

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias de la Salud**

**Variabilidad genética del cóndor andino (*Vultur gryphus*) en  
Ecuador: Resultados preliminares  
Trabajo de titulación**

**Shady Carolina Heredia Santos**

**Medicina Veterinaria**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario

Quito, 22 de diciembre de 2017

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Variabilidad genética del cóndor andino (*Vultur gryphus*) en Ecuador:  
Resultados preliminares**

**Shady Carolina Heredia Santos**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Eduardo Díaz, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 18 de diciembre de 2017

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Así mismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Shady Carolina Heredia Santos

Código: 00108487

Cédula de Identidad: 060266549-9

Lugar y fecha: Cumbayá, 22 de diciembre de 2017

## RESUMEN

El cóndor andino es un ave importante desde el punto de vista ecológico, económico y cultural para los países latinoamericanos. Está catalogada como especie casi amenazada por la IUCN, sin embargo, en los últimos años se ha registrado una baja en el número de individuos debido principalmente a causas antropogénicas como la caza o la expansión de la frontera ganadera. Esta reducción en el número de individuos es peligrosa ya que pueden desarrollarse problemas de tipo genético en las poblaciones silvestres que pongan en peligro a la especie. Para determinar el grado de amenaza de una población a nivel genético se han utilizado a lo largo de los años segmentos de ADN mitocondrial que son capaces de determinar las relaciones filogenéticas entre individuos y entre poblaciones de una especie. En este estudio se describen los resultados preliminares del estudio genético realizado sobre 30 ejemplares de cóndor andino de Ecuador mediante el uso de marcadores moleculares, donde se analiza el Dominio II de la Región Control de la mitocondria con el objetivo de comprobar la variabilidad genética de esta especie en Ecuador. Dentro de los resultados preliminares se observa una posible mutación en las secuencias estudiadas, lo cual puede constituir un nuevo haplotipo. Sin embargo, es necesario rediseñar una secuencia de primers específica para cóndor andino que permita el estudio de una región más amplia de la mitocondria para poder llegar a una conclusión más precisa.

**Palabras clave:** Cóndor andino, región control, mitocondria, *Vultur gryphus*, DNA, variabilidad genética.

**ABSTRACT**

The Andean condor is an important bird from the ecological, economic and cultural point of view for Latin American countries. It is listed as a species almost threatened by the IUCN, however, in recent years there has been a decline in the number of individuals due mainly to anthropogenic causes such as hunting or expansion of the livestock frontier. This reduction in the number of individuals is dangerous since genetic problems can develop in wild populations that endanger the species. To determine the degree of threat of a population at the genetic level, segments of mitochondrial DNA that are able to determine the phylogenetic relationships between individuals and between populations of a species have been used over the years. This study describes the preliminary results of the genetic study carried out on 30 Andean condors from Ecuador using molecular markers, where Domain II of the Control Region of the mitochondria was analyzed in order to verify the genetic variability of this species in Ecuador. Within the preliminary results, a possible mutation is observed in the studied sequences, which may constitute a new haplotype. However, it is necessary to redesign a sequence of primers specific for Andean condor that allows the study of a wider region of the mitochondria in order to reach a more precise conclusion

**Key words:** Andean Condor, control region, mitochondria, *Vultur gryphus*, DNA, Genetic variability.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>BASE CONCEPTUAL</b> .....	<b>12</b>
<b>ANÁLISIS CLÍNICO</b> .....	<b>16</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>22</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>23</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Registro e identificación de individuos muestreados .....	13
<b>Tabla 2.</b> Haplotipos identificados de cóndor andino ( <i>Vultur gryphus</i> ) registrados en GenBank .....	15
<b>Tabla 3.</b> Primers específicos de cóndor andino ( <i>Vultur gryphus</i> ) .....	15
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis preliminar con la primera combinación de primers específicos de cóndor andino (H1455+L798) .....	20

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Toma de muestras de la vena metatarsal media (Parque Cóndor – Imbabura) ..... 14

**Figura 2.** Extracción de sangre mediante una aguja mariposa 23G y jeringa de 10cc..... 14

**Figura 3.** Picos dobles e irregulares en el cromatograma de la muestra 1 de cóndor andino (*Vultur gryphus*) para la combinación L798+H1455 ..... 19

## INTRODUCCIÓN

El cóndor andino (*Vultur gryphus*) ha sido venerado por las comunidades nativas de América del Sur desde tiempos remotos (Lambertucci 2007, Ogada, Keesing y Virani 2011). Es considerado el ave rapaz más grande del mundo y su distribución abarca las regiones del oeste de Venezuela, pasando por Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, hasta Tierra de Fuego en Chile y Argentina (Naveda *et al.* 2016).

La especie está catalogada como casi amenazada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y aparece en el apéndice I del CITES. Sin embargo, desde el año 2000, se ha registrado una disminución del número de ejemplares de vida libre en países como Venezuela, Ecuador y Colombia (BirdLife International 2017). Según el último censo realizado en Ecuador (2015), se estima que en el país quedan entre 94 a 102 cóndores en vida libre (Naveda *et al.* 2016). Las principales causas que amenazan la supervivencia de la especie son la caza ilegal, pérdida de su hábitat debido a la expansión ganadera, competencia por alimento con otros animales, baja tasa de reproducción y el consumo de cebos envenenados (Patte *et al.* 2006, Lambertucci 2007, Navarrete 2012, Naveda *et al.* 2016).

