

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Identificación molecular de las especies de aves atropelladas en
San Cristóbal Galápagos**

Aileen Madeline Bajaña Álvarez

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de Diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Identificación molecular de las especies de aves atropelladas en San
Cristóbal Galápagos**

Aileen Madeline Bajaña Álvarez

Nombre del profesor, Título académico

Juan José Guadalupe, MSc.

Quito, 18 de Diciembre de 2024

© 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.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Aileen Madeline Bajaan Álvarez

Código: 00216959

Cédula de identidad: 0925766842

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Poco se conoce sobre las tasas de atropellamiento de aves dentro de las islas Galápagos, especialmente en San Cristóbal, para las cuales no se han realizado estudios previos. El estado de los pinzones de Galápagos es de particular preocupación debido a su condición endémica en las islas, pero es complicado conocer las tasas de colisión precisas debido al gran porcentaje de especímenes no identificados en los pocos estudios que se han realizado. A partir de esta problemática, el siguiente estudio tuvo como objetivo identificar aves atropelladas imposibles de reconocer por su morfología, mediante el uso de múltiples marcadores moleculares. A través del uso de los marcadores Citocromo oxidasa I (COI) y Citocromo B (CytB), se determinó las familias y especies de las aves que fueron identificadas como pinzones. A partir de estos resultados, se logró obtener una gran variedad de especies de aves parte de la familia Thraupidae, conformado de un grupo de nueve aves. Además de esto, también se observó un grupo de la familia Parulidae, siendo estas muestras de *Setophaga petechia*. Dado que se lograron identificar especies de pinzones que no se han encontrado en estudios previos, esto corrobora la eficiencia de usar marcadores como CytB. Esto abre la posibilidad de emplear este proceso a mayor escala para lograr determinar tasas de atropellamiento más precisas.

Palabras clave: Aves atropelladas, pinzones, Galápagos, marcadores moleculares, CytB, COI, San Cristóbal

ABSTRACT

Little is known about bird collision rates within the Galapagos Islands, especially on San Cristobal, for which no previous studies have been conducted. The status of the Galapagos finches is of particular concern due to their endemic condition on the islands, but it is difficult to know the precise collision rates due to the large percentage of unidentified specimens in the few studies that have been conducted. Based on this problem, the following study aimed to identify roadkill birds that are impossible to recognize by their morphology, through the use of multiple molecular markers. Through the use of the markers Cytochrome oxidase I (COI) and Cytochrome B (CytB), the families and species of the birds that were identified as finches were determined. From these results, a wide variety of bird species from the Thraupidae family were obtained, made up of a group of nine birds. In addition to this, a group of the Parulidae family was also observed, these samples being *Setophaga petechia*. Since finch species that have not been found in previous studies were identified, this corroborates the efficiency of using markers such as CytB. This opens the possibility of using this process on a larger scale to determine more precise roadkill rates.

Keywords: Roadkill, finches, Galapagos, molecular markers, CytB, COI, San Cristobal

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---------------------------------|----|
| Introducción..... | 11 |
| Métodos..... | 15 |
| Resultados..... | 18 |
| Discusión | 20 |
| Conclusiones..... | 24 |
| Tablas..... | 25 |
| Figuras..... | 30 |
| Referencias bibliográficas..... | 31 |
| Anexos | 37 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1 – Concentración Del ADN Obtenido Junto Con Los Índices De Calidad De Las 13 Muestras De Aves Desconocidas..... | 25 |
| TABLA 2 – Resultados De La Identificación De Blast De Las Secuencias De La Región COI | 26 |
| TABLA 3 – Resultados De La Identificación De Blast De Las Secuencias De La Región Cytb | 27 |
| TABLA 4 – Número De Snps Entre Las Secuencias Desconocidas Y Las Secuencias De Referencia Del NCBI..... | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1– Diagrama De Pastel De Las 13 Especies De Aves Atropelladas Que Fueron Identificadas..... | 30 |
|--|----|

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: conteo de snps.....37

INTRODUCCIÓN

Una carretera que atraviesa cualquier tipo de entorno natural puede presentar una amenaza para la vida silvestre en cualquier parte del mundo. Las carreteras representan múltiples consecuencias, entre ellos la pérdida de hábitat, la contaminación acústica, las barreras ecológicas creadas por el hombre y la mortalidad por atropellos (Morelli, Rodríguez, Benedetti y Delgado, 2020). Además, las carreteras pueden presentar una amenaza tanto para las especies comunes como aquellas consideradas en peligro de extinción (Grilo et al., 2020). Los principales factores que pueden influir en las tasas de atropellos van desde la modalidad de alimentación y la dieta de las especies, hasta su preferencia de hábitats o su tamaño (Rendall et al., 2021). Además, se ha determinado que las aves son las especies más afectadas por las colisiones de vehículos, mostrando tasas de atropellos más altas en especies generalistas con corta esperanza de vida y edades de madurez tempranas. Las expectativas de vida cortas se han relacionado con la falta de experiencia de las especies y el tiempo limitado para aprender habilidades en entornos peligrosos. Así mismo, las especies generalistas con una dieta y una gran amplitud de hábitat, también presentan altas tasas de atropellos. Esto se debe probablemente a que los generalistas visitan una mayor variedad de entornos y no se muestran reacios a acercarse a las carreteras en busca de alimentos (Medrano-Vizcaíno et al., 2022).

