0,97	0,97
217/189	0,0208	5,26	2,08	4,88
217/187	0,0028	0,00	0,28	0,28
208/195	0,1260	10,53	12,60	0,34
208/189	0,2701	26,32	27,01	0,02
208/187	0,0360	0,00	3,60	3,60
195/189	0,1454	26,32	14,54	9,53
195/187	0,0194	0,00	1,94	1,94
189/187	0,0416	10,53	4,16	9,77
	1,0000		$\chi^2 =$	45,13

A20				
Genotipo	F. Esperada en Hardy-Weinberg	F. Observada	F. Esperada	(O-E) ² /E
220/220	0,1170	5,26	11,70	3,54
217/217	0,2001	5,26	20,01	10,87
215/215	0,0111	5,26	1,11	15,58
212/212	0,0028	0,00	0,28	0,28
209/209	0,0028	0,00	0,28	0,28
220/217	0,3061	52,63	30,61	15,84
220/215	0,0720	0,00	7,20	7,20
220/212	0,0360	5,26	3,60	0,77
220/209	0,0360	0,00	3,60	3,60
217/215	0,0942	10,53	9,42	0,13
217/212	0,0471	5,26	4,71	0,07
217/209	0,0471	10,53	4,71	7,19
215/212	0,0111	0,00	1,11	1,11
215/209	0,0111	0,00	1,11	1,11
212/209	0,0055	0,00	0,55	0,55
	1,0000		$\chi^2 =$	68,12

B7				
Genotipo	F. Esperada en Hardy-Weinberg	F. Observada	F. Esperada	(O-E) ² /E
173/173	0,3054	31,58	30,54	0,04
170/170	0,0249	5,26	2,49	3,08
168/168	0,0838	10,53	8,38	0,55
173/170	0,1745	15,79	17,45	0,16
173/168	0,3199	31,58	31,99	0,01
170/168	0,0914	5,26	9,14	1,65
	1,0000		$\chi^2 =$	5,47

H115				
Genotipo	F. Esperada en Hardy-Weinberg	F. Observada	F. Esperada	(O-E) ² /E
191/191	0,8006	84,21	80,06	0,22
199/199	0,0111	5,26	1,11	15,58
191/199	0,1884	10,53	18,84	3,67
	1,0000		$\chi^2 =$	19,46

Elaborado por: El Autor

4.2.3.3 Medidas de variabilidad genética

Las medidas de variabilidad genética usadas determinaron el estado genético de la población. Entre los resultados obtenidos se encontró que el locus A20 presentó la heterocigosidad observada más alta, sin embargo la heterocigosidad esperada fue mayor en el locus C5. El número efectivo de alelos menor que el número observado de alelos en todos los locus, incluso en C5 y A20 fue la mitad del valor observado denotando pérdida de alelos. El valor de PIC fue mayor a 0.5 en todos los locus menos en H115, indicando un menor nivel de polimorfismos para este locus.

Tabla 4.5. Resumen de las medidas de variabilidad genética

Locus	Número de alelos	Número efectivo de alelos	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	PIC	χ^2	P Aprox
C5	6	3,22	0,79	0,71	0,63	45,13	<0,001
A20	6	3,00	0,84	0,68	0,61	68,12	<0,001
B7	3	2,41	0,53	0,60	0,52	5,47	0,062
H115	2	1,23	0,11	0,19	0,17	19,46	<0,001
			0.57				

Elaborado por: El autor

4.2.3.4 Poder de inclusión y discriminación

Los resultados para esta prueba se detallan a continuación en una tabla, en la que se describe que los mejores alelos para discriminar individuos son C5 y A20, mientras que el alelo H115 es el de menor poder de discriminación dentro de la población, para este individuo se estimó que la probabilidad de que dos individuos que se escojan al azar dentro de una población tengan el mismo genotipo fue de tienen el 67%.

Tabla 4.6. Poder inclusión y discriminación

Locus	P_i	P_d
C5	0,1534	0,8466
A20	0,1689	0,8311
B7	0,2421	0,7579
H115	0,6765	0,3235

Elaborado por: El Autor

4.2.3.5 Matriz de alelos compartidos

La matriz de alelos compartidos se utiliza para comparar a los individuos de la población con respecto a los locus analizados. En la matriz elaborada para

los individuos en estudios se encontró que un alto nivel de alelos compartidos siempre mayor al 50% debido a principalmente a que el programa Microsatellite Toolkit for Excel no elimina los locus monomórficos del análisis, sin embargo los microsatélites sirvieron para discriminar a cada individuo dentro de la población ya que no se encontró individuos que compartan el total de alelos en los locus analizados.

Dentro de los resultados se incluyó tres individuos relacionados de la siguiente forma 1 y 2 son padres de 8, y se encontró que debido a que entre los padres comparten el 83.3% de alelos, su hija compartió 91.7% de alelos con cada uno de sus padres. Sin embargo no fue el único caso, el individuo 2 compartió también el mismo porcentaje de alelos con los individuos 5 y 15, y el los individuos 11 y 14 igualmente compartieron este porcentaje, sugiriendo una relación cercana entre estos individuos.

Tabla 4.7. Matriz de alelos compartidos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2	0,83																	
3	0,67	0,83																
4	0,67	0,75	0,67															
5	0,75	0,92	0,75	0,75														
6	0,58	0,75	0,58	0,67	0,67													
7	0,75	0,75	0,67	0,75	0,67	0,67												
8	0,92	0,92	0,75	0,75	0,83	0,67	0,83											
9	0,83	0,75	0,67	0,58	0,75	0,50	0,58	0,75										
10	0,83	0,83	0,83	0,67	0,75	0,58	0,58	0,75	0,75									
11	0,67	0,83	0,83	0,83	0,75	0,75	0,75	0,75	0,58	0,83								
12	0,75	0,83	0,83	0,75	0,75	0,58	0,67	0,83	0,67	0,83	0,83							
13	0,58	0,75	0,67	0,83	0,75	0,83	0,67	0,67	0,50	0,67	0,83	0,67						
14	0,67	0,83	0,83	0,75	0,75	0,67	0,67	0,75	0,58	0,83	0,92	0,83	0,75					
15	0,83	0,92	0,75	0,75	0,83	0,75	0,75	0,83	0,75	0,83	0,83	0,75	0,75	0,75				
16	0,58	0,75	0,67	0,75	0,83	0,58	0,58	0,67	0,58	0,67	0,75	0,67	0,75	0,75	0,67			
17	0,58	0,75	0,83	0,67	0,67	0,58	0,67	0,67	0,50	0,75	0,83	0,75	0,67	0,83	0,67	0,67		
18	0,67	0,67	0,58	0,83	0,67	0,67	0,58	0,67	0,58	0,67	0,67	0,67	0,83	0,58	0,75	0,58	0,50	
19	0,67	0,83	0,67	0,67	0,83	0,67	0,67	0,75	0,75	0,67	0,75	0,67	0,67	0,83	0,75	0,75	0,67	0,50

