UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JORGE FERNANDO NAVARRETE MERA

**Análise da situação genética do condor-dos-andes (*Vultur
gryphus*) no Equador**

RIBEIRÃO PRETO, SP.
-2016-

JORGE FERNANDO NAVARRETE MERA

Análise da situação genética do condor-dos-andes (*Vultur gryphus*) no Equador

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

RIBEIRÃO PRETO, SP.

-2016-

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Navarrete-Mera, Jorge Fernando

Análise da situação genética do condor-dos-andes (*Vultur gryphus*) no Equador

Ribeirão Preto, 2016.

XXp. : il. Xcm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Soares, Ademilson E. E.

1. Condor-dos-andes. 2. Microsatélite. 3. Genética de populações. 4. Equador. 5. Conservação. 6. Cordilheira dos Andes.

Nome: Navarrete-Mera, Jorge, F.

Título: Análise da situação genética do condor-dos-andes (*Vultur gryphus*)
no Equador

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Genética

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATORIA

À minha filha Teva o maior amor da minha vida, quem é meu motor, o motivo que me faz acordar cada dia, e dá sentido a minha vida. À Sindy minha admirável guerreira e companheira, quem nunca se deixou vencer. Aos meus pais Jorge e Sandra que tem me ajudado tanto e tem me ensinado como ser pai. Às minhas irmãs Patty e Tefy que demostram seu amor sempre com seus atos. Principalmente ao meu avô José Antonio, de quem não consegui me despedir.

AGRADECIMENTO

Às pessoas e instituições que tem ajudado na finalização do meu trabalho. Ao departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade de fazer meu mestrado. À Susie Nalon por sempre resolver minhas dúvidas, ao meu orientador Espencer Soares por toda a confiança que me deu, à falecida professora Eucleia Primo Betioli Contel que me recebeu no seu laboratório para realizar a primeira parte da minha pesquisa, à Geusa Simone Freitas por ser uma ajuda no laboratório e fora dele. Às professoras Zilá Luz Paulino Simões e Vera Lucia Castelo Figueiredo por permitir meu trabalho no laboratório do bloco A do Departamento.

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação que foram um apoio enorme para acabar meu mestrado. À Jaqueline Reginato Koser e à Dora Barrios que ajudaram constantemente com suas ideias e conhecimentos, sem vocês esta pesquisa não existiria. Ao Elius Paz por ser a mão amiga no laboratório, a ele e aos meus outros compatriotas Erick Rundo e Grace Ruiz com quem me senti menos longe da pátria.

Aos amigos que conheci fora da USP, principalmente com quem compartilhei o gosto pela música e a arte.

Aos colegas do projeto de conservação do condor Hernán Vargas, Andrés Ortega e Jaime Chaves, porque confiaram em mim e me entregaram as valiosas amostras com as quais foi realizada esta pesquisa.

Às instituições do Equador como a Universidade San Francisco de Quito (UFSQ) e ao Ministério do Ambiente (MAE) que apoiaram os esforços de quem se interessou pela conservação. Ao *Peregrind Fund* e à Secretaria de educação superior, ciência, tecnologia e inovação (SENESCYT) pela bolsa que me entregaram.

À minha família pelo eterno apoio.

There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.

Charles Darwin, The Origin of the Species

RESUMO

Navarrete-Mera, J.F. (2016). Análise da situação genética do condor-dos-andes (*Vultur gryphus*) no Equador. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O condor-dos-andes (*Vultur gryphus*) é uma ave carniceira da família dos abutres do novo mundo (Cathartidae) que habita ao longo da cordilheira dos Andes, cuja população tem diminuído no último século até ser considerada como espécie ameaçada. No Equador tem sido registrado aproximadamente 100 indivíduos em liberdade. Para evitar a extinção da espécie no país tem sido iniciado um programa de conservação envolvendo várias áreas das Ciências Biológicas, entre essas a genética de populações. Para descrever a situação genética do condor no Equador, amostras de sangue e penas de condores em cativeiro e silvestres, mais várias amostras de penas de muda de distintos locais onde habitam, foram coletadas e analisadas através de sete microssatélites heteroespecíficos amplificados no genoma do condor por PCR. Os resultados indicam que o grupo de 72 amostras, apresenta uma diversidade genética moderada a baixa nos loci estudados, apesar das grandes áreas onde está distribuído, porém as análises de variância molecular AMOVA e Hardy-Weinberg considerando como hipótese alternativa a deficiência de heterozigotos, indicam que não constituem uma população endogâmica. Estudos de estruturação populacional sugerem a falta de subpopulações inclusive entre amostras de lugares distantes. Sugere-se que se existir estruturação populacional esta deve ser do tipo isolamento por distância, para poder comprovar esta hipótese se propõe estender a pesquisa no futuro incluindo amostragem de locais muito distantes através da América Andina e diferentes marcadores. O grupo de marcadores foi também altamente útil para identificação genética de indivíduos através das penas anônimas coletadas no habitat, porém não resulta muito forte como prova de paternidade, precisando de marcadores mais polimórficos e melhor distribuídos pelo genoma.