El cóndor andino es considerado como una “especie focal”, por su amplia distribución y requerimientos de hábitat (Lambertucci 2007). Por ello puede ser utilizada para definir diferentes atributos espaciales y de composición que deben estar presentes en un paisaje para su apropiada gestión (Lambek 1997). Al habitar en los páramos andinos, la especie representa una prioridad para la conservación de este tipo de ecosistemas y puede ser aprovechado como “especie paraguas” para la conservación de otras especies de la zona (Roberge y Angelstam 2004).

Adicionalmente, el cóndor andino, pertenece a la familia de los buitres, por lo que desempeña una importante función ecológica y económica, al estar especialmente adaptado al consumo de carroña (Ogada, Keesing y Virani 2011). Dicha actividad trófica permite eliminar los restos de animales muertos del ecosistema, previniendo brotes de enfermedades bacterianas que podrían acumularse en los cuerpos en descomposición (DeVault *et al.* 2003). Sin embargo, desde el año 2011, 14 de las 23 especies de buitres (61%) de todo el mundo, han sido catalogadas con algún grado de amenaza (Ogada *et al.* 2011).

Uno de los problemas asociados a la disminución del número de ejemplares es la pérdida de su diversidad genética, tal y como se ha detectado en otras especies, como la grulla ferina (*Grus americana*), el ibis crestado (*Nipponia nippon*), o la paloma rosa (*Streptopelia mayeri*) (D'Elia *et al.* 2016). En este sentido, los estudios genéticos realizados hasta el momento en el cóndor andino en el Ecuador reflejan una baja variabilidad genética. Esto implica que la especie podría presentar alteraciones genéticas no deseadas por endogamia, así como una disminución e incluso pérdida de la frecuencia de alelos, lo que causaría una reducción en la viabilidad de los ejemplares en futuras generaciones (Hendrickson *et al.* 2003, Adams y Villablanca 2007). Sin embargo, esta información se basó en un estudio realizado en el año 2003 sobre una muestra de 6 individuos cautivos, lo que limita el conocimiento real de la variabilidad genética de la especie en la actualidad, por lo que es necesario recurrir a nuevas técnicas moleculares y realizar un muestreo más exhaustivo, con las que se pueda conocer el verdadero estado de conservación de la especie en Ecuador (D'Elia *et al.* 2016).

En este sentido, para conocer el estado de conservación de una especie, se ha popularizado el uso del ADN mitocondrial (mtDNA). Este permite determinar las relaciones filogenéticas entre los organismos gracias a su alta variabilidad (Awise *et al.* 1994, Hendrickson

*et al.* 2003, Agudo 2011, Roques *et al.* 2004, D'Elia *et al.* 2016). El genoma mitocondrial (haploide), heredado por vía materna, responde más rápidamente a la “deriva” genética que el genoma nuclear (diploide), ya que la tasa de mutación es hasta 10 veces más rápida que en los loci nucleares y no existe recombinación (Adams & Villablanca 2007, Cadahía *et al.* 2007).

En la mitocondria se describe una región control (RC) donde se localizan 3 dominios altamente variables. El dominio I posee mayor grado de variación, por lo que su estudio puede revelar información importante en los trabajos de genética poblacional (Wenink *et al.* 1994, Roques *et al.* 2004). Los dominios II y III, aun presentando menor grado de variación, también son regiones con una variabilidad genética suficiente para determinar conexiones entre poblaciones con amplia distribución geográfica o eventos demográficos que pudieron haber afectado a éstas especies en el pasado (Cadahía *et al.* 2007). El estudio de la RC en aves es interesante para abordar la estructura de la población, pero también para describir la organización y variación de toda la región en varios niveles taxonómicos (Roques *et al.* 2004). Por este motivo y para poder hacer una comparación con el trabajo de Hendrickson *et al.* (2003), se utilizaron los dominios II y III de la RC de la mitocondria, tal y como lo hicieron D'Elia *et al.* (2016) para el cóndor californiano.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad genética del cóndor andino en Ecuador en un número mayor de muestras procedentes de ejemplares tanto cautivos como de vida libre.

## BASE CONCEPTUAL

### Declaración ética

La captura, el muestreo y análisis de laboratorio de las muestras de cóndor andino fueron autorizadas por la autoridad ambiental del Ecuador bajo la Autorización de Investigación Científica N°016- 17 IC-FAU-DNB/MA (Anexo 1). El protocolo de contención, manejo y toma de muestras fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito mediante el Oficio 2017-02 (Anexo 2).

Entre los años 2013 y 2016 se tomaron muestras sanguíneas de 30 ejemplares de cóndores andinos. La fecha de muestreo, procedencia, edad, sexo y número de identificación de cada individuo aparecen reflejadas en la Tabla 1.

Para la captura, contención y toma de muestras de los ejemplares se siguieron los protocolos descritos por Wolter *et al.* (2014).