Elaborada por: Microsatellites Toolkit for Excel V 3.1

CAPÍTULO V DISCUSIÓN

Cuando las poblaciones enfrentan un cuello de botella su diversidad genética se ve disminuida y por tanto se producen poblaciones genéticamente muy homogéneas (Bryant et al. 1986), dentro de estas poblaciones es común que se incremente el riesgo de que los alelos deletéreos incrementen su impacto. Las manifestaciones más comunes de este incremento son la elevación de la incidencia de enfermedades genéticas, la reducción de la fertilidad, la alta mortandad prenatal y neonatal, carencias del sistema inmunológico y crecimiento lento con baja talla en la adultez (Lorimer 1997). Para evitar los problemas asociados a la pérdida de diversidad en poblaciones y especies que se han enfrentado a una reducción dramática de su número, muchas naciones patrocinan programas de genotipificación englobados dentro de proyectos más grandes para recuperar el nivel poblacional o reintroducir especies en peligro a su hábitat natural.

Una especie que sufrió la pérdida de su número y la casi extinción total fue el cóndor californiano, que fue declarado extinto en su hábitat natural por la incapacidad de los individuos sobrevivientes de recuperar la población (Snyder y Snyder 2000). Para recuperar y reintroducir la especie a su hábitat, los animales sobrevivientes fueron capturados y junto con los individuos que ya estaban cautivos, se inició un programa que los devolvería a la naturaleza (Rojo et al. 2003). Entonces el análisis realizado develó la situación genética de la población sobreviviente y de su progenie, el cuello de botella ocurrido en el siglo XX y el subsecuente e inevitable incremento de la endogamia habían reducido la diversidad e incluso había incrementado la frecuencia de aparición de alelos predisponentes para la condrodistrofia, una enfermedad que se había expresado de forma letal para los embriones (Ralls et al. 2000).

Con el ejemplo visto en el cóndor californiano se decidió actuar para evitar que problemas derivados de la endogamia afecten al cóndor andino en el territorio ecuatoriano, especie que se ha visto mermada en el país y en la

distribución norte de su territorio. A fin de proteger a la población de sucumbir ante la deriva genética natural en un cuello de botella, se estudio los diecinueve individuos con seis marcadores moleculares extraídos de la librería de microsátelites diseñada en el cóndor californiano. En dicho estudio se encontró varias diferencias entre especies en cuanto a la información contenida en los locus y se logró determinar la utilidad del conjunto de marcadores como prueba de parentesco para la especie.

Las muestras colectadas de varios centros de tenencia de fauna y zoológicos fueron sometidas al proceso de extracción de ADN donde se encontró cierta dificultad al momento de procesarlas. La muestra parecía no lisarse completamente durante el uso de la Proteinasa K, y taponaba la columna de extracción. Para evitar estos problemas se modifico el inicio del protocolo usando lavados con PBS y lisis de eritrocitos que disminuyeron la densidad de la muestra. También se disminuyó el volumen usado en la extracción.

Los microsátelites usados para la prueba fueron seleccionados empíricamente, realizando PCR's con los primers diseñados para el cóndor californiano, de todos los marcadores usados seis amplificaron satisfactoriamente en el ADN del cóndor andino. No se consiguió amplificar más microsátelites, aunque es probable que algunos de los otros marcadores también amplifiquen en el genoma del cóndor andino, no fue posible durante la realización del trabajo tener el éxito esperado ni el número deseado de marcadores. El desarrollo de los protocolos de PCR demostró que los primers escogidos amplificaban adecuadamente aun usando poca cantidad de ADN, lo que permitió usar más eficientemente el material genético extraído.

La utilización de PCR's multiplex para el análisis de fragmentos permitió disminuir el tiempo en el que se consiguió los resultados, al analizar varios marcadores con distinto fluorocromo y similar temperatura de annealing en una sola corrida. Los resultados en el análisis de fragmentos evidenció que los microsátelites C5 y H269 poseen alelos con el mismo tamaño de 195 pb

y que debido al uso del mismo fluorocromo en ambos marcadores se sobrelaparon en la imagen del análisis. No se podía prever la diferencia real entre los tamaños de los microsatélites por tanto se usó los tamaños observados en el cóndor californiano para diseñar los primers marcados con fluorocromos, sin embargo la información adquirida en el análisis de fragmentos nos permitirá diseñar con mayor eficacia los primers para futuras pruebas en nuevos individuos.

Un total de seis microsatélites se usaron finalmente para el genotipaje, de estos, dos fueron monomórficos y por tanto no fueron considerados para los análisis estadísticos. El nivel observado de heterocigosis en los cuatro locus varió de 0.19 a 0.71, con una media de 0.57 lo cual nos indica que probablemente la diversidad se mantiene a pesar de la limitada población existente. Para tener una estimación más real, el número de alelos estudiados y de individuos analizados debe ser mayor, además los resultados obtenidos de la población en este estudio deberían ser comparados con otras poblaciones de mayor tamaño como la de Argentina o Chile.