ABSTRACT

Navarrete-Mera, J. F. (2016). Analysis of the genetic situation of the Ecuadorian Andean Condor (*Vultur gryphus*). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The Andean Condor (*Vultur gryphus*) is a scavenger bird of the New World vultures (Cathartidae) that lives along the Andes Mountains. Its population has declined in the last century until being considered an endangered species. In Ecuador, approximately 100 birds have been registered in freedom. To avoid extinction in this country has been initiated a conservation program involving several areas of biological sciences, one of these, population genetics. In order to describe the genetic situation of the condor in Ecuador, blood and feather samples from captive and wild condors, plus several samples of molted feathers from different locations were collected and analyzed through seven heterospecific microsatellite amplified in the condor genome by PCR. The results show that the group of 72 samples had a moderate to low genetic diversity in the amplified loci, despite the large areas where it is distributed. The analysis of molecular variance (AMOVA) and Hardy-Weinberg with heterozygote deficiency as alternative hypothesis denotes that sampled condors do not constitute an inbred population. Structuring analyzes suggest there is not subpopulations even among samples from distant places. If exist some kind of population structure in the species, it could be like isolation by distance structured, but in order to prove this hypothesis, it is recommended to extend the research including samples from distant locations through Andean America and more powerful genetic markers. Those markers was also highly useful for the genetic identification of not assigned feathers collected in the habitat, but as paternity test require more polymorphic markers and better distributed throughout the genome.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Objeto de estudo: O condor.....	12
1.2. Projeto CONDOR no Equador.....	14
1.3. Diversidade genética no condor andino.....	18
1.4. Uso de microssatélites.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL E METODOS.....	21
3.1. Amostragem.....	21
3.2. Extração de DNA.....	22
3.3. Microssatélites.....	22
3.4. Análises populacionais.....	26
3.4.1. Estatística descritiva.....	26
3.4.2. Identificação de indivíduos e parentesco.....	27
3.4.3. Estrutura populacional.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Extração DNA.....	28
4.2. Análise de Fragmentos de Microssatélites.....	29
4.3. Análises populacionais.....	31
4.3.1. Estatística descritiva.....	31
4.3.1.1. Diversidade genética e Hardy-Weinberg.....	31
4.3.1.2. Desequilíbrio de ligação.....	33
4.3.2. Identificação de indivíduos.....	33
4.3.3. Microssatélites para filiação e identificação no condor andino.....	35
4.3.4. Análises de estrutura populacional.....	37
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	44
7. RECOMENDAÇÕES.....	45
8. REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores que modificam a diversidade do acervo genético das populações naturais de todas as espécies é a mudança do tamanho populacional (Posada & Crandall, 2001; Drummond et al., 2005; Templeton, 2006). É essa diversidade que permite às populações adaptação às condições ambientais locais e evolução. Se a diversidade não é suficiente para isto o outro caminho mais provável é a extinção (Jensen et al. 2005; de la Rúa et al. 2009; Crispo et al. 2011; Oleksa et al. 2011).

A dinâmica de evolução/extinção é o motor que modela a diversidade biológica da vida na terra, mas nas últimas décadas há uma preocupação pela diminuição das populações e extinção de diversas espécies devido às atividades humanas (Ceballos et al., 2015). Para evitar ou diminuir este fenômeno, vários esforços para a conservação de fauna e flora na maioria dos países no mundo são realizados, em muitos casos auxiliados por pesquisas sobre a genética populacional, como em mamíferos domesticados, (Bruford et al., 2003), salmão (Schenekar et al., 2014), plantas com interesse paisagístico (Nazareno & Reis, 2014) e insetos como as abelhas sem ferrão (Jaffé et al., 2016).