**Tabla 1. Registro e identificación de individuos muestreados**

No. De muestra	Fecha de muestreo	Procedencia	Estado	Edad Aprox*	Sexo	Identificación (microchip)
1	22/01/2015	Parque Cóndor	Cautivo	27	Macho	025 876 614
2	22/01/2015	Parque Cóndor	Cautivo	9	Hembra	037 788 328
3	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	40	Macho	098 012 358
4	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	16	Hembra	097 871 322
5	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	9	Hembra	097 880 288
6	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	14	Macho	098 007 811
7	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	19	Macho	097 883 568
8	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	13	Hembra	026 780 623
9	1/02/2015	Hda Zuleta	Cautivo	15	Macho	097 874 847
10	9/02/2015	Baños	Cautivo	35	Macho	026 811 888
11	9/02/2015	Baños	Cautivo	39	Macho	026 779 347
12	9/02/2015	Baños	Cautivo	45	Macho	112 869 247 A
13	18/03/2015	Ilitío	Cautivo	6	Hembra	026 054 856
14	18/03/2015	Ilitío	Cautivo	11	Macho	012 768 040
15	31/03/2015	Zoo Amaru	Cautivo	3-feb	Macho	981 098 104 310 847
16	13/04/2015	QuitoZOO	Cautivo	35	Macho	026 056 108
17	13/04/2015	QuitoZOO	Cautivo	>22	Hembra	094 123 612
18	13/04/2015	QuitoZOO	Cautivo	4.11	Macho	032 872 367
19	13/04/2015	QuitoZOO	Cautivo	2.9	Hembra	045 556 052
20	15/07/2013	Cuyuja	Vida	6 meses	Macho	900 182 000 866 833
21	9/05/2014	Parque Cóndor	Silvestre	2	Macho	091 098 104 308 488
22	16/06/2014	Baeza	Silvestre	1.5	Macho	981 098 104 311 177
23	20/11/2014	Antisana	Silvestre	1.5	Macho	981 098 104 310 741
24	6/11/2014	Hda Zuleta	Silvestre	5	Hembra	981 098 104 312 819
25	6/11/2014	Hda Zuleta	Silvestre	<2	Hembra	981 098 104 309 464
26	3/03/2015	Cotopaxi	Silvestre	5 - 6	Hembra	981 098 104 310 962
27	7/04/2015	Cotopaxi	Silvestre	>40	Macho	941 000 012 945 455
30	16/04/2015	Cotopaxi	Silvestre	2 años	Hembra	900 182 000 865 966
31	10/12/2015	Cotopaxi	Cautivo	2 años	Hembra	900 182 000 865 966
32	13/05/2016	Antisanilla	Silvestre	2 años	Hembra	900 182 000 865 966

\* La edad aproximada de los ejemplares se calculó en base al tiempo que los especímenes han permanecido en cautiverio y según la descripción de Donazar & Feijóo (2002).

Las muestras de sangre fueron recolectadas mediante venopunción de la vena metatarsal media (FAO 2007) (Figura 2). Para la extracción se utilizó una aguja mariposa 23G y una jeringa de 10cc (Figura 3). De cada espécimen se recolectaron 10ml de sangre que fueron colocados en tres tubos, 1ml de sangre en 2 tubos con EDTA (Hendrickson *et al.* 2003)

y 8ml de sangre en un tubo sin anticoagulante.

**Figura 1.** Toma de muestras de la vena metatarsal media (Parque Cóndor – Imbabura)



**Figura 2.** Extracción de sangre mediante una aguja mariposa 23G y jeringa de 10cc



Las muestras se mantuvieron en refrigeración durante el traslado hacia la Universidad de San Francisco de Quito, no excediendo en ningún caso el tiempo de transporte por encima de las 5 horas. Una vez identificadas, fueron almacenadas en la Escuela de Medicina Veterinaria en refrigeración a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Para la extracción del ADN se utilizó un equipo de extracción Qiagen DNeasy Kit (Qiagen, Inc., Valencia, California) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se utilizaron los marcadores moleculares y dominios recomendados por Hendrickson *et al.* (2003) (Tabla 2). Los *primers* fueron sintetizados en Invitrogen, EEUU.

**Tabla 2. Primers para cóndor andino (*Vultur gryphus*)**

Nombre del Primer	Secuencia del Primer	
L16652:	F*	5'-CGAAACACACCCCGAGAAAAAG-3'
H621	R*	5'-CGCGATCACGGACGAAAATGG-3'
L798	F*	5'-GCAGTTTGCTTCCATTCG-3'
H1455	R*	5'-GGCTGTGCAAGGTGTCTTG-3'

\*F = Forward; \*R= Reverse; L = Light strand; H = Heavy strand

Los dominios II y III de la RC de la mitocondria aparecen en Genbank con número de acceso AY129644.1 - AY129649.1 (Tabla 3).

**Tabla 3. Haplotipos identificados de cóndor andino (*Vultur gryphus*) registrados en GenBank**

Número de acceso	Definición	Pares de bases (bp)
AY129644.1	Vultur gryphus haplotype 1 mitochondrial D-loop, partial sequence	501
AY129645.1	Vultur gryphus haplotype 2 mitochondrial D-loop, partial sequence	501
AY129646.1	Vultur gryphus haplotype 3 mitochondrial D-loop, partial sequence	501
AY129647.2	Vultur gryphus haplotype 1 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	434
AY129648.2	Vultur gryphus haplotype 2 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	434
AY129649.1	Vultur gryphus haplotype 3 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product	434

Para la amplificación se siguió el protocolo modificado de Hendrickson *et al.* (2003) siguiendo las recomendaciones del fabricante de los primers (Invitrogen, EEUU): reacciones de 25  $\mu$ L por 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C para desnaturalización por 1 min, 53.3°C para alineamiento por 1 min y 72°C para extensión por 1 minuto. La extensión final fue 1 ciclo de 7 minutos a 72°C. Para el primer grupo de reacciones se usó una *taq* polimerasa simple y para el segundo grupo una *taq* platinum. Se utilizó un secuenciador MultiGene Labnet V3.3.4C modelo TC9600-G para correr las reacciones. Los productos del PCR se extrajeron de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (Promega, Inc., Madison Wisconsin). Las muestras se mantuvieron preservadas en congelación a -20°C antes de ser liofilizadas y enviadas al laboratorio de secuenciación.