En el locus C5 se encontró claras diferencias de tamaño y de número de alelos con el cóndor californiano. Sus frecuencias genotípicas denotaron tendencia hacia los genotipos heterocigotos, y baja proporción de homocigotos, la heterocigosidad observada y esperada obtuvieron valores altos, de 0.79 y 0.71 respectivamente, lo que nos indica un locus muy heterocigoto. El número efectivo de alelos, con un valor de 3.22, nos indica que esta proporción de alelos se encuentran fijados adecuadamente en la población, siendo el valor la mitad de los alelos observados puede ser un indicador de la disminución de variabilidad del locus o sugerir que los alelos con bajas frecuencias son relativamente nuevos y por tanto no están distribuidos en la población. El valor de PIC para este alelo fue de 0.63, esta cifra nos indica el gran polimorfismo del locus. El poder de inclusión y discriminación revela un locus con gran capacidad para diferenciar entre

individuos. Los análisis hechos con Chi-cuadrado indican una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg bastante amplia.

En el locus A20 también se encontró un número de alelos mayor a los encontrados en el cóndor californiano, sin embargo el tamaño de estos alelos fue muy cercano al tamaño en la especie californiana. En el análisis de fragmento fue el microsatélite más difícil de caracterizar, debido a que se obtuvieron varios picos inespecíficos, para establecer los alelos válidos se comparó todos los individuos para encontrar repeticiones entre ellos y se prestó atención a la altura del pico. Solo los picos con suficiente calidad y repeticiones fueron contados como ciertos. Las frecuencias genotípicas presentaron una distribución desigual, más de la mitad de individuos (frecuencia 0.53) presentaron el genotipo 217/220, mientras que el resto de genotipos mostraron frecuencias de tan solo 0.11 o 0.05. La distribución alélica también favoreció a los alelos pertenecientes al genotipo dominante. Igual que en el locus anterior podría tratarse de alelos recientes o de pérdida de alelos. Los valores de Chi-cuadrado indican la mayor desviación del equilibrio Hardy-Weinberg de todos los locus analizados, efecto causado principalmente por la elevada frecuencia del genotipo 217/220. El número efectivo de alelos de 3 también se relaciona con la frecuencia del genotipo descrito anteriormente. La heterocigosidad observada y esperada obtuvieron valores de 0.84 y 0.68 respectivamente, la diferencia entre estos dos valores se debe principalmente a la desviación del equilibrio HW, pero el alto valor obtenido denota una población mayormente heterocigota. El valor de PIC indica el alto nivel polimórfico del locus y junto con los valores del poder de inclusión y discriminación, proveen un diagnóstico de la gran capacidad para diferenciar individuos de este locus.

El microsatélite del locus B7 fue apenas mayor tamaño descrito para el cóndor californiano, hubo también mayor número de alelos. Las frecuencias se encontraron mejor distribuidas en la población para este marcador. Aquí todos los genotipos posibles con los tres alelos descritos fueron encontrados, y distribución fue más uniforme que en los locus anteriores.

Las frecuencias genotípicas tampoco mostraron una preferencia exagerada para algún genotipo en particular. En cuanto a las frecuencias alélicas, el alelo de 173 pb fue el de mayor frecuencia, con un valor de 0.55, debido a la frecuencia alta de su genotipo homocigoto. Este locus fue el más cercano al equilibrio Hardy-Weinberg, probablemente si la población fuese mayor se encontraría en equilibrio HW. El de alelos efectivos fue el más cercano al número de alelos observados denotando una mejor distribución de alelos y genotipos en la población. La heterocigosis observada y esperada también tuvieron valores altos de 0.53 y 0.6 respectivamente, valores que indican que una población en equilibrio tendría valores de heterocigosidad más altos que los de la población estudiada. El menor número de alelos también condicionó un menor valor de PIC que los locus anteriores, sin embargo es relativamente alto e indica un buen nivel de polimorfismo para este microsatélite. Los valores del poder de inclusión e discriminación muestran una menor capacidad de diferenciar individuos comparado con los marcadores descritos anteriormente.

El locus H3 presentó tamaño medido en pb menor al del cóndor californiano, además fue monomórfico, por tanto posee menor número de alelos que en su contraparte norteamericana, además es inútil diferenciar individuos. Sin embargo de tener nuevas muestras estas deberían ser testadas para este locus, a fin de comprobar si existen otros polimorfismos.

El microsatélite del locus H115 tuvo igual número de alelos que en la especie californiana, su tamaño bordeaba el promedio del cóndor californiano. En cuanto a los genotipos hubo una distribución desigual causada por el homocigoto 191/191 que concentró la mayoría de la población y también porque el otro homocigoto 199/199 tan solo apareció en un solo individuo. Las frecuencias alélicas también mostraron una distribución no equilibrada como consecuencia de los genotipos observados. El alelo 191 tuvo un valor de 0.89 de frecuencia, en tanto que el alelo 199 solo obtuvo un valor de 0.11. No obstante según las definiciones de genética de poblaciones, si un alelo presenta una frecuencia mayor a 0.05 puede ser

considerarse ese locus como polimórfico (Hajeer 2000). El cálculo de Chi-cuadrado para Hardy-Weinberg mostró que el locus presenta cierta desviación del equilibrio HW aunque menor que los locus C5 y A20. El número efectivo de alelos denotó una cierta pérdida de diversidad para este locus, valor fue de 1.23 casi la mitad del número observado de locus. El bajísimo nivel de heterocigosidad observada y esperada, con valores de 0.11 y 0.19 respectivamente develó que en este locus la población es bastante homogénea, la diferencia entre estos dos niveles mostró que la población tiene menor heterocigosis que lo que se espera, y puede tomarse como un síntoma de disminución de la diversidad. El valor de PIC muestra un locus poco polimórfico, y los valores del poder de inclusión y discriminación indican poca capacidad para diferenciar individuos.

En el H269 el microsatélite fue monomórfico y su tamaño fue menor que en el californiano con alrededor de 10 a 18 pb. Por esta razón se sobrelapó con un alelo de C5 de 195 pb debido a que ambos fueron marcados con el mismo fluorocromo. Como marcador no fue útil por su total carencia de polimorfismos, sin embargo de tener nuevas muestras estas deben ser testadas para comprobar si existe alguna diferencia con los resultados encontrados.