Se han realizado varios estudios sobre colisiones entre vehículos y fauna silvestre en diferentes países. La mayoría de ellos se centran en los atropellos en general, contando tanto a los mamíferos como a las aves como víctimas habituales en este tipo de incidentes. Un ejemplo de este tipo de estudio fue uno realizado en el Serengeti en 200 km de redes de carreteras donde se recuperaron cadáveres de fauna silvestre. Se observó que las aves representaban el 60% de las especies más frecuentemente asesinadas, y los mamíferos correspondían a un 39,2% (Lyamuya et al., 2021). Para América Latina, un estudio sobre atropellos recopiló

publicaciones y disertaciones sobre atropellos en doce países, incluido Ecuador, entre 1994 y 2020. Los datos de cada estudio permitieron concluir que se encuentra una mayor tasa de atropellos en el caso de aves grandes y mamíferos de tamaño mediano. Finalmente, en Ecuador se realizó un estudio sistemático en 2022 con registros de las 24 provincias, que arrojó unas tasas estimadas de atropellos de 420.861 aves y 119.599 mamíferos afectados por colisiones de vehículos cada año (Medrano-Vizcaíno et al., 2022). En la mayoría de estos estudios, se puede observar una tendencia recurrente: las aves son los animales más afectados. Aunque se han recopilado datos relacionados con los atropellos en Ecuador, existe una visión limitada de las tasas de atropellos en las Islas Galápagos. El archipiélago alberga una gran variedad de especies de aves, con 178 especies registradas y 56 de ellas siendo endémicas (Bollmer y Nims, 2017). Sin embargo, solo existen dos estudios sistemáticos en Galápagos sobre la mortalidad en carreteras. Una investigación centrada solo en lagartijas de lava, *Microlophus albemarlensis*, dentro de la isla de Santa Cruz (Tanner & Perry, 2007) mientras que otra consistió en la recuperación de cadáveres de múltiples especies de aves a lo largo de un mes en Santa Cruz (García-Carrasco, Tapia y Muñoz, 2020). Esto muestra una falta de información sobre otras islas pobladas y datos específicos sobre mortalidad de aves.

Un obstáculo clave en los estudios de atropellos es la identificación precisa de las especies, ya que la identificación errónea puede llevar a un sobre o subregistro de las tasas de mortalidad. Esto se puede identificar en el estudio antes mencionado de García-Carrasco, Tapia y Muñoz (2020), donde el 9,52 % de las muestras fueron identificadas como "pinzones desconocidos". Aunque las identificaciones basadas en la morfología son posibles cuando el cuerpo del ave está completo e intacto, este método también resulta ineficiente cuando el cuerpo se ha deteriorado y ha perdido sus rasgos característicos.

En estas situaciones, la identificación molecular podría ser una herramienta que pueda proporcionar resultados precisos (Speller, Nicholas y Yang, 2011). Específicamente, el

barcoding de ADN podría ser una solución viable para este problema, ya que emplea una o varias secuencias de regiones genéticas estandarizadas cortas para identificar una determinada especie (Antil et al., 2022).

Se ha observado que el genoma mitocondrial tiene una correlación con las tasas de especiación. Esto sugiere un vínculo entre las tasas evolutivas y la diversificación a través de la especiación lo cual presenta a los marcadores mitocondriales como candidatos ideales para el barcoding (Eo y DeWoody, 2010). De ahí el uso del gen del citocromo oxidasa I (COI), así como del gen del citocromo B (cytB), ambos validados para la identificación de especies en una variedad de taxones Tobe, Kitchener y Linacre, 2010). El gen COI ha demostrado ser una herramienta eficaz para identificar con precisión las especies de aves y se utiliza ampliamente como gen de código de barras (Astuti y Rachmatika, 2019). La región parcial de 648 pb tiene una alta variación interespecífica así como una baja variación intraespecífica (Saitoh et al., 2014). Esto significa que esta región tiene una alta variación entre diferentes especies mientras que presenta una baja variación dentro de individuos de la misma especie (Gownaris & Wetzel, 2024). El desempeño de esta región ha sido evaluado en múltiples regiones de América Latina como Brasil para estudiar especies de aves sin datos previos (Chaves et al., 2014), Argentina para el análisis de divergencia de barcodes en especies de aves nativas (K. C. R. Kerr et al., 2009) e incluso para determinar con qué precisión los marcadores COI identificarían las especies de aves que componen la avifauna chilena (Colihueque et al., 2021; Kerr et al., 2009). Otra región que se puede emplear es CytB, cuyo locus muestra suficiente variación para distinguir especies, pero niveles relativamente bajos de variación intraespecie (Speller, Nicholas y Yang, 2011). CytB también ha demostrado ser una herramienta eficiente con alto poder de discriminación para la identificación de especies, como mamíferos y passeriformes, y su caracterización tanto en taxonomía como en la ciencia forense (Awad, Khalil y Abd-Elhakim, 2015; Dinh et al., 2019). Además, esta región ha sido la fuente más fácilmente disponible de datos de secuencias

en múltiples estudios con aves para determinar diversidad genética (Astuti y Rachmatika, 2019; Lei et al., 2010). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue la identificación molecular de trece aves atropelladas, irreconocibles morfológicamente, provenientes de San Cristóbal-Galápagos. Mediante el uso de primers específicos para distinguir entre especies de aves, con especial énfasis en la identificación de pinzones a nivel de especie.

MÉTODOS

Área de estudio y recolección de muestras

En el 2019 se recolectaron muestras de la Isla San Cristóbal - Galápagos en un tramo de aproximadamente 15 km, desde el área urbana de Puerto Baquerizo Moreno a la playa de Puerto Chino. El proceso consistió en recolectar aves en dos días. El primero se cubrió la mitad de la carretera y el segundo el resto del trayecto. Este proceso se repitió la siguiente semana y 6 meses después de la colecta inicial. Todas las aves recolectadas se preservaron en etanol al 90% y a una temperatura de -4 °C. Para esta investigación se tomó un sub-set de 13 muestras de dicha colección del 2019, que pertenecían a individuos no reconocibles morfológicamente.