Las secuencias fueron identificadas individualmente en tubos de PCR de 0.2ml y enviadas a Macrogen, Corea del Sur, donde fueron purificadas y secuenciadas de forma automática en ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Los resultados fueron remitidos por correo electrónico al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Se utilizó el software MEGA7 (Kumar *et al.* 1993) y Chromas Pro para la alineación manual de bases. El análisis de resultados y comparación de secuencias se realizó mediante el software GENEIOUS.

## ANÁLISIS CLÍNICO

Se consiguieron amplificar 23 de las 30 muestras analizadas para la primera combinación de *primers* (H1455+L798) correspondientes al dominio II de la mitocondria, identificándose una secuencia consenso de aproximadamente 400bp. Las 7 muestras restantes fueron descartadas del estudio ya que la concentración y calidad de ADN fueron

insuficientes para realizar una comparación entre haplotipos. En este sentido, se conoce que el ADN es susceptible de desnaturalizarse por motivos físicos, químicos o biológicos, por lo que la metodología de los estudios genéticos debe ser rigurosa (Purzycka *et al.* 2006). Además, Quinn & Wilson (1993) y Gibb *et al.* (2006) determinaron una alteración en el orden de los genes de las aves, lo que provoca que el genoma mitocondrial de estas sea extremadamente delicado. Por otro lado, Wandeler *et al.* (2007), indicaron que las muestras de DNA antiguas son altamente susceptibles de contaminación externa. Debido a ello, estudios previos realizados en cóndores (Hendrickson *et al.* 2003, D'Elia *et al.* 2016), utilizaron mayores tiempos de purificación con proteinasa K durante la extracción del DNA y extracciones dentro de cámara de flujo laminar previamente irradiada con luz UV, para evitar la contaminación del mtDNA. Sin embargo, durante el presente estudio, el protocolo recomendado por el fabricante del kit de extracción de ADN no se incorporaba dichas recomendaciones, pudiendo haber sido la razón por la que la calidad y cantidad de ADN extraído no fue óptima para 7 de las 30 muestras analizadas. Otras de las posibles mejoras a incorporar para mejorar la calidad y cantidad del ADN son: almacenarlo a  $-70^{\circ}\text{C}$  una vez extraído en lugar de conservar la sangre completa (Madisen *et al.* 1987), reducir la exposición a luz UV durante el traslado de las muestras de un laboratorio a otro, el uso de filtros en las puntas desechables y guantes a la medida del operador, evitar abrir constantemente las tapas de los tubos para PCR, descontaminar las superficies del laboratorio y autoclavar las pipetas y los *racks* que han de ser utilizados (Roux, 1995, McCord *et al.* 2008).

En este sentido, para poder mejorar la calidad de la secuenciación de las muestras se incorporó el uso de métodos de PCR de inicio en caliente (*hot start*); esto ayuda a reducir errores durante la amplificación de DNA debido a bajas temperaturas de alineamiento (*annealing*) tal y como indica Roux (1995). Concretamente, la *taq* platinum (Invitrogen, EEUU)

es una enzima de inicio en caliente que ha dado buenos resultados en comparación con otros fabricantes (Purzycka *et al.* 2006), mientras que con la *taq* polimerasa simple se obtuvo resultados de menor calidad, con bandas dobles y picos ilegibles en el cromatograma.

El dominio III amplificó 2 regiones de ADN desde la primera vez que se corrió el PCR. Las bandas obtenidas no corresponden a los resultados mencionados por Hendrickson *et al.* (2003) ya que en su estudio hace referencia a que se deberían obtener bandas de 434bp. Sin embargo, en el gel se obtuvieron para todas las muestras, 2 bandas que se ubicaban en 500 y 700bp respectivamente. Se realizó el PCR de las muestras y se extrajo el ADN de las bandas de forma individual para secuenciarlas por separado. Sin embargo, los resultados de esta parte del estudio están siendo analizados.

Durante nuestro análisis, las secuencias presentaron un *gap* 5'-CAA-CAA-3. Esto coincide con lo descrito en el trabajo realizado por Hendrickson *et al.* (2003) en el cóndor andino de Ecuador. Estudios previos detectaron que la RC, específicamente el *D-loop* de la mayoría de los vertebrados, presenta segmentos de ADN adicional, repeticiones en tándem que pueden medir desde cuatro a cientos de pares de bases dependiendo de la especie (Bentzen *et al.* 1998). Se han descrito variaciones de gran tamaño en la RC de varias especies de aves, como resultado de estas secuencias repetidas localizadas en el dominio I o el dominio III, en una gran variedad de taxones (Mjelle *et al.* 2008), como por ejemplo en la codorniz de virginia (*Colinus virginianus*) (Halley *et al.* 2015) o en la gaviota común (*Larus canus*) (Berg *et al.* 1995). El deslizamiento durante la replicación del ADN se ha propuesto como un mecanismo probable para la generación de polimorfismo de longitud, pero aún no está claro si esas repeticiones podrían aportar o no información relevante desde el punto de vista filogenético, aunque se menciona que son secuencias parecidas a las que aparecen en algunas enfermedades humanas relacionadas con la edad (Berg *et al.* 1995, Halley *et al.* 2015). Según