En resumen la población divergió significativamente con los resultados hallados en cóndor californiano, esto puede ser considerado como una señal de que la población aun siendo menor que la del estudio en la especie californiana, donde se estudiaron la mayoría de los individuos de la especie, posee mayor variabilidad genética que este. Aunque esta comparación parece ser alentadora la reducción de los marcadores útiles a cuatro, la diferencia entre el número efectivo de alelos y el número observado, y el mayor valor de heterocigosidad esperada en dos alelos, indican una población donde la frecuencia de los alelos con menor frecuencia se está disminuyendo y ciertos genotipos están también desapareciendo. Los resultados del test de Chi-cuadrado en Hardy-Weinberg mostraron que en tres de cuatro locus la población esta en desequilibrio, sin embargo este

resultado puede estar influenciado por el tamaño de la muestra, de tan solo diecinueve individuos.

Sin embargo los cuatro microsatélites fueron suficientes para diferenciar los genotipos de los diecinueve cóndores, ya que ningún individuo poseyó la misma configuración para este número de individuos. Las pruebas de poder de inclusión y discriminación demostraron la utilidad de los cuatro microsatélites para diferenciar a los individuos. Sin embargo el detalle de las relaciones de parentesco aún es bajo, ya que la prueba asignó niveles de alelos compartidos iguales al número encontrado entre los padres y su hija, a individuos de los que no se tiene certeza de que existe algún parentesco real.

5.1 Recomendaciones para el mantenimiento de la diversidad genética

Como hemos visto el resultado esperado de la endogamia es la pérdida de diversidad genética. Para evitar los efectos perjudiciales causados por ésta, se realizó el presente trabajo, como un esfuerzo para conocer el estado genético de los cóndores cautivos y proporcionar información pertinente para que su progenie mantenga, en un nivel aceptable, la diversidad suficiente para la preservación de la especie. Sin embargo la reproducción en cautiverio está supeditada a la etología de los individuos, por tanto recomendar las parejas más aptas para reproducirse puede ser una acción demasiado precipitada, tomando en cuenta que las parejas teóricas pueden o no aceptarse como tales.

Los marcadores que han sido descritos brindan información del estado genético de la población y de los individuos, pero el nivel de precisión sobre el genotipo individual es todavía bajo. El análisis usando los seis microsatélites amplificados asignó valores de parentesco iguales a los de parientes consanguíneos directos como hijos o hermanos, a algunos

individuos cuya relación no esta comprobada. Es posible que exista una relación de parentesco entre estos cóndores, pero para determinar si son o no hermanos, o si tienen realmente un parentesco tan cercano, se necesita una prueba de parentesco que brinde mas detalles con mayor número de marcadores.

Los individuos 1 y 2 comparten el 83.3% de los alelos estudiados y son padres del individuo 8 con quien comparten ambos el 91.7% de alelos, en tanto que este individuo no presenta un nivel de homocigosis diferente al resto, sugiere que toda la población procede de padres que probablemente comparten también un buen porcentaje de alelos en los locus que hemos estudiado. En vista de esto, se analizaran los individuos que conviven juntos con el fin de señalar si el nivel de parentesco es alto y por ende no recomendar que estos individuos conciban crías. También se resaltaran los animales con menor nivel de alelos compartidos.

Además de la alta cantidad de alelos compartidos encontrados en los padres del individuo 8 con este, también se encontraron posibles relaciones de parentesco cercano entre otros individuos. Se encontró que el individuo 2 también compartía el 91.7% de los alelos con los individuos 5 y 15, cifra también hallada entre los individuos 11 y 14, estos individuos son tomados como hermanos teóricos hasta describir con mayor detalle su genotipos.

En el zoológico de Guayllabamba habitan dos individuos nombrados para este estudio como 1 y 2. Ellos han sido los únicos individuos que lograron reproducirse y cuyas crías han sobrevivido, entre estos, el individuo 8 de este estudio. Los cóndores 1 y 2 comparten el 83.3 % de alelos, un porcentaje muy alto y sin embargo han logrado reproducirse. En la Hacienda Zuleta habitan los individuos 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15 y 16, de ellos quienes presentan el menor número de alelos compartidos son: los individuos 4 y 6 con un 58.3%, 3 y 16 con un 66.7%, y 5 y 13 con un 66.7%. En este grupo existen mayor número de hembras por tanto si asignamos parejas con el menor porcentaje, los individuos 15 y 17 quedan solos, debido a que el menor porcentaje de alelos compartidos de ambos es con el individuo 6 con

quien ambos comparten 66.7% de alelos, y este a su vez comparte tan solo 58.3% con el individuo 4, siendo este número el menor registrado se le da preferencia a esta pareja. En la hacienda Iltio están los individuos 7 y 8, quienes comparte el 83.3% de alelos, mismo porcentaje que los cóndores en Guayllabamba. Los individuos 9, 10, 11 y 12 habitan en el Parque Cóndor, de ellos solo ente el individuo 9 y los individuos 11 y 12 existen bajos porcentaje de alelos compartidos, 58.3 y 66.7% respectivamente. En el resto de individuos el porcentaje de alelos compartidos es relativamente alto: 75% entre 9 y 10, y 83.3% entre 10 y 11, entre 10 y 12 y entre 11 y 12. El grupo del Zoológico de Baños tiene el menor parentesco en todos los grupos analizados, entre los individuos 17 y 18 y los individuos 18 y 19 el porcentaje alcanzó el 50% y entre los individuos 17 y 19 es de 66.7%. Estos resultados constituyen al grupo del zoológico de baños como el más diverso de los cuatro grupos estudiados.

CAPÍTULO VI

6.1 CONCLUSIONES

El nivel de variabilidad genética fue estimado usando la metodología de microsatélites, la población estudiada consistió en los diecinueve individuos mantenidos en cautiverio en diversos centros de tenencia de fauna y zoológicos. Seis locus fueron usados para el análisis. Los resultados del análisis con microsatélites en estos locus evidenciaron diferencias con la población estudiada del cóndor californiano. La variabilidad genética en la población de cóndor andino es superior a la encontrada en la especie californiana, a pesar de que el número de individuos estudiados fue menor.