Extracción de ADN, evaluación de concentración y calidad

Para la extracción de ADN, se cortaron y pesaron 25 miligramos de tejido, este material fue procesado usando el kit “DNeasy Blood and Tissue – DNA Purification” de QIAGEN según las instrucciones del fabricante. Una vez culminada la extracción, se empleó el equipo Nanodrop One para determinar la concentración y los índices de calidad del ADN extraído. Se diluyó las muestras a 20ng/μL para el procesamiento posterior. Adicionalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para determinar la integridad del material genético extraído.

Amplificación por PCR

Para el caso de la identificación de las familias, lo que primero se llevó a cabo fue la amplificación de la región COI. Para la PCR se utilizó un volumen total de 25 μL por reacción. Se empleó 20 ng/μL de ADN extraído, Buffer a 1X, MgCl₂ a 1.5 mM, Taq polimerasa a 1 U/μl, dNTPs a 0.2 mM y 0.5 μL de cada primer. En la reacción se emplearon los primers universales PasserF1 y PasserR1 (Lohman, Prawiradilaga, & Meier, 2008) que permiten

discernir las muestras pertenecientes al orden Passeriformes al igual que permiten distinguir las familias dentro de este orden. Las amplificaciones se llevaron a cabo por medio del siguiente protocolo de termociclado: denaturación inicial a 94 °C por 2 minutos, denaturación a 94 °C por 30 segundos, annealing a 53 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 5 minutos. Luego de esto se continuó con el uso de primers específicos para CytB, diseñados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal para determinar con la mayor exactitud la especie, o el género, de los pinzones presentes. Para la amplificación de este fragmento se utilizaron las mismas concentraciones finales de PCR y el protocolo de termociclado que se usó para la amplificación de la región COI. Los resultados de ambas amplificaciones luego pasaron a ser evaluadas en gel de agarosa al 1.5%, se incluyó el uso de un control negativo, sin ADN, y uno positivo, con ADN proveniente de una muestra conocida de *Geospiza* sp.

Secuenciación, procesamiento de lecturas e identificación

Una vez obtenidos los amplicones para la región COI estos fueron secuenciados con la tecnología Sanger en MacroGen. Para las muestras que fueron identificadas como pinzones después de este proceso, se prosiguió con la amplificación de la región CytB y su posterior secuenciamiento con la misma tecnología. Con las secuencias obtenidas se realizaron los cortes de las secuencias de mala calidad, seguido de la identificación de bases homólogas, obtención de secuencias consenso y corrección manual de bases de baja calidad en el programa Geneious 2023.2. Seguido de esto se llevó a cabo el alineamiento en el programa MEGA 11 (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021) de las secuencias consenso. También, a partir de estas secuencias, tanto de los amplicones COI como para los amplicones CytB, se realizó un BLASTn con la base de datos core_nt, para determinar la posible identificación. Aquí se obtuvo la especie, el query cover, y el porcentaje de identidad al comparar las secuencias consenso con las secuencias en esta base de datos. Adicional a esto, para las secuencias de CytB se corroboró la

identificación de especie, al alinearlas en el programa MEGA 11 (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021) con secuencias descargadas del NCBI y de de investigaciones previas del laboratorio de Biotecnología Vegetal , verificando el número de SNPs entre estas como se puede observar en el Anexo 1.

RESULTADOS

Extracción de ADN

La **Tabla 1** muestra las calidades y concentraciones de ADN de las trece muestras. Los índices de calidad de las muestras en 260/230 variaron desde 1.81 hasta 2.16 mientras que en el caso de 260/280 estas mostraron valores de 0.55 hasta 2.17.

Identificación molecular

La **Tabla 2** muestra los resultados de BLAST de las 13 muestras empleadas en la investigación en los cuales se incluyó el porcentaje de cobertura de query y el porcentaje de identidad, los cuales variaron de 96 a 100% y 96.63 a 99.84 respectivamente. Por medio del uso de BLAST se supo que, de las trece muestras, nueve fueron identificadas como parte de la familia Thraupidae, como la especie *Geospiza fortis*, mientras que las restantes cuatro muestras fueron reconocidas como parte de la familia Parulidae, como la especie *Setophaga petechia*.

La **Tabla 3** presenta los resultados obtenidos de la secuenciación de la región CytB. En el caso del porcentaje de cobertura de query, los amplicones se encontraron en un rango de entre 95% al 100%. Así mismo para el porcentaje de identidad, los amplicones mostraron resultados de 98.69 hasta 100.00. Específicamente se encontró un espécimen de *Certhidea fusca*, un espécimen de *Geospiza fortis*, dos *Geospiza magnirostris*, un espécimen de *Geospiza difficilis*, un espécimen de *Camarymchus parvulus*, y un espécimen de *Geospiza scandens*.

Conteo de SNPs

En la **Tabla 4** lo que se observa es el número de SNPs diferentes entre las secuencias de la región CytB de las muestras desconocidas al compararlas con secuencias disponibles en el NCBI. Esto se realizó como un análisis adicional para corroborar la posible especie de pinzón identificada, particularmente en una muestra que presentó dos posibles identificaciones (JO41). En la comparación de las muestras, se observaron un mínimo de 0 SNPs (PPB-2001 para

Geospiza magnirostris) y un máximo de 5 SNPs (PPB-2001 para *Geospiza scandens*). El resto de los amplicones presentaron de entre un solo SNP (CC5010 para *Geospiza fortis*, CO31 para *Geospiza magnirostris*, LK06 y LK01 para *Camarhynchus parvulus*) y tres SNPs (JO10 para *Certhidea fusca*, CO42-38 para *Geospiza difficilis*). En el caso de la muestra JO41 se realizó el conteo de SNPs para *Geospiza difficilis* y *Geospiza magnirostris*, presentando respectivamente dos SNPs y un SNP. Un ejemplo del alineamiento y comparación de SNPs se puede observar en el **Anexo A** con la muestra CO31.