D'Elia *et al.* (2016) registraron estas repeticiones en tándem sólo en 1 de 93 ejemplares de cóndor californiano estudiados, sin embargo en nuestro estudio, el 100% de los ejemplares de los cóndores andinos presentan dicha característica. Este resultado coincide con el estudio de Hendrickson *et al.* (2003), y se comprueba que los cóndores andinos, a diferencia de los californianos, son heteroplásmicos. Se han dado varias explicaciones para este fenómeno, pero la mayoría incluye un deslizamiento de la cadena de errores en la secuenciación, que impiden una correcta alineación de los fragmentos ya que no son de la misma longitud en todas las muestras (Bentzen *et al.* 1998, Mjelle *et al.* 2008). Dichas secuencias repetidas fueron removidas del análisis final, al igual que en el trabajo de Hendrickson *et al.* (2003), ya que no aportan con información relevante para este estudio.

En el presente trabajo, los análisis individuales de las secuencias obtenidas se alinean con los 3 haplotipos encontrados por Hendrickson *et al.* (2003). Sin embargo, el análisis de todas las muestras pone de manifiesto que la amplificación de las secuencias inicia sólo pocas bases antes del lugar donde Hendrickson *et al.* (2003) describió las mutaciones de los haplotipos encontrados previamente. Esto no permite llegar a una conclusión certera del tipo de haplotipo hallado, ya que los cromatogramas muestran picos dobles e irregulares en los sitios de inicio y fin de la amplificación así como se observa en la Figura 3.

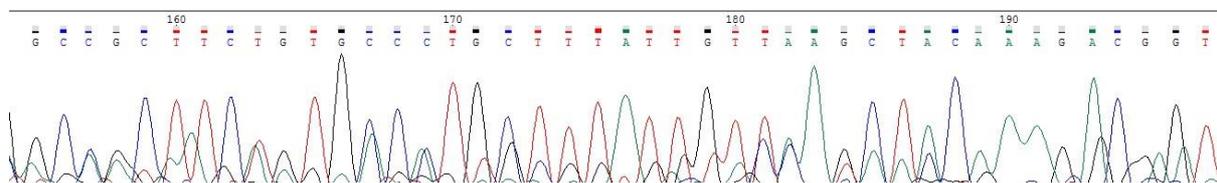


Figura 3. Picos dobles e irregulares en el cromatograma de la muestra 1 de cóndor andino (*Vultur gryphus*) para la combinación L798+H1455

Al alinear todas las muestras se observan algunas posibles mutaciones en la posición 79 hallados en el 34,78% de las muestras, en la 203, 204 y 205 en el 30,43% y finalmente, en la posición 211, 212 y 236 en el 26,08%. En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos y

los cambios en las bases. Se presume que puede ser un nuevo haplotipo hallado en los cóndores andinos del Ecuador.

**Tabla 4. Resultados del análisis preliminar con la primera combinación de *primers* específicos de cóndor andino (H1455+L798).**

MUESTRA	POSICIÓN						
	79	203	204	205	211	212	236
4	G	T	N	G	N	A	G
5							
6	N	N	N	G	A	A	G
7	N	T	T	G	N	A	G
8							
9							
10	G	N	N	G	A	A	G
13							
14							
15							
17							
18	N	T	T	G			
19							
20	G	T	T	G	N	A	G
23							
24							
26							
27							
28							
29	N						
30							
31	N	N	N	N	A	A	G
32							

Si bien existen estudios como el de Hendrickson *et al.* (2003) o Cadahía *et al.* (2007) que han demostrado una baja variabilidad genética para los cóndores, otro caso como el del halcón peregrino (*Falco peregrinus*) ha puesto de manifiesto que a pesar de que las poblaciones silvestres de rapaces disminuyan en número, no se observa pérdida de la diversidad genética (Wandeler *et al.* 2007). En este sentido, D'Elia *et al.* (2016) registra otros casos donde se ha reportado baja variabilidad genética para aves rapaces tales como el águila

imperial (*Aquila adalberti*), el pigargo oriental (*Haliaeetus leucogaster*), el águila perdicera (*Aquila fasciata*), o el buitre negro (*Aegypius monachus*), incluyendo el estudio previo del cóndor andino (*Vultur gryphus*) (Hendrickson *et al.* 2003). Sin embargo, ésta baja variabilidad genética no es una característica universal de las rapaces y sobre todo de aquellas que tienen un rango de distribución geográfico amplio (D'Elia *et al.* 2016). En contraste, los estudios que muestran una diversidad genética alta, han sido atribuidos a la longevidad que presentan las rapaces grandes y a la conservación de poblaciones geográficamente separadas pero que siguen dentro del rango de distribución de la especie (Nebel *et al.* 2015).

Para el caso del cóndor californiano, se lograron definir 5 haplotipos adicionales con sólo estudiar un fragmento más largo de mtDNA (D'Elia *et al.* 2016), por lo que una posible explicación a la baja variabilidad genética determinada por Hendrickson *et al.* (2003) para el cóndor andino, y posteriormente corroborada en el presente estudio, podría ser que la extensión de la cadena estudiada corresponde a un fragmento corto, que sólo incluye los dominios II y III de la RC. Por lo tanto, es probable que los *primers* descritos por Hendrickson *et al.* (2003) no fueron lo suficientemente amplios para corroborar los haplotipos descritos previamente ni para determinar nuevos haplotipos, ya que la amplificación iniciaba demasiado cerca de las mutaciones descritas en el GenBank. Por ello es necesario diseñar nuevos *primers* que permitan comparar de forma más completa toda la RC de la mitocondria.