A genética de populações é de grande importância nos programas de conservação (Bonatti et al., 2014; Alattal *et al.*, 2014; Parker et al., 2004; Bruford et al., 2003), pois as espécies ameaçadas de extinção são compostas de pequenas populações as vezes disjuntas, as quais tem maior risco de sofrer as consequências de endogamia, diminuição da diversidade genética, possível incremento da frequência de genes deletérios (Zayed, 2004), o que prejudica a adaptação e evolução (Charlesworth & Willis, 2009). O papel da genética de populações é proporcionar informação para entender ou evitar tal endogamia e suas consequências, reconhecer populações com características locais e as consequências da mistura de indivíduos destas populações (Bruford et al., 2003; Jensen et al., 2005; de la Rúa et al. 2009; Crispo et al. 2011; Oleksa et al. 2011).

No caso de espécies de fauna de grande porte é extremamente útil a informação que a genética proporciona. Estas espécies normalmente têm uma estratégia reprodutiva que consiste em pouca prole e intervalos geracionais muito longos, o que pode favorecer a formação de populações pequenas e com baixa diversidade genética (Groom et al., 2006), tornando-as extremamente frágeis e propícias a diminuição rápida do número de indivíduos.

Esta pesquisa foca-se na espécie *Vultur gryphus*, o condor-dos-andes, uma ave de grande porte em perigo de extinção, e sua situação genética na área norte dos Andes. Devido à perda acelerada da população de condores equatorianos nos últimos 30 anos aumenta a dúvida sobre o nível de endogamia da população local. Os condores têm vidas longas (até 60 anos) e, no caso equatoriano, há pouca mudança geracional devido à falta de filhotes (Koenen et al., 2000; Meza et al., 2009). Então, uma grande proporção dos indivíduos existe desde épocas de maior abundância para a espécie, e este fato levou a questionar sobre o estado genético da espécie e o nível de endogamia.

Mediante a análise de um número significativo de marcadores moleculares STR é possível alcançar um nível de detalhe alto quanto à descrição da diversidade genética da população de condores equatorianos. Um maior detalhamento é necessário devido à baixa quantidade de indivíduos existentes que muito provavelmente conformam um grupo muito homogêneo de baixa diversidade, situação sugerida na análise do DNA mitocondrial de Hendrickson et al., 2003.

1.1. Objeto de estudo: O condor

O condor-dos-andes (*Vultur gryphus*) é uma espécie de ave necrófaga de grande porte, nativa dos países andinos Colômbia, Equador, Peru, Chile, Bolívia e Argentina. Nesses lugares é muito representativa na mitologia e cultura de seus povos e também um símbolo da nacionalidade (Gordillo, 2002). O condor pertence à Família dos abutres do Novo Mundo ou urubus Cathartidae, que tradicionalmente foi localizado na ordem Falconiformes, embora pesquisas genéticas sugere proximidade com Ciconiiformes (garças, íbis e flamingos) (Avisé et al., 1994).

O condor é reconhecido por suas grandes dimensões, onde fisicamente, é um grande urubu preto com uma plumagem branca em volta do pescoço, tem um leve dimorfismo sexual, sendo que o macho tem uma crista carnuda na cabeça e é maior do que a fêmea (Del Hoyo et al., 1994).

A distribuição geográfica do condor está ligada à cordilheira dos Andes e outras formações montanhosas da América do sul (Figura 1). O habitat ideal do condor andino deve possuir fortes ventos ascendentes e ser amplo o suficiente, com extenso campo aberto para encontrar alimento, estas características são encontradas em regiões da América andina como nos paramos andinos (Venezuela, Colômbia e Equador), a puna

Figura 1. Distribuição aproximada atual (cinza escuro) e histórica (cinza claro) do condor andino (paleontológico *Vultur gryphus*). (A) Observações ocasionais Mato Grosso, Brasil; (B) registro do Holoceno Minas Gerais, Brasil; (C) registros paleontológico do Pleistoceno e Plioceno província de Buenos Aires; (D) Zona de reintrodução atual na costa patagônica argentina; (E) região de ninhos e voos até há um século. Fonte: Lambertucci 2007

peruana, o altiplano boliviano, os desertos costeiros de Peru e Chile, a patagônia argentina e os vales inter-andinos (Lambertucci, 2007). Existe uma diferença entre a distribuição populacional do norte e a do sul da cordilheira dos Andes, devido às áreas grandes e contínuas de campo aberto que existem no sul, diferente do norte, onde o

páramo andino é descontínuo e pequeno. Estas diferenças geográficas afetam a densidade em cada região, pois as áreas mais extensas permitem que a população seja mais densa (Del Hoyo et al., 1994).