En la **Figura 1** lo que se observa es una representación gráfica de la identidad de las 13 muestras analizadas de aves atropelladas. Entre estas se logra observar que se presentan más especies de la familia Thraupidae, representando un 69% del total mientras que Parulidae abarcó el 31% de la muestra. Dentro del porcentaje que conformaban estas aves, las que estuvieron en mayor número fueron *Setophaga petechia*, *Camarhynchus parvulus* y *Geospiza magnirostris*. Por otro lado, las que se observaron en menor número de toda la muestra fueron *Certhidea fusca*, *Geospiza scandens*, y *Geospiza fortis* cada una representando un 8% de la muestra.

DISCUSIÓN

Concentración Y Calidad Del ADN

Lo que se puede observar en la **Tabla 1** es el análisis de la concentración y calidad del ADN de las muestras de tejido que se pudieron obtener de las trece aves. En el caso de la relación de absorbancia a 260 y 280 nm, una relación de $\sim 1,8$ se acepta generalmente como “puro” para el ADN. Si la relación es menor ($\leq 1,6$), puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes (Lucena-Aguilar et al., 2016). De las trece muestras, cinco estaban dentro de este rango de ADN puro. En el caso de 260/230, los valores para el ADN puro están comúnmente dentro del rango entre 2,0 y 2,2. Una relación menor puede indicar la presencia de contaminantes como proteínas, lípidos, sales, etc. (Lucena-Aguilar et al., 2016). En este caso, dos muestras cayeron en este rango de ADN “puro”. Teniendo en cuenta el estado de descomposición en el que se encontraban la mayoría de las muestras, es razonable que existieran estos niveles de contaminación. Aparte de eso, la mayoría de las muestras arrojaron niveles apreciables de contenido de ADN, que resultaron suficientes para el posterior análisis de PCR que necesitaba un mínimo de 20 ng/ μ l. De igual forma, la baja calidad en algunas muestras no evitó su correcta amplificación.

Análisis De Secuencias E Identificación De Especies

En la **Tabla 2**, el principal resultado es que una parte importante de la muestra está compuesta por aves pertenecientes a *Geospiza fortis*, según la identificación obtenida de la región COI. Seguido de que la especie más prevalente es *Setophaga petechia*. Este subconjunto sigue la tendencia de estudios previos que encontraron a *G. fortis* identificada morfológicamente como la especie más afectada por colisiones de vehículos en Santa Cruz (García-Carrasco et al., 2020), aunque de lo que se observará más adelante en la **Tabla 3** es evidente que el primer Passer no fue tan preciso en la identificación de los pinzones.

Teniendo en cuenta que solo una pequeña fracción del genoma está fuertemente diferenciada entre las especies de pinzones terrestres de *Geospiza*, se podría explicar los resultados inmediatos encontrados con estos conjuntos de cebadores (Tomkins, 2024). Además, se ha demostrado que el ADN mitocondrial de los pinzones ha experimentado una diversificación limitada, en parte debido a la hibridación introgresiva (Rands et al., 2013). Aunque la región COI es una opción frecuente para la identificación de múltiples taxones, se ha demostrado que es insuficiente para otras especies además de aves, por ejemplo para la identificación de especies de caballitos de mar y peces pipa (Serite et al., 2021). En el caso de los mamíferos, se ha demostrado que el COI tiene una gran tasa de falsos positivos (Tobe, Kitchener y Linacre, 2010). Esto demuestra que, en ciertos taxones, el gen COI parece ser una región muy conservada dentro del genoma mitocondrial, lo que lo hace adecuado principalmente para el barcoding de ADN (Wang, Liu, Song, Su y Chen, 2018), pero puede ser insuficiente para la identificación de especies estrechamente relacionadas, como los pinzones.

En la **Tabla 3**, lo que se puede observar más a fondo a través de la amplificación de la región CytB fue la variedad de pinzones que conformaban los nueve individuos identificados inicialmente como *Geospiza fortis*. En primer lugar, estos resultados tienen mucho más peso considerando que varios tenían porcentajes de identidad de 100, siendo este el caso de seis de las nueve muestras. Tobe, Kitchener y Linacre (2010) mencionan que, tanto para COI como para CytB, cuando las coincidencias de identidad son inferiores al 100 %, puede deberse a una variación intraespecífica. Lo que viene a decir que estos resultados podrían deberse a que la región COI es una región muy conservada para los pinzones, de ahí que tenga un alto porcentaje de identidad, pero al ver que CytB tiene resultados de identidad múltiples de 100.00%, esta región ofrece un mucho mejor resultado para la posible identidad de la muestra. En cuanto a la eficiencia de CytB, se ha descubierto que esta región es más adecuada para la diferenciación de especies, pudiendo separar mejor a especies congénicas

estrechamente relacionadas en el caso de los mamíferos (Tobe, Kitchener y Linacre, 2010). También se ha observado una mayor variación de secuencia y diversidad de nucleótidos que en el COI en el estudio de la diversidad de mtADN para el miná de alas negras, *A. melanopterus* (Astuti y Rachmatika, 2019). Estos resultados se confirmaron aún más como se ve en la **Tabla 4**. Donde la cantidad de SNPs es pequeña, oscilando entre 0 y 5 SNP. Esto solo demuestra aún más la precisión de los resultados mostrados a través del uso de esta región, dando más confianza a la identificación de especies obtenida con el marcador CytB. A través de este proceso se puede sugerir que la posible especie para la muestra JO41 es *Geospiza magnirostris*, al presentar menos diferencias con secuencias de la base de datos empleada.