Los resultados de Hardy-Weinberg indican que la población presenta desviación del equilibrio en tres de los cuatro locus. Aunque el resultado puede verse afectado por el tamaño de muestra, sirve de indicador de que fuerzas externas están modelando la población, en este caso, por la condición de la especie se podría especular que la deriva genética está disminuyendo la variabilidad genética. Los valores altos de heterocigosidad observada y esperada nos indican también que la población aún conserva varios alelos en genotipos mayormente heterocigotos.

La población parece estar apenas sufriendo los efectos de la deriva genética y el cuello de botella, las medidas de diversidad genética reflejan una población que mantiene un nivel de heterocigosis alto con tendencia a disminuir alelos con baja frecuencia. Se puede considerar que la población no presenta el nivel de endogamia presente en la especie californiana, aunque se necesita más marcadores informativos para hacer un análisis más preciso.

El nivel de parentesco entre individuos también presentó resultados interesantes. Además de la semejanza esperada entre los padres y su hija, se encontró un alto porcentaje de alelos compartidos entre individuos cuya relación no está documentada. La cantidad de alelos compartidos fue igual

entre estos cóndores que entre padres e hija, sugiriendo un grado de consanguinidad semejante a la relación ente hermanos. Sin embargo es precipitado afirmar que son en efecto hermanos, debido a que solo cuatro marcadores presentaron polimorfismos capaces de discriminar eficientemente entre individuos.

6.2 RECOMENDACIONES

El análisis con microsatélites permitió conocer el estado genético de la población, esta información fue clave para estimar la variabilidad genética en el cóndor andino. Sin embargo esta información debe ser ampliada para describir con mayor detalle el genotipo de la especie. Los seis microsatélites cumplieron el objetivo de dar las primeras luces en genética de poblaciones, con el fin de brindar una asesoría para mantener la diversidad genética de la especie en el programa de reintroducción pero es necesario incrementar el número de marcadores moleculares utilizados, que nos permitan discriminar con mayor precisión a los individuos y a posibles subpoblaciones.

El número limitado de individuos tiende a comprometer los resultados de los análisis estadísticos. Los diecinueve cóndores pueden ser descritos y dar las primeras luces del genotipo de la especie, pero incrementar el tamaño de muestra aumentaría la confiabilidad de los análisis estadísticos. La obvia dificultad de conseguir mayor número de muestras limita el logro de este objetivo, por lo que se debe buscar asistencia de profesionales de los países donde habita la especie, para elevar el número de muestras analizadas.

Además del uso de microsatélites se recomienda mejorar el alcance de la investigación utilizando otro tipo de estudios. Se debería trabajar en ADN mitocondrial y en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, para brindar información más detallada de la población existente y de nuevas aves que nazcan producto del programa de reproducción.

La formación de parejas debe tomar en cuenta, además de la información dada, la etología de la especie, debido a que parejas formadas con bajo nivel de parentesco pueden nunca llegar a la reproducción por razones derivadas de su etología reproductiva.

Cada especie posee sus propias características biológicas, y estas características pueden influir en el trabajo de laboratorio. En el caso del cóndor andino la extracción del ADN se vio dificultada por las propiedades de las muestras de sangre del ave. Todas estas particularidades deben ser consideradas cuando se extrae ADN de distintas muestras, la especie, el tipo de tejido y otros detalles modifican la forma como un kit de extracción trabaja para conseguir el ADN.

En un programa de reproducción de especies silvestres en cautiverio con el objetivo de reintroducirlas a su hábitat natural debe considerarse el nivel de variabilidad genética de la población, puesto que las poblaciones pequeñas tienden a la endogamia, y la endogamia tiende a incrementar la frecuencia de alelos deletéreos, motivo por el cual el éxito del programa podría verse en peligro. Es recomendable entonces siempre realizar una caracterización de la variación genética de los individuos del programa para no poner en riesgo a la progenie de estos.

REFERENCIAS

Libros:

- Buckley, T., Mercedes, S., Morton, E., Ridgely, R. y Buckley, F. (1985). Neotropical ornithology. Washington DC, EEUU: The American Ornithologists' Union.
- Caughley, G. y Sinclair, A. (1994). Wildlife Ecology and Management. Massachusetts, EEUU: Blackwell Science.
- CITES. (1973). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: Cathartidae, New World Vultures. Washington DC, EEUU: CITES.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., y Sargatal, J., (1994). Handbook of the birds of the world-New World vultures to guinea fowl Vol. 2. Barcelona, España: Lynx Editions.
- Egozcue, J., Antich, J., Ballesta, F., Goyanes, V., Izquierdo L., Tamparillas M. y Tavares A. (1978). Genética Médica. Barcelona, España: Editorial Espaxs.
- Feduccia, A. (1999). The Origin and Evolution of Birds: Second Edition. New Haven, EEUU: Yale University Press.
- Fisher, R. (1930). The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford, Inglaterra: At the Clarendon Press.
- Goldstein, D. y Schlötterer, C. (1999). Microsatellites: Evolution and applications. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press.
- Groom, M., Meffe, G., y Carroll, C. (2006). Principles of conservation biology 3ra Ed. Sunderland, EEUU: Sinauer.

- Hajeer, A., Worthington, J. y John, S. (2000). SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. Manchester, Reino Unido: Eaton Publishing.
- Masera, R., Lew, J., y Peirano G. (2005). Las mesetas patagónicas que caen al mar. Viedma, Argentina: Gobierno de Río Negro.
- Murphy, R. (1936). Oceanic Birds of South America. Nueva York, EEUU: American Museum of Natural History
- Murphy, R. (1925). Bird Islands of Peru. Nueva York, EEUU: Putnam's Sons.
- Nicholas F. (1998). Genética Veterinaria. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Pavez, E. y Tala, C. (1995). Río Blanco, la herencia de los Glaciares. Santiago, Chile: CODELCO División Andina.
- Snyder, N. y Snyder, H. (2000). The California Condor. San Diego, EEUU: Academic Press.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2008). Molecular Biology of the Gene: 6th Ed. San Francisco, EEUU: Benjamin Cummings.