O condor é um ave de vida longa e taxa reprodutiva baixa. Monógamos, formam casais reprodutivos durante mais de 30 anos e a postura é de um ovo por ciclo reprodutivo que eclode depois de 50 dias. O filhote é inteiramente dependente dos pais por dois anos, mas realiza os primeiros voos por volta dos 7 meses de idade. Alcançam a maturidade sexual entre os 6 a 7 anos, quando começam a busca por um parceiro. Durante os primeiros dois anos de vida do filhote o casal não realizará nem a cópula nem a postura de um novo ovo (Del Hoyo et al., 1994).

Aproximadamente 6200 condores existem na sua área de distribuição natural (Díaz et al., 2000). Porém, a espécie está incluída no Anexo I da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species 1973) com o status de quase ameaçado. No Equador, o condor está em situação crítica, onde aproximadamente 100 condores vivem em liberdade (Naveda et al., 2016). Nesta situação, tornou-se imperativo iniciar um projeto de conservação e obter as informações do estado e diversidade genética das populações tanto das aves livres, como em cativeiro, que auxiliariam a elaborar planos de manejo para a espécie assim como planos de reintrodução. As pesquisas relacionadas com esta área são poucas, por esta razão é necessário formar um banco de dados que facilite o trabalho de reprodução e reintrodução com base em informação do fluxo gênico e parentesco entre os indivíduos. Os órgãos envolvidos na conservação do condor têm discutido intensamente sobre a necessidade de aperfeiçoar os esforços, tomando decisões sobre reprodução em cativeiro e liberação de aves resgatadas baseados em dados genéticos, visando esse objetivo é que a presente pesquisa foi idealizada dentro do Projeto CONDOR.

1.2. Projeto CONDOR no Equador

Os primeiros censos de populações equatorianas de condores foram feitas no início da década de 90 por instituições privadas de estudo de fauna silvestre. Censos posteriores foram realizados regularmente indicando uma população pequena e de difícil observação e quantificação (Tabela 1).

Tabela 1: Censo de condores no território equatoriano. Ano da amostragem, tamanho da população e a instituição responsável.

Censos		
Ano	População	Instituição
1991	42	CECIA
1996	<100	CECIA
2002	60-70	CECIA
2008	20-27	SIMBIOE
2016	94-100	Projeto Condor

CECIA: Corporación ornitológica del Ecuador, atualmente, Aves y Conservación;SIMBIOE: Corporación Sociedad para la Investigación de la Biodiversidad Ecuatoriana

Em 2009, o Ministério do Ambiente do Equador (MAE) junto a várias organizações civis criaram a “*Estrategia Nacional de Conservación del Condor Andino*” a fim de preservar a espécie no país. A estratégia tinha como objetivos: promover programas de manejo; programas de educação, difusão, informação, capacitação e comunicação; pesquisa e conservação (MAE 2009).

Para cumprir com esses objetivos, e devido à rápida redução da população de condores no Equador (Meza Saltos et al., 2009), foi criado em 2009, através de uma resolução ministerial do MAE, o “*Grupo Nacional del Cóndor Andino*” (GNCA) e em colaboração com ele é implementado um grupo científico de trabalho de conservação conhecido como “*Proyecto Cóndor*” constituído por pesquisadores equatorianos, cujo objetivo é a tomada de ações para tentar evitar a extinção da espécie através da manutenção e reprodução de indivíduos em cativeiro e marcação de indivíduos livres para monitoramento (Figuras 3,4, 5).

O projeto inclui áreas com registro da movimentação dos condores (Figura 6), resultado da colocação de bandas alares com localizador GPS em indivíduos resgatados e liberados, que geraram também dados de monitoramento populacional no território equatoriano. Durante a captura de indivíduos para colocação de rastreador também foi feito a coleta de amostras biológicas (sangue, penas) para estudos na biologia da reprodução, causas de mortalidade, saúde e diversidade genética.

A presente pesquisa tem o apoio do Projeto Condor, e por meio dele as amostras foram coletadas, com permissão e apoio do governo equatoriano.

Figura 3: Condores mantidos em cativeiro. Fonte: *Proyecto Cóndor*.