Factores De Mortalidad

En cuanto a la mortalidad de las especies encontradas en los ejemplares analizados, Jiménez-Uzcátegui et al. (2024) menciona que se ha observado una mayor mortalidad por atropellos en especies de aves pequeñas y de bajo peso (entre 7 y 40 g), siendo la mayoría de estas nativas de la isla. Estas características sí encajan con el subconjunto, donde la mayoría de los pinzones tienen una masa corporal entre 9.5 g a 33.75 y *S. petechia* fue una masa corporal de ~10 g (Avibase, 2024). Sin embargo, se necesitaría una muestra de estudio más grande para determinar con más detalle estos patrones para las aves atropelladas y poder sacar conclusiones más certeras sobre la mortalidad de estas especies.

Importancia De Los Marcadores Moleculares Para Pinzones

Los pinzones de Darwin son un grupo único de aves que han contribuido significativamente a múltiples áreas de estudio de la evolución y la genómica, pero aún existe un conocimiento limitado, como es el caso de la identificación correcta de estas especies (Dobrevá et al., 2021). Tradicionalmente, la taxonomía de los pinzones se ha definido de acuerdo con la morfología de las aves, pero el orden de ramificación de varios taxones recientemente

divergentes no está resuelto y el análisis genético de la filogenia es limitado (Lamichhaney et al., 2015). Además de esto, es posible una identificación morfológica incorrecta; en el estudio de Dobрева et al. (2021), el análisis de PCR reveló que, para las aves con rasgos específicos del sexo marginales, la determinación del sexo en el campo produjo una tasa de error del 13%. En el caso específico de los seguimientos de animales atropellados, García-Carrasco et al., (2020) informaron tener 16 muestras clasificadas como "pinzón desconocido", lo que representa el 40% de la muestra de pinzones obtenida para el estudio. Esto también fue observado por Jiménez-Uzcátegui et al. (2024) en el que 70 individuos fueron clasificados como "pinzón desconocido", lo que representa el 25% de la muestra de pinzones. Además, una identificación molecular de estos pinzones debe ser lo más precisa posible para las especies, ya que según (Zink y Vázquez-Miranda, 2018) la hibridación y la introgresión son comunes entre especies dentro de *Geospiza spp.* y *Camarhynchus spp.*, lo que dificulta su distinción.

Importancia Del Estudio

Pocos estudios han descrito la magnitud de los atropellos de aves en las Islas Galápagos, especialmente en el caso de San Cristóbal, de ahí la importancia de este estudio (García-Carrasco et al., 2020). Esto significa que se sabe poco sobre la tasa real de atropellos de todas varias especies endémicas de las islas. Además, a través del monitoreo de los atropellos de fauna silvestre, e sería posible ampliar el conocimiento y el alcance de las áreas de investigación ecológica, e incluso facilitar futuras investigaciones que tengan como objetivo reducir los efectos tanto directos como indirectos de las carreteras sobre las poblaciones de fauna silvestre. Asimismo, se puede utilizar para rastrear adecuadamente los cambios a largo plazo en la dinámica poblacional de las islas (Schwartz et al., 2020).

CONCLUSIONES

En base a esta investigación se puede observar que, por medio del uso de marcadores moleculares específicos, tanto COI como CytB, se obtuvo un mejor panorama sobre la variedad de especies que conforman una porción de las aves atropelladas de San Cristóbal. Esto demuestra lo eficiente que es emplear múltiples marcadores, especialmente en este tipo de muestras. Además, esto abre la posibilidad de su uso a mayor escala, sirviendo como una herramienta valiosa para empezar a investigar la realidad de las tasas de atropellos en las Islas Galápagos. Quizás incluso teniendo la posibilidad de influir en futuras decisiones y planes de conservación que busquen mitigar las tasas de aves atropelladas en las islas.

TABLAS

Tabla 1 – Concentración del ADN obtenido junto con los índices de calidad de las 13 muestras de aves desconocidas

| Muestra | Concentración (ng/μl) | Índice 260/280 | Índice 260/230 |
|----------|-----------------------|----------------|----------------|
| AMO3 | 316.50 | 2.02 | 2.16 |
| CC5010 | 838.70 | 2.14 | 1.98 |
| CO31 | 243.60 | 0.99 | 1.94 |
| CO42-38 | 33.10 | 0.55 | 1.81 |
| JG14 | 57.50 | 0.84 | 1.49 |
| JG20 | 609.80 | 1.85 | 1.88 |
| JO10 | 46.00 | 1.20 | 2.01 |
| JO41 | 164.70 | 1.17 | 1.92 |
| LK01 | 331.70 | 1.05 | 1.83 |
| LK06 | 697.50 | 1.76 | 1.96 |
| PPB 2001 | 722.00 | 2.17 | 1.99 |
| PPB 2005 | 760.10 | 2.00 | 1.87 |

Descripción: Lo que se observa son los valores de las concentraciones de ADN de las muestras de aves atropelladas junto con los índices de calidad de 260/230 y 260/230.