Revistas:

- Aallendorf, F., Christiansen, F., Dobson, T., Earnes, W. y Frydenberg, O. (1979). Electrophoretic variation in large mammals I: the polar bear, *Thalarctos maritimus*. *Hereditas*, 91(1), 19–22.
- Adams, S. (1907). An experience with the South American Condor. *Condor* 9(2), 44-48.

- Aguilar, H. (2000). El Cóndor de los Andes *Vultur gryphus* (Ciconiiformes: Ciconiidae: Cathartinae)- Un Visitante Ocasional en Venezuela Extinción vs. Conservación. *Rev Ecol Lat Am*, 6(1), 23-33.
- Aranguren-Méndez, J., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y. y Jordana J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch Latinoam Prod Anim*, 13(1), 30-42.
- Avise, J., Nelson, W., y Sibley, C. (1994). DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World Vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 5173-77.
- Barrowclough, G. Y Gutierrez, R. (1990). Genetic variation and differentiation in the Spotted Owl (*Strix occidentalis*). *Auk*, 107(1), 737-44.
- Bartlett, J. y Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 226(1), 3-6.
- Bryant, E., McCommas, S. y Combs, L. (1986). The effect of an experimental bottleneck upon quantitative genetic variation in the housefly. *Genetics*, 114(4), 1191-211.
- Calchi, R. y Vilorio, A. (1991). Occurrence of the Andean Condor in the Perijá mountains of Venezuela. *Wilson Bulletin*, 103(1), 720-22.
- Campbell, K. y Tonni, E. (1983). Size and locomotion in teratorns. *The Auk* 100(2), 390-403.
- Charlesworth, D. y Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst*, 18(1), 237-68.
- Chemnick, L., Kumamoto, A. y Ryder, O. (2000). Genetic analysis support of conservation efforts for the Californian condor. *Int Zoo Yb*, 37(1), 330-39.

- Cheng, H. y Crittenden L. (1994). Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 73(4), 539-46.
- Cheng, H., Levin, I., Vallejo, R., Khatib, H., Dodgson, J., Crittenden, L. y Hillel, J. (1995). Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science*, 74(11), 1855-74.
- Cronin, M., Amstrup S., Garner, G. y Vyse E. (1991). Interspecific and intraspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). *Canadian Journal of Zoology*, 69(12), 2985–92.
- Dannenbergh, A., Buss, E. y Goetinck, P. (1982). Proteoglycans in the cartilage of the turkey chondrodystrophy mutant. *Prog Clin Biol Res.* 110 (Pt B), 85-9.
- Emslie, S. (1987). Age and diet of fossil Californian condor in Grand Canyon, Arizona. *Science*, 237(4816), 768-70.
- Emslie, S. (1988). The fossil history and phylogenetic relationships of Condors (*Ciconiiformes: Vulturidae*) in the New World. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 8(2), 212-28.
- Geyer, C., Ryder, O., Chemnick, L. y Thompson, E. (1993). Analysis of Relatedness in the California Condors, from DNA Fingerprints; *Mol Biol Evol*, 10(3), 571.
- Hendrickson S., Bleiweiss R., Matheus, J., Silva de Matheus L., Jácome, NL. y Pavez E. (2003). Low genetic variability in the geographically widespread Andean condor. *The Condor*, 10(1), 1–12.
- Hermes, J., Abbott, U., Johnston, E. y Owens, M. (1990). A new chondrodystrophy mutation in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *J Hered.* 81(3), 222-4.
- Hernández, J., Mora, J. y Rocha, O. (2008). Diversidad genética y relaciones de parentesco de las poblaciones silvestres y cultivadas de

pejibaye (*Bactris gasipaes*, Palmae), utilizando marcadores microsatelitales. *Rev Biol Trop*, 56(1), 217-45.

Hoelzel, A., y Dover, G. (1991). Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Journal of Heredity*, 66 (1), 191–195.

Hurtado, P., Álvarez, E., Llano, G. y Fregène, M. (2004). Detección de marcadores microsátélites asociados con la resistencia al añublo bacterial de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Colombia; *Fisiopatología Colombiana*, 28(2), 81-6.

Koenen, M., Koenen, S. y Yáñez, N. (2000). An evaluation of the Andean condor population in northern Ecuador. *Journal of Raptor Research* 34(1), 33-6.

Lambertucci, S., Jácome, N. y Trejo, A. (2008). Use of communal roosts by Andean Condors in northwest Patagonia, Argentina. *Journal of Field Ornithology*, 79(2), 138-146

Lambertucci, S. y Mastrantuoni, O. (2008). Breeding behavior of a pair of free-living Andean Condors. *Journal of Field Ornithology*, 79(2), 147-151.

Lambertucci, S. (2007). Biología y conservación del Cóndor Andino (*Vultur gryphus*) en Argentina. *Hornero*. 22(2), 149-158.

Li, H., Schwartz, N. y Vertel, B. (1993). cDNA cloning of chick cartilage echondroitin sulfite (aggrecan) core protein and identification of a stop codon in the aggrecan gene associated with the chondrodystrophy nanomelia. *J Biol Chem*. 268(31), 23504-11.

Lint, K. (1950). Condor egg hatched in incubator. *Condor*, 53(1):102.

Lint, K. (1959). *San Diego's Andean Condors*. *Zoonooz*, 32(1):3-7.