Figura 4 – Condores marcados com bandas alares. Fonte: *Proyecto Cóndor*

Figura 5- Colocação de bandas para rastreamento GPS. Fonte: *Proyecto Cóndor*.

Figura 6: Registro de rastreamento por satélite de um dos condores. Pode-se observar que visita o departamento de Narinho no sul da Colômbia na fronteira norte com o Equador. Dados cedidos pelo Dr. Andrés Ortega do *Proyecto Cóndor* e pelo Dr. Hernán Vargas do *The Peregrine Fun*

1.3. Diversidade genética no condor andino

As características biológicas e populacionais mencionadas, junto com vários efeitos antropogênicos tem colocado o condor-dos-andes nesta crítica situação (Lambertucci, 2007).

Um caso que serve como exemplo do que poderia ocorrer com o condor-dos-andes é uma espécie de ave da mesma família (Cathartidae) conhecida como condor californiano. Esta ave ocupa o mesmo nicho ecológico no seu ecossistema e possui inúmeras semelhanças biológicas, etológicas e reprodutivas com o condor-dos-andes, incluindo os mesmos eventos que tem levado a estar ameaçadas de extinção. Porém, a diminuição do número de indivíduos foi muito mais dramática, tornando evidente as consequências da endogamia e da decorrente diminuição da variabilidade genética (Romanov et al., 2009). Esta endogamia manifestou-se em uma forma de condrodistrofia que tem afetado a pequena população de condor californiano, apresentando problemas morfológicas nos indivíduos recém-nascidos e malformações embrionárias letais que tem afetado o número de crias vivas e o sucesso reprodutivo da espécie (Rall et al., 2000). Este evento decorrente da endogamia levou ao estudo da espécie e intervenção imediata através de programas de reintrodução, análises genéticas populacionais e em especial genética médica, visando evitar a extinção da espécie. Os grupos conservacionistas da América Latina que trabalham no condor-dos-andes tem prestado especial interesse neste caso, tentando evitar que uma situação do mesmo tipo aconteça na região,

No caso do condor no Equador e áreas próximas de países vizinhos, a população foi muito diminuída nos últimos anos e não se tem dados exatos sobre reprodução em liberdade e os condores em cativeiro se multiplicam lentamente. Por isso é necessário para a pesquisa conhecer a dinâmica populacional da espécie no território, e comprovar se a deriva afeta negativamente a diversidade genética.

Até o momento, o que se conhece sobre o condor através de análise de DNA mitocondrial indica que há uma variabilidade genética relativamente baixa, apesar de sua ampla distribuição geográfica (Hendrickson et al., 2003). Porém, é pertinente obter informações genéticas através de marcadores moleculares nucleares e que idealmente não estejam sobre seleção.

Sabemos que a capacidade do voo modifica a dinâmica reprodutiva em relação a animais puramente terrestres. Neste caso específico, o condor é um ave acostumada a

percorrer grandes distâncias à procura de alimento. Para este projeto é importante saber se esta falta de barreiras geográficas efetivas que limitem o fluxo genético permite uma população homogênea ou se existem subpopulações.

1.4. Uso de microssatélites

A diversidade genética é muitas vezes acessada por marcadores do genoma nuclear, mitocondrial ou microssatélites. Os microssatélites (STR) são úteis em estudos de genética de populações na história recente porque tem maior variabilidade alélica do que outros marcadores de DNA nuclear como SNP e VNTR, o que permite um maior detalhe na diferenciação de indivíduos e populações, e são herdados de forma codominante (Peters et al., 1998). Estão conformados por repetições em tandem de 1 a 10 nucleotídeos e estão espalhados por todo o genoma dos eucariotos e raramente são codificantes (Viana et al., 2011). Estas repetições tem sua origem em crossing over desiguais e ‘escorregões’ da enzima DNA polimerase durante a replicação da fita de DNA (splipped-strand mispairing) (Eisen, 1999). O número variável de repetições produz diferentes tamanhos, estas fitas de diferentes tamanhos são os alelos. A taxa de mutação dos microssatélites é variável, dependendo da composição e do número das unidades de repetição. É mais comum o ganho de repetições do que a perda, e parece haver um limite no número de repetições máximo que as mutações podem produzir. Certos loci são altamente polimórficos enquanto que outros são monomórficos sem motivo aparente (Goldstein & Shlötterer, 1999 *apud* FRANCISCO, 2002; Takezaki & Nei, 1996).