Tabla 2 – Resultados de la identificación de BLAST de las secuencias de la región COI

| Muestra | Familia Identificada | Especie identificada | Porcentaje de cobertura de query (%) | Porcentaje de identidad (%) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|---|------------------------------------|
| AMO3 | Parulidae | <i>Setophaga petechia</i> | 98.00 | 98.51 |
| JG14 | Parulidae | <i>Setophaga petechia</i> | 96.00 | 98.53 |
| JG20 | Parulidae | <i>Setophaga petechia</i> | 98.00 | 98.51 |
| PPB-2014 | Parulidae | <i>Setophaga petechia</i> | 98.00 | 98.66 |
| JO10 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 99.00 | 96.63 |
| CC5010 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 96.00 | 98.69 |
| CO31 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 100.00 | 99.53 |
| CO42-38 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 98.00 | 99.27 |
| JO41 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 100.00 | 99.84 |
| LK01 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 99.00 | 99.11 |
| LK06 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 100.00 | 98.83 |
| PPB 2001 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 100.00 | 99.42 |

| | | | | |
|----------|------------|------------------------|--------|-------|
| PPB 2005 | Thraupidae | <i>Geospiza fortis</i> | 100.00 | 99.39 |
|----------|------------|------------------------|--------|-------|

Descripción: Se muestra el hit de la búsqueda de BLAST con los valores más altos de porcentaje de identidad y de query para la región COI, para cada una de las 13 muestras desconocidas. Se muestra la identificación de familia y especie, al igual que el porcentaje de alineamiento entre la secuencia de referencia y la secuencia query y el porcentaje de identidad.

Tabla 3 – Resultados de la identificación de BLAST de las secuencias de la región CytB

| Muestra | Especie identificada | Porcentaje de cobertura de query (%) | Porcentaje de identidad (%) |
|----------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| JO10 | <i>Certhidea fusca</i> | 98.00 | 100.00 |
| CC5010 | <i>Geospiza fortis</i> | 96.00 | 98.69 |
| CO31 | <i>Geospiza magnirostris</i> | 100.00 | 99.88 |
| CO42-38 | <i>Geospiza difficilis</i> | 95.00 | 99.74 |
| JO41 | <i>Geospiza difficilis</i> | 98.00 | 100.00 |
| | <i>Geospiza magnirostris</i> | 99.00 | 99.88 |
| LK01 | <i>Camarhynchus parvulus</i> | 100.00 | 100.00 |
| LK06 | <i>Camarhynchus parvulus</i> | 100.00 | 100.00 |
| PPB-2001 | <i>Geospiza magnirostris</i> | 98.00 | 100.00 |

| | | | |
|----------|--------------------------|--------|--------|
| PPB-2005 | <i>Geospiza scandens</i> | 100.00 | 100.00 |
|----------|--------------------------|--------|--------|

Descripción: Se muestra el hit de la búsqueda de BLAST con los valores más altos de porcentaje de identidad y de query para la región CytB de las 9 muestras identificadas como pinzones. Se indica la identificación a nivel de especie, al igual que el porcentaje de alineamiento entre la secuencia de referencia y la secuencia query y el porcentaje de identidad. En el caso de la muestra JO41, se añadieron los dos primeros hits debido a los valores altos de query e identidad que presentaron.

Tabla 4 – Número de SNPs entre las secuencias desconocidas y las secuencias de referencia del NCBI

| Muestra | Accesión NCBI | Número de SNPs | Posible especie identificada |
|---------|--|----------------|------------------------------|
| JO10 | AY672053, AY672052, AY672060, AY672056, AY672059 | 3 | <i>Certhidea fusca</i> |
| CC5010 | AF108771, AF108772, AF108773, KJ945358, KJ945381, KJ945375 | 1 | <i>Geospiza fortis</i> |
| CO31 | AF108774, AF108777, AF108778 KJ945371, KJ945376 | 1 | <i>Geospiza magnirostris</i> |
| CO42-38 | AY700041, AY700039, AF108787 AY700038, KJ945344 | 3 | <i>Geospiza difficilis</i> |
| JO41 | AF108774, AF108777, AF108778 KJ945371, KJ945376 | 2 | <i>Geospiza difficilis</i> |
| | AY700041, AY700039, AF108787 AY700038, KJ945344 | 1 | <i>Geospiza magnirostris</i> |
| LK01 | AF108796, KJ945366, KJ945385 KJ945388, KJ945381 | 1 | <i>Camarhynchus parvulus</i> |
| LK06 | AF108796, KJ945366, KJ945385 KJ945388, KJ945381 | 1 | <i>Camarhynchus parvulus</i> |

| | | | |
|----------|--|---|------------------------------|
| PPB-2001 | AF108774, AF108777, AF108778 KJ945371, KJ945376 | 0 | <i>Geospiza magnirostris</i> |
| PPB-2005 | KJ945379, AF108783, AF108781 KJ945370, AF108779 | 5 | <i>Geospiza scandens</i> |

Descripción: Se muestran las accesiones de la base de datos core_nt del NCBI, al igual que el número de SNPs entre las secuencias analizadas y estas secuencias de referencia. El número de SNPs se determinó al alinear las secuencias en MEGA 11.