- Miller L. (1909). *Teratornis*, new avian genus from Rancho La Brea- Univ California Publ. Bull Dept Geol, 5(1), 305-17.
- Morizot, D., Anthony, R., Grubb, T., Hoffman, S., Schmidt M, y Ferrell R. (1985). Clinical Genetic Variation at Enzyme Loci in Bald Eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) from the Western United States. *Biochem Genet*, 23(3-4), 337-45.
- Murray, B., Malik, S. y White, B. (1995). Sequence variation at the major histocompatibility complex locus DQB in beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Molecular Biology and Evolution*, 12(4), 582–593.
- Nei, M., Maruyama, T., y Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability. *Evolution*, 29(1), 1-10.
- Norton, W. (1975). Notes on the birds of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*, 95(1), 109-15.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K, y Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci*, 86(8), 2766-70.
- Palmqvist, P. y Vízcaíno, S. F. (2003). Ecological and reproductive constraints of body size in the gigantic *Argentavis magnificens* (Aves, Theratornithidae) from the Miocene of Argentina. *Ameghiniana*, 40(3), 379–85.
- Ralls, K., Ballou, J., Rideout, B. y Frankham, R. (2000). Genetic management of chondrodystrophy in California condors. *Anim Conserv.* (3), 145-53.
- Raudsepp, T., Houck, M., O'Brien, P., Ferguson-Smith, M., Ryder, O. y Chowdhary, BP. (2002). Cytogenetic analysis of California condor

(*Gymnogyps californianus*) chromosomes: comparison with chicken (*Gallus gallus*) macrochromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 98(1), 54-60.

Ríos-Uzeda, B., Wallace, R. (2007). Estimating the size of the Andean Condor population in the Apolobamba Mountains of Bolivia. *Journal of Field Ornithology*. 78(2), 170–75.

Rojo, A., Santos del Prado, K. y De la Cruz, E. (2003). La recuperación del cóndor de california en México. *Gaceta ecológica* 97(1), 33-44.

Romanov, M., Jones, K., Chemnick, L., Stremel-Mork, E., Otten, C., Da, Y., Akhunov, E. y Ryder, O. (2009). California Condor Microsatellite-Enriched Library As A Tool For Genetic And Genomic Studies In An Endangered Species. [Abstract]. *Plant & Animal Genomes XVII Conference*. PAG-XVII (P517)

Romanov, M., Tuttle, E., Houck, M., Modi, W., Chemnick, L., Korody, M., Stremel-Mork, E., Otten, C., Renner, T., Jones, K., Dandekar, S., Papp, J., Da Y., Green, E., Magrini, V., Hickebotham, M., Glasscock, J., McGrath, S., Mardis, E., Ryder, O. (2009). The value of avian genomics to the conservation of wildlife. *BMC Genomics*.10 (Suppl 2), S10.

Sarno, R., Franklin, W. y Prexl, W. (2000). Activity and population characteristics of Andean Condors in southern Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*.73 (1), 3–8.

Shaffer, M. (1981). Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, 31(2), 131-34.

Simberloff, D. (1988). The Contribution of population and community biology to conservation science. *Ann Rev Ecol Syst*, 19(1), 473-511.

Tonni, E. y Noriega, J. (1998). Los cóndores (Ciconiformes, Vulturidae) de la región pampeana de la Argentina durante el Cenozoico Tardío:

distribución, interacciones y extinciones. *Ameghiniana*, 35 (2), 141-50.

Toro, H., Pavez, E., Gough, R., Montes, G. y Kaleta, E. (1997) Serum chemistry and antibody status to some avian pathogens of free-living and captive condors (*Vultur gryphus*) of central Chile. *Avian Pathology*. 26(2), 339-45.

Williams, R. y Benirschke R. (1976). The chromosomes of four species of Falconiformes. *Experientia*, 32(3), 310-311.

Wallace, M., y Temple, S. (1988). Impacts of the 1982–1983 El Niño on population dynamics of Andean Condors in Perú. *Biotropical* 20(1), 144–150.

Wallace, M., Temple, S. y Torres A. (1985). Ecología del Cóndor Andino (*Vultur gryphus*) en el norte del Perú. I Simposio de ornitología neotropical IX Congreso Latinoamericano. *Zool*, 69-76.

Diaz, D., Cuesta, M., Cuesta, T., Abreu D, y Mujica E. (2000). Estrategia de conservación para el cóndor andino (*Vultur gryphus*). World Wildlife Fund and Fundacion Bio Andina, Caracas, Venezuela.

Internet:

Astore V. (2010). Entrevista de Vanessa Astore, Jefa Conservación Zoológico Buenos Aires y Coord. Proyecto de Conservación Cóndor Andino. Recuperado en 17 de Marzo de 2011 de http://www.actions-biodiversite.org/site/index.php?view=article&catid=1%3Aarticle&id=48%3Ainterview-vanessaastorefondationbioandina&tmpl=componEnt&print=1&page=&option=com_content&lang=es

- Escobar V. (2007). Programa Binacional de Conservación Cóndor Andino, Chile – Argentina; La Chiricoca. Recuperado en 07 de Julio de 2011 de <http://www.aveschile.cl/publicaciones.htm#chir>
- Haemig, P. (2008). Ecología de los Cóndores. Ecología. Recuperado de 21 de Abril de 2011 de <http://www.ecologia.info/condor-dos-andes.htm>
- IUCN. (2011). International Union for Conservation of Nature and Natural Resources- Red List. Recuperado el 15 de Diciembre de 2010 de <http://www.iucnredlist.org/>
- Lorimer H. (2007). Inbreeding and Genetics. Recuperado el 20 de Abril de 2011 de <http://people.ysu.edu/~helorimer/inbredgen.html>
- Mayorga M. (2009). El Cóndor Andino. Recuperado el 18 de Noviembre de 2010 de http://surmagico.cl/condor_introduccion.htm
- Meza, P., Quinga, L., Calispa, A., Vargas, H., y Muñoz-Ron, I. (2009). Censo Nacional de Cóndores Andinos Región Centro Norte; SIMBIOE (Corporación Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana). Recuperado el 18 de Agosto del 2010 de http://www.condorecuador.org/condor/fotos/Informe_Condor_2009.pdf