Los resultados de D'Elia *et al.* (2016) reflejan la necesidad de hacer estudios más rigurosos y más extensos basados en secuencias de mtDNA para poder definir la variabilidad genética real de una especie, así como también asegurarse de tener una muestra representativa de la población. Además, los resultados previos de baja variabilidad genética del cóndor andino contrastan con su amplia distribución geográfica. Al realizar una comparación entre el caso del cóndor californiano y el cóndor andino, D'Elia *et al.* (2016)

menciona que los factores son muy similares en estas 2 especies, por lo tanto, su tamaño, su tasa metabólica y su tiempo de generación, son los que influyen en la evolución del mtDNA, y no debería existir una diferencia tan marcada como la reportada en ambos artículos, recordando que la población del cóndor californiano sufrió un cuello de botella mucho más grave que el cóndor andino, el cual registra poblaciones a nivel de la cordillera andina de al menos 10.000 individuos (Birdlife International 2017).

Todavía no podemos determinar que exista una especificidad genética en la zona ecuatorial, por lo que es necesario realizar más estudios que comprueben que esta especie está pasando por un cuello de botella genético. Los resultados preliminares coinciden con el hecho de que si existe una baja variabilidad genética para los cóndores andinos. Sin embargo, sólo nos hemos limitado a analizar los dominios II y III de la RC, lo cual aún no determina la veracidad de esta teoría.

## Conclusiones

- Es necesario mejorar las técnicas de conservación y análisis de las muestras para obtener una mejor calidad del ADN.
- Todos los individuos estudiados presentaron una secuencia repetitiva al final del dominio III, se obtuvo un 100% de individuos con heteroplasmia.
- Es necesario diseñar nuevos *primers* que permitan obtener un fragmento más extenso de la RC de la mitocondria.
- Es necesario realizar más estudios en lo posible con un mayor número de muestras, no solo de Ecuador, sino de toda el área de distribución geográfica histórica del cóndor andino, para determinar la variabilidad genética de la especie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M., & Villablanca, F. (2007). Consequences of a genetic Bottleneck in California Condors: A mitochondrial DNA perspective. *Biological Science Department*, 35-55.
- Agudo, R. (2011). Conservation genetics on islands: A case study of the Canarian Egyptian Vultur. *Trabajo previo a la obtención del título de Doctora en Biología*, 242.
- Avise, J., Nelson, W., & 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, 5173-5177.
- Bentzen, P. (1998). Tandem repeat polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial control region of redfishes (*Sebastes: Scorpaenidae*). *Journal of Heredity*, 89, 1–7.
- Berg, T., Moum, T., & Johansen, S. (1995). Variable numbers of simple tandem repeats make birds of the order Ciconiiformes heteroplasmic in their mitochondrial genomes. *Current Genetics*, 27(3), 257–262.
- BirdLife International (2017). *Vultur gryphus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22697641A117360971.
- Cadahía, L., Negro, J., & Urios, V. (2007). Low mitochondrial DNA diversity in the endangered Bonelli's Eagle (*Hieraetus fasciatus*) from SW Europe (Iberia) and NW Africa. *J Ornithol*, 148, 99-104.
- D'Elia, J., Haig, S. M., Mullins, T. D., & Miller, M. P. (2016). Ancient DNA reveals substantial genetic diversity in the California Condor (*Gymnogyps californianus*) prior to a population bottleneck. *The Condor*. 118(4):703-714.
- DeVault, T., Rhodes, O., Shivic, J. (2003). Scavenging by vertebrates: behavioral, ecological, and evolutionary perspectives on an important energy transfer pathway in terrestrial ecosystems. *Synthesising Ecology*. 102(2), 225–234.
- Donázar, J. & Feijóo, J. (2002). Social structure of andean condor roosts: influence of sex, age, and season. *The Condor* 104:832–837.
- FAO (2007). Vigilancia de la influenza aviar altamente patógena en las aves silvestres. Roma.

- Gibb, G., Kardailsky, O., Kimball, R., Braun, E., & Penny, D. (2006). Mitochondrial genomes and avian phylogeny: Complex characters and resolvability without explosive radiations. *Mol. Biol. Evol.*, 24(1), 269-280.
- Halley, Y., Oldeschulte, D., Bhattarai, E., Hill, J., Metz, R., Johnson, C. Presley, S., Ruzicka, R., Rollins, D., Peterson, M., Murphy, W., Seabury, C. (2015) Northern Bobwhite (*Colinus virginianus*) Mitochondrial Population Genomics Reveals Structure, Divergence, and Evidence for Heteroplasmy. *PLoS ONE* 10(12): e0144913.
- Hendrickson, S., Bleiweiss, R., Matheus, J. C., Silva, L., Jácome, N., & Pavez, E. (2003). Low genetic variability in the geographically widespread andean condor. *The Condor*, 105, 1-12.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (1993). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis. University Park, PA: Pennsylvania State University.
- Lambek, R. (1997). Focal Species: A Multi-Species Umbrella for Nature Conservation. *Conservation Biology*. 11(4), 849–856.
- Lambertucci, S. (2007). Biología y conservación del Cóndor Andino (*Vultur gryphus*) en Argentina. *El Hornero*, 022(02), 149-158.
- Madisen, L., Hoar, D., Holroyd, C., Crisp, M., Hodes, M., Reynolds, J. (1987). The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *American Journal of Medical Genetics*. 27(2), 379–390.
- McCord, B. Opel, K., Funes, M., Zoppis, S., Meadows, L. (2011). An investigation of the effect of DNA degradation and inhibition on PCR amplification of single source and mixed forensic samples. Departamento de Justicia de los EE.UU. Documento no publicado.
- Mjelle, K., Karlsen, B., Jorgensen, T., Moum, T., Johansen, S. (2008). Halibut mitochondrial genomes contain extensive heteroplasmic tandem repeat arrays involved in DNA recombination. *BMC Genomics*.
- Navarrete, J. (2012). Determinación de la relación de parentesco entre los cóndores (*Vultur gryphus*) en cautiverio en el Ecuador a través de microsatélites. *Tesis de licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia*.
- Naveda, A., Vargas, H., Kohn, S., & G, Z. (2016). Andean Condor (*Vultur gryphus*) in Ecuador: Geographic distribution, population size and extinction risk. *Plos One*, 11(3), 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0151827.