FIGURAS

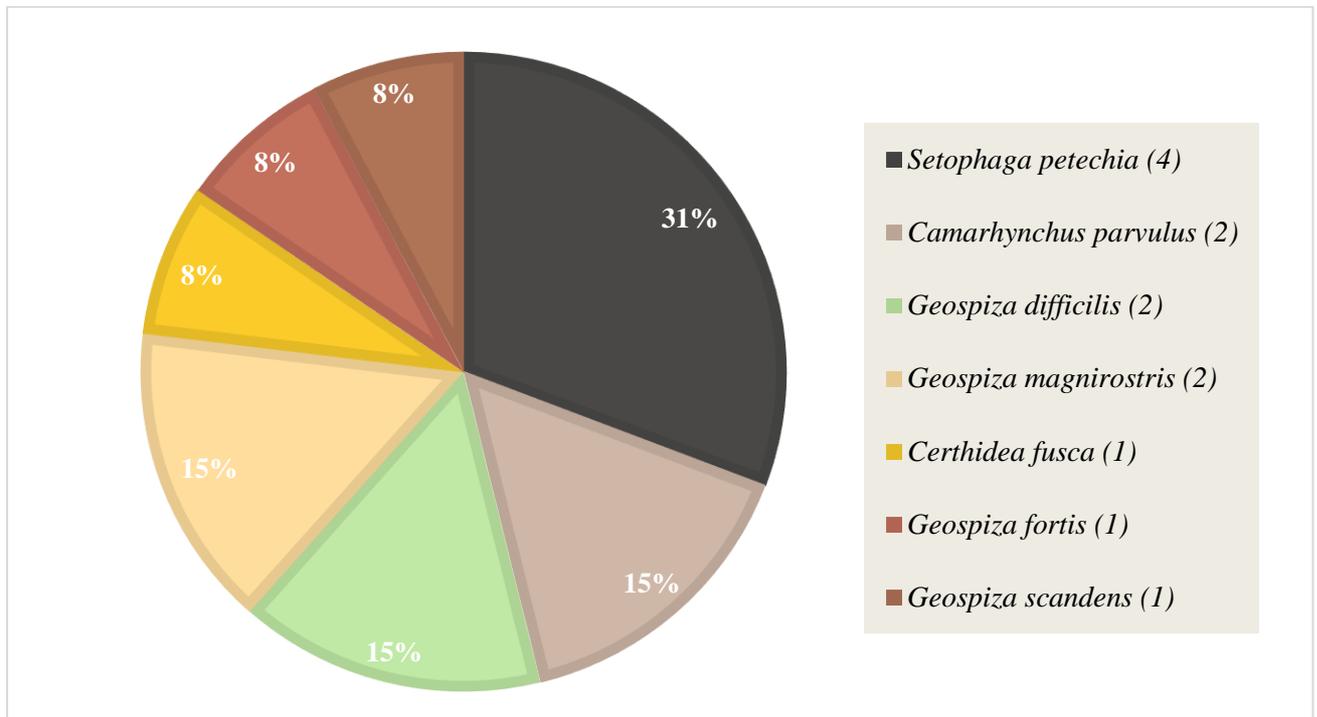


Figura 1– Diagrama de pastel de las 13 especies de aves atropelladas que fueron identificadas

Descripción: Se presenta la proporción (en porcentaje) de cada especie de ave identificada del total de 13 muestras

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., . . . Toteja, R. (2022). DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 761-775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
- Astuti, D., & Rachmatika, R. (2019). Mitochondrial genes diversity among the critically endangered black-winged myna bird (*Acridotheres melanopterus*) in captivity. *AIP Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.1063/1.5115736>
- Avibase. (2024). Avibase - the World Bird Database. Recuperado de <https://avibase.bsc-eoc.org/avibase.jsp>
- Awad, A., Khalil, S. R., & Abd-Elhakim, Y. M. (2015). Molecular phylogeny of some avian species using Cytochrome b gene sequence analysis. *PubMed*, 16(2), 218-222. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175180>
- Bollmer, J. L., & Nims, B. D. (2017). Genetic Diversity in Endemic Galápagos Birds: Patterns and Implications. En *Social and ecological interactions in the Galapagos Islands* (pp. 83-111). https://doi.org/10.1007/978-3-319-65909-1_4
- Chaves, B. R. N., Chaves, A. V., Nascimento, A. C. A., Chevitaresh, J., Vasconcelos, M. F., & Santos, F. R. (2014). Barcoding Neotropical birds: assessing the impact of nonmonophyly in a highly diverse group. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 921-931. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12344>
- Colihueque, N., Gantz, A., & Parraguez, M. (2021). Revealing the biodiversity of Chilean birds through the COI barcode approach. *ZooKeys*, 1016, 143-161. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1016.51866>

- Dinh, T. D., Ngatia, J. N., Cui, L. Y., Ma, Y., Dhamer, T. D., & Xu, Y. C. (2019). Influence of pairwise genetic distance computation and reference sample size on the reliability of species identification using Cyt b and COI gene fragments in a group of native passerines. *Forensic Science International Genetics*, *40*, 85-95.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.013>
- Dobрева, M. P., Lynton-Jenkins, J. G., Chaves, J. A., Tokita, M., Bonneaud, C., & Abzhanov, A. (2021). Sex identification in embryos and adults of Darwin's finches. *PLoS ONE*, *16*(3), e0237687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237687>
- Eo, S. H., & DeWoody, J. A. (2010). Evolutionary rates of mitochondrial genomes correspond to diversification rates and to contemporary species richness in birds and reptiles. *Proceedings Of The Royal Society B Biological Sciences*, *277*(1700), 3587-3592. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0965>
- García-Carrasco, J., Tapia, W., & Muñoz, A. (2020). Roadkill of birds in Galapagos Islands: a growing need for solutions. *Avian Conservation And Ecology*, *15*(1).
<https://doi.org/10.5751/ace-01596-150119>
- Gownaris, N., & Wetzel, D. (2024, 1 octubre). 13: The Ecology of Intraspecific Variation. Recuperado de https://bio.libretexts.org/Courses/Gettysburg_College/01%3A_Ecology_for_All/13%3A_The_Ecology_of_Intraspecific_Variation
- Grilo, C., Koroleva, E., Andrášik, R., Bíl, M., & González-Suárez, M. (2020). Roadkill risk and population vulnerability in European birds and mammals. *Frontiers In Ecology And The Environment*, *18*(6), 323-328. <https://doi.org/10.1002/fee.2216>
- Jiménez-Uzcátegui, G., Roa-López, H., Penafiel, D., Quezada, G., Loyola, A., Delgado, B., . . . Betancourt, F. (2024). Small Endemic Birds and Hot Climate: Avian and