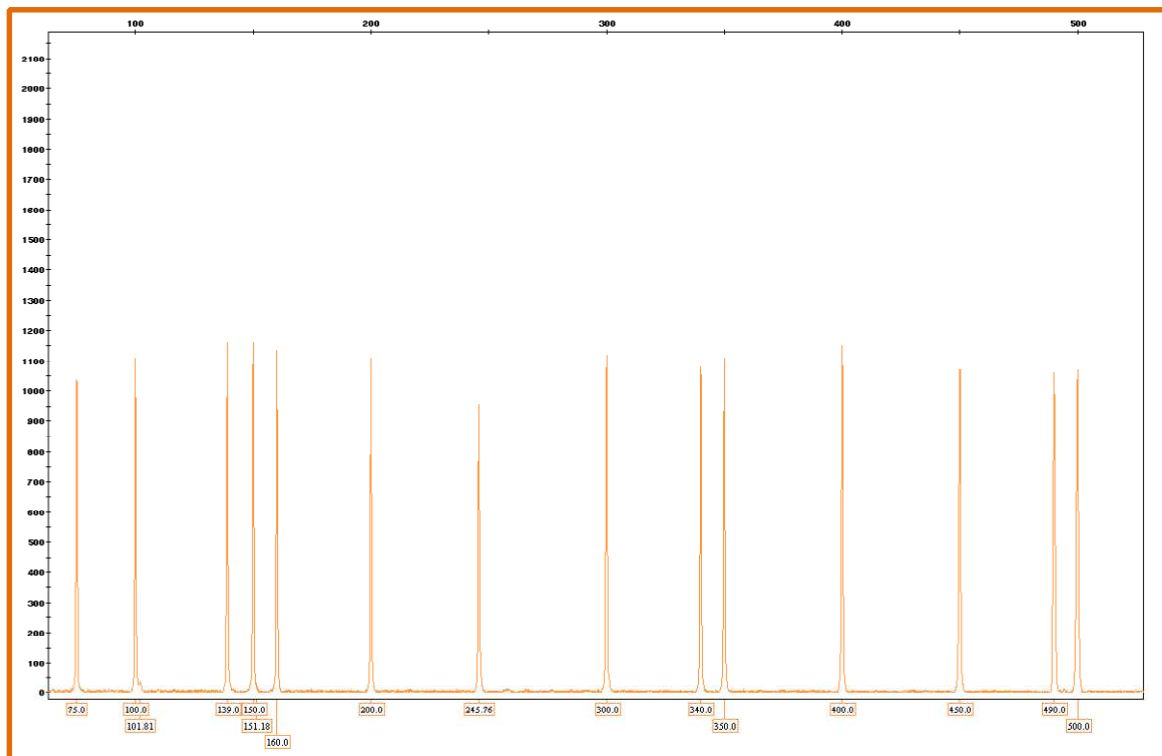
ANEXOS

Anexo1. Microsatélites extraídos de la Librería para cóndor californiano

Primer pairs for 20 polymorphic microsatellite loci in California Condor						
LOCUS	PRIMER FORWAR	PRIMER REVERSE	REPETITION	ANNEALING TEMP	APROX. SIZE bp	ACCES NUMBER*
A8	TTTGCTTTAT TCCTACAGTTGC	TGGAAAATGTC TGTTGTGTTT	dinucleotide	65 °C	210-232	
A20	TCAGCACCAT AGTGTCAGAG	AAAGGTCCAA GTGTTTTTACG	dinucleotide	58 °C	206-208	
B7	AAGCCAGGATA ATGTAGGAGG	AACCCCATAC TGGAACCCAG	trinucleotide	60 °C	165	
C5	GATACGGGG CACAGAGTT	CGCAAGCAGT CAAATAGATAG	trinucleotide	58 °C	179-191	EF108178
D6	TCACATCCAG AGCAGTCTACA	AACTTGAGGAC AATTTGTGTCA	tetranucleotide	58 °C	256-264	
D9	GGCAAAGTCC TTAATTTTAGC	ATCAACTGAG CAGCTCTCAT	tetranucleotide	58 °C	204-216	EF108179
D10	GTTGGGTCAC ATCCAGAGC	CGGGGAAATT ACTTGCCTT	tetranucleotide	63 °C	107-115	
D24	CAGCCAGC TCTGAACTGA	GCAAAAAGTGA GCATGAAAAC	tetranucleotide	60 °C	164-168	
D126	GGAAGAACCT GAAAAAATGTG	GCAGAGGAAG TCCCTGTATG	tetranucleotide	65 °C	227-243	
G8	TCTGGAGCTG AATCTGTAGC	GACAGCCTTC ACATTATTTCA	tetranucleotide	60 °C	247-251	
H3	CCAGGTCATG TCCACTTTTT	AATCCCCAGT ATCAATGCAG	tetranucleotide	63 °C	119-127	
H6	GGGAAAGGG TATTTAGTGGG	GGAGGGATG GTCATTATGG	tetranucleotide	58 °C	113-125	
H106	CCATTTGGCA GATAAGAGAA	GGTATTCAGG TAGGGACAGAC	tetranucleotide	65 °C	215-239	
H115	GCACAGAGTGA GAGAGCATTTT	AGGAGGAGGG AGATATTCAGC	tetranucleotide	60 °C	196	EF108180
H127	AATCCCTCTC TCCTGTCTCTC	CAAAAAAGAAA GTTGTGAGACG	tetranucleotide	63 °C	123	
H238	GGGGATATTC ATCAATCTAAGC	GAACCAGACA CATCATCCTTC	tetranucleotide	58 °C	130	
H269	CTCTGCTGTC CGTTTGTTT	AGGATGGCT GGATGAATG	tetranucleotide	60 °C	215-223	EF108181
Primers pairs from other species						
FhU2	GTGTTCTTAAAC ATGCCTGGAGG	GCACAGGTA TATTTGCTGGCC	dinucleotide	55 °C		AF033542
HrU2	CATCAAGAGAGG GATGGAAAGAGG	GAAAAGATTATT TTTCTTTCTCCC	dinucleotide	56 °C	150-200	X84087
HrU6	GCTGTGTCATT TCTACATGAG	ACAGGGCAG TGTTACTCTGC	tetranucleotide	56 °C		X84091

* GenBank Accession Number if available

Elaborado por: Kenneth Jones

Anexo 2. Marcador de peso interno Liz 500[®]

Tomada de: GeneMapper v. 2.0.