- Nebel, C., Gamauf, A., Haring, E., Segelbacher, G., Villers, A., Zachos, F. (2015). Mitochondrial DNA analysis reveals Holarctic homogeneity and a distinct Mediterranean lineage in the Golden eagle (*Aquila chrysaetos*). *Biological Journal of the Linnean Society*. 116(2), 328-340.
- Ogada, D., Keesing, F., & Virani, M. (2011). Dropping dead: causes and consequences of vulture population declines worldwide. *The New York Academy of Sciences*. 1249, 57-71.
- Patte, O., Carpenter, J., Fritts, S., Rattner, B., Wiemeyer, S., Royle, A., & Smith, M. (2006). Lead poisoning captive andean condors (*Vultur gryphus*). *Journal of wildlife Diseases*, 42(4), 772-779.
- Purzycka, J., Olewiecki, I., Soltyszewski, I., Pepinski, W., Janica, J. (2006). Efficiency comparison of seven different Taq polymerases used in hemogenetics. *International Congress Series*. 1288, 719 – 721.
- Quinn, T., Wilson, A. (1993). Sequence Evolution in and Around the Mitochondrial Control Region in Birds. *Journal of Molecular Evolution*. 37:417-425.
- Roberge, J., Angelstam, P. (2004). Usefulness of the Umbrella Species concept as a conservation tool. *Conservation Biology*. 18(1), 76-85.
- Roques, S., Godoy, J., Negro, J., Hiraldo, F. (2004). Organization and Variation of the Mitochondrial Control Region in Two Vulture Species, *Gypaetus barbatus* and *Neophron percnopterus*. *Journal of Heredity*, 95(4), 332–337.
- Roux, K. (1995). Optimization and Troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 4, 185-S194.
- Wenink, P., Baker, A., Tilanus, M. (1994). Mitochondrial control-region in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Mol Biol Evol*. 11:22–31.
- Wandeler, P., Hoeck, P., Keller, L. (2007). Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends Ecol Evol*. 22(12):634-42
- Wolter, K., Naser, W. & Hirschauer, M. (2014). *Protocols for mass capturing, handling, and fitting tracking devices on vultures*. Retrieved from: [http://www.vulpro.com/publications/Protocols\\_for\\_mass\\_capturing\\_handling\\_and\\_fitting\\_tracking\\_devices\\_on\\_vultures\\_v1.1.pdf](http://www.vulpro.com/publications/Protocols_for_mass_capturing_handling_and_fitting_tracking_devices_on_vultures_v1.1.pdf) el 10 de Diciembre del 2017. Google Scholar.

**Anexo 1: Permiso del Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito (PDF)**

Quito, 15 de marzo de 2017

OFICIO: 2017-02

Srta. Shady Heredia  
Estudiante de 6º año de la Carrera de Medicina Veterinaria  
Prof. Eduardo Díaz  
Director de Trabajo de Titulación  
Prof. Andrés Ortega  
Escuela de Medicina Veterinaria  
USFQ  
Presente.-

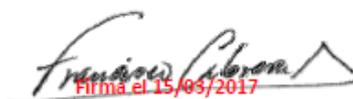
Estimados investigadores:

Por medio de la presente, tengo a bien informarle que se ha procedido a la evaluación de su proyecto de investigación titulado "Determinación de la variabilidad genética entre los cóndores andinos (*Vultur gryphus*) del Ecuador mediante el uso de marcadores moleculares DNAm", el cual será el Trabajo de titulación para obtener el título de Médico Veterinario de la Srta. Shady Heredia y después de evaluar el caso en relación con el cumplimiento de las Normas de Bienestar Animal y de las recomendaciones de Reemplazo, Reducción y Refinamiento en la investigación con animales, propuestas por Russell y Burch (1959), tomando en cuenta que este trabajo se realizará amparado por un permiso marco del Ministerio de Ambiente del Ecuador y que la parte del proyecto bajo la responsabilidad de la estudiante se realizará a partir de un repositorio de muestras biológicas, se ha decidido APROBAR el mencionado proyecto de manera EXPEDITA.