- Environmental Predictors of Avifauna Road Mortality in Santa Cruz Galapagos. *Birds*, 5(3), 453-468. <https://doi.org/10.3390/birds5030031>
- Kerr, K. C., Birks, S. M., Kalyakin, M. V., Red'kin, Y. A., Koblik, E. A., & Hebert, P. D. (2009). Filling the gap - COI barcode resolution in eastern Palearctic birds. *Frontiers In Zoology*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-29>
- Kerr, K. C. R., Lijtmaer, D. A., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N., & Tubaro, P. L. (2009). Probing Evolutionary Patterns in Neotropical Birds through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 4(2), e4379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004379>
- Lamichhaney, S., Berglund, J., Almén, M. S., Maqbool, K., Grabherr, M., Martinez-Barrio, A., . . . Andersson, L. (2015). Evolution of Darwin's finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature*, 518(7539), 371-375. <https://doi.org/10.1038/nature14181>
- Lei, X., Yin, Z., Lian, Z., Chen, C., Dai, C., Christin, A., & Lei, F. (2010). Phylogenetic relationships of some Sylviidae species based on complete mtDNA cyt b and partial COI sequence data. *Chinese Birds*, 1(3), 175-187. <https://doi.org/10.5122/cbirds.2010.0013>
- Lohman, D. J., Prawiradilaga, D. M., & Meier, R. (2008). Improved COI barcoding primers for Southeast Asian perching birds (Aves: Passeriformes). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 37-40. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02221.x>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation And Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

- Lyamuya, R. D., Hariohay, K. M., Masenga, E. H., Bukombe, J. K., Mwakalebe, G. G., Mdaki, M. L., . . . Røskaft, E. (2021). Magnitude, patterns and composition of wildlife roadkill in the Serengeti ecosystem, northern Tanzania. *African Zoology*, *56*(3), 173-180. <https://doi.org/10.1080/15627020.2021.1952896>
- Medrano-Vizcaíno, P., Brito-Zapata, D., Rueda, A., García-Carrasco, J., Medina, D., Aguilar, J., . . . Gonzalez-Suarez, M. (2022). First national assessment of wildlife mortality in Ecuador: an effort from citizens and academia to collect roadkill data at country scale. *Authorea (Authorea)*. <https://doi.org/10.22541/au.166556354.44963742/v1>
- Medrano-Vizcaíno, P., Grilo, C., Pinto, F. A. S., Carvalho, W. D., Melinski, R. D., Schultz, E. D., & González-Suárez, M. (2022). Roadkill patterns in Latin American birds and mammals. *Global Ecology And Biogeography*, *31*(9), 1756-1783. <https://doi.org/10.1111/geb.13557>
- Morelli, F., Rodríguez, R. A., Benedetti, Y., & Delgado, J. D. (2020). Avian roadkills occur regardless of bird evolutionary uniqueness across Europe. *Transportation Research Part D Transport And Environment*, *87*, 102531. <https://doi.org/10.1016/j.trd.2020.102531>
- Rands, C. M., Darling, A., Fujita, M., Kong, L., Webster, M. T., Clabaut, C., . . . Ponting, C. P. (2013). Insights into the evolution of Darwin's finches from comparative analysis of the *Geospiza magnirostris* genome sequence. *BMC Genomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-95>
- Rendall, A. R., Webb, V., Sutherland, D. R., White, J. G., Renwick, L., & Cooke, R. (2021). Where wildlife and traffic collide: Roadkill rates change through time in a wildlife-tourism hotspot. *Global Ecology And Conservation*, *27*, e01530. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01530>

- Saitoh, T., Sugita, N., Someya, S., Iwami, Y., Kobayashi, S., Kamigaichi, H., . . . Nishiumi, I. (2014). DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. *Molecular Ecology Resources*, *15*(1), 177-186. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12282>
- Schwartz, A. L. W., Shilling, F. M., & Perkins, S. E. (2020). The value of monitoring wildlife roadkill. *European Journal Of Wildlife Research*, *66*(1). <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1357-4>
- Serite, C. P., Ntshudisane, O. K., Swart, E., Simbine, L., Jaime, G. L., & Teske, P. R. (2021). Limitations of DNA barcoding in determining the origin of smuggled seahorses and pipefishes. *Forensic Science International Animals And Environments*, *1*, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100006>
- Speller, C. F., Nicholas, G. P., & Yang, D. Y. (2011). Feather barbs as a good source of mtDNA for bird species identification in forensic wildlife investigations. *Investigative Genetics*, *2*(1). <https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-16>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology And Evolution*, *38*(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tanner, D., & Perry, J. (2007). Road effects on abundance and fitness of Galápagos lava lizards (*Microlophus albemarlensis*). *Journal Of Environmental Management*, *85*(2), 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.08.022>
- Tobe, S. S., Kitchener, A. C., & Linacre, A. M. T. (2010). Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome b and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. *PLoS ONE*, *5*(11), e14156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014156>

- TOMKINS, J. P. (2024). Galápagos Finches: A Case Study in Evolution or Adaptive Engineering? Recuperado de <https://www.icr.org/article/galapagos-finches-case-study-evolution>
- Wang, K., Liu, G. M., Song, C. M., Su, S., & Chen, M. (2018). Mitochondrial Genetic Diversity in the Bird Cherry-Oat Aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) in China. *Journal Of Agricultural Science And Technology*, 20(1), 95-107. Recuperado de <https://jast.modares.ac.ir/article-23-5001-en.html>
- Zink, R. M., & Vázquez-Miranda, H. (2018). Species Limits and Phylogenomic Relationships of Darwin's Finches Remain Unresolved: Potential Consequences of a Volatile Ecological Setting. *Systematic Biology*, 68(2), 347-357. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy073>