Así mismo, se le informa que este aval cubre únicamente los aspectos relacionados con el respeto a los principios y normativas vigentes acerca del bienestar animal en la investigación y docencia, tal como se redactaron en el protocolo aprobado. Si usted incumple o cambia sin previo aviso cualquier aspecto de su diseño experimental de manera que afecte las Normas y Recomendaciones arriba mencionadas, el aval se considerará nulo. Otros cambios en el diseño metodológico no anulan este aval por no corresponder a las competencias de este comité.

Sin otro particular al cual hacer referencia, y deseándole todo el éxito posible, me despido,

Atentamente,



Firma el 15/03/2017

Francisco Cabrera  
Presidente

**Anexo 2: Contrato MARCO de acceso a los recursos genéticos del Proyecto de Investigación científica denominado: "Investigación y monitoreo ecológico del Cóndor Andino en Ecuador" (PDF)**



**CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: "INVESTIGACIÓN Y MONITOREO ECOLÓGICO DEL CÓNDOR ANDINO EN ECUADOR" CELEBRADO ENTRE EL ESTADO ECUATORIANO, A TRAVÉS DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE; Y EL DOCTOR FÉLIX HERNÁN VARGAS CASTILLO.**

MAE – DNB – CM – 2015 – 0010



**COMPARECIENTES**

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos comparecen, por una parte el Estado ecuatoriano, a través del Ministerio del Ambiente, legalmente representado por la Magíster Lorena Tapia Núñez en su calidad de Ministra, designada mediante Decreto Ejecutivo No. 1365 de 28 de noviembre de 2012, publicado en el Registro Oficial N° 851 del 14 de diciembre de 2012, a quien en adelante se le denominará el "MAE"; y, por otra parte, el Doctor Félix Hernán Vargas Castillo, a quien en adelante se le denominará el "INVESTIGADOR";

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del proyecto de investigación científica denominado "Investigación y monitoreo ecológico del cóndor andino en Ecuador", contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

**PRIMERA. ANTECEDENTES.-**

1. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 3, en su numeral 7 dispone que entre uno de los deberes primordiales del Estado se encuentra la protección del patrimonio natural y cultural del país;
2. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 14 reconoce: "el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. [...] declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.";
3. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 25 establece que: "Las personas tienen derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico y de los saberes ancestrales.";
4. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 83, en sus numerales 6 y 13 declara que son deberes y responsabilidades de las ecuatorianas y los ecuatorianos, entre otros: "6.- Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible [...]; 13.- Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos.";
5. La Constitución de la República del Ecuador, en el artículo 313 establece que: "El Estado se reserva el derecho de administrar, regular, controlar y gestionar los sectores estratégicos, de conformidad con los principios de sostenibilidad ambiental, precaución, prevención y eficiencia."; y se considera además a la

RG / CT / FP / DB / WR / DR / VL / LN



Calle Madrid 1159 y Andalucía Código Postal: 170517 / Quito – Ecuador. Teléfono: 593-2 398-7600

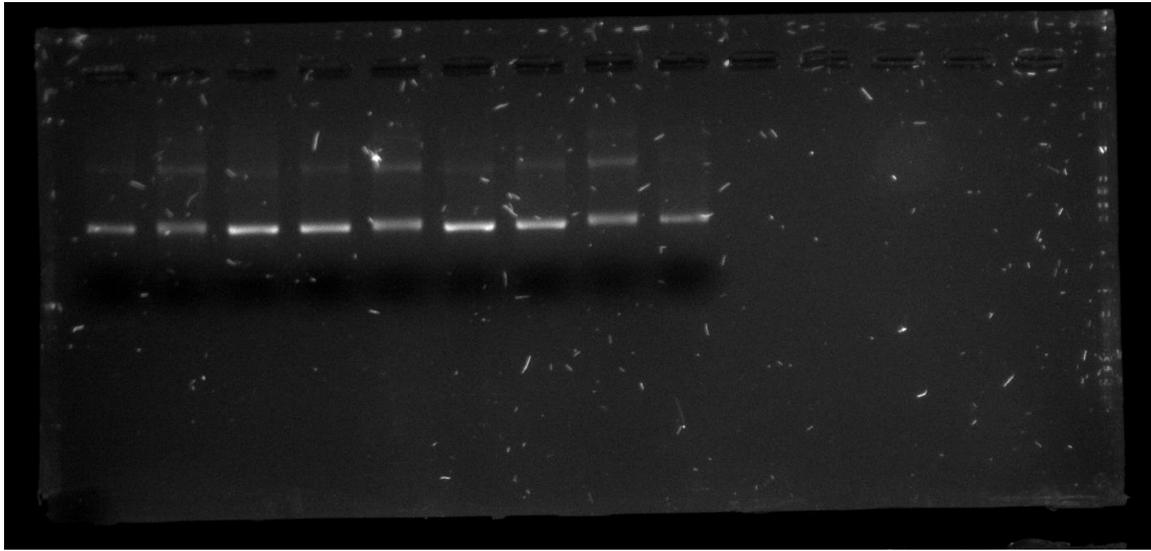
**Anexo 3: Contención física de un ejemplar hembra de cóndor andino (*Vultur gruphus*) en la Hacienda Zuleta (Imbabura)**



**Anexo 4: Examen físico completo de un ejemplar juvenil de cóndor andino en la Hacienda Zuleta (Imbabura)**



**Anexo 5. Gel de electroforesis de PCR utilizando la primera combinación de primers específicos (L798+H1455)**



**Anexo 6. Gel de electroforesis de la segunda combinación específica de primers (H16652+L621) donde se muestra dobles bandas debido a heteroplasmia de los individuos**