Essas característica tornam os microssatélites os marcadores mais úteis que outros menos variáveis em estudos populacionais (Rafalski et al., 1991), pois podem revelar estrutura populacional e processos evolutivos recentes e em menor escala temporal (Takezaki & Nei, 1996). A riqueza alélica e a heterozigose tendem a se reestabelecerem depois da separação de populações, deixando marcas que indicam o efeito fundador, tempo de separação, isolamento reprodutivo ou fluxo gênico (Sequeira et al., 2008), tendo importância fundamental no monitoramento de populações naturais quando se considera os recentes isolamentos pela fragmentação de habitat, estudo do comportamento reprodutivo, parentesco e desenvolvimento de populações em melhoramento genético (Viana et al., 2011), tamanho efetivo populacional, dispersão

dos indivíduos (Jaeger et al., 2007), hibridação e status da variabilidade local (Koser et al., 2014).

A limitação da técnica se deve ao alto custo do desenvolvimento de pares de primers específicos, sendo assim, a possibilidade de uso de primers desenhados de forma espécie-específica para espécies diferentes ao alvo do estudo é uma alternativa rápida e segura. A aplicação destes primer heterólogos é prática recorrente em diversos grupos taxonômicos como abelhas (Francisco et al., 2006; Koser et al., 2014) e dipteros (Lima, 2010) e demais grupos citados em Viana et al., 2011, e sua eficiência diminui conforme a distância filogenética da espécie alvo e da espécie usada no seu desenvolvimento e podem apresentar mais alelos nulos e ausência de amplificação (Viana et al., 2011; Moresco, 2009).

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Conhecer a variabilidade genética do condor andino no Equador.
- Determinar a estrutura populacional da espécie no Equador.

Objetivos específicos

- Desenvolver um método não invasivo para conseguir material genético de condores em liberdade: difíceis de observar, quantificar ou capturar;
- Padronizar o uso de marcadores moleculares microssatélites heteroespecíficos para o condor andino;
- Identificar geneticamente os indivíduos livres como fonte de informações sobre tamanho da população, e comparar esses dados com o monitoramento de campo, além de usar este registro como um “número de identidade” genético de cada condor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Entre os anos 2012 a 2015, mesmo antes do início do programa de capturas programadas de condores para colocação de rastreadores por satélite, pesquisadores e assistentes de campo começaram a coletar e armazenar penas de muda achadas na natureza, em ninhos e dormideiras (Tabela 2). Foram coletadas quase 300 penas de distintas classes e tamanhos. Posteriormente, se escolheu as melhores conservadas para a extração de DNA. As amostras que amplificaram todos os marcadores foram escolhidas para as análises

Tabela 2: Registro dos lugares comuns de amostragem de penas no habitat do condor-dos-andes no Equador

Lugar	Latitude	Longitude	Proprietario
Peñon del Cóndor, Reserva Biológica Antisanilla	-0.44963°	-78.27954°	Fundación Jocotoco
Peñon del Isco, Reserva Biológica Antisanilla	-0.45313°	-78.31869°	Fundación Jocotoco
La Rinconada, Hacienda Zuleta	0.194415°	-78.06557°	Fundación Galo Plaza Lazo,
Várias dormideiras onde foi coletado plumas de forma oportunista.	Várias	Várias	Dentro e fora de áreas protegidas, dormideiras reveladas por condores marcados com rastreadores por satélite.
Locais não planejados. Amostras de sangue de condores resgatados ou capturados para pesquisa científica	Várias	Várias	Dentro e fora de áreas protegidas

Amostras de sangue e penas de condores silvestres capturados e liberados após colocar rastreadores por satélite foram coletadas no mesmo período (Figura 7). Também foram amostrados os indivíduos mantidos em cativeiro em unidades autorizadas e zoológicos durante os exames anuais de saúdes (Tabela 3). Todos os indivíduos em

cativeiro e com rastreador por satélite possuem chip subdérmico com código para facilitar identificação individual. As amostras foram coletadas por pesquisadores e assistentes de campo do Projeto de Pesquisa e Monitoramento Ecológico do Condor Andino do Equador.

3.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA a partir de penas e sangue se usou o kit *DNeasy® Blood & Tissue Kit* da empresa QUIAGEN, seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações e um tratamento prévio das amostras de penas, para promover a melhor a degradação da queratina estrutural e obter um maior rendimento do DNA.

O tratamento prévio consistia em cortar as penas em pequenos pedaços e passá-las por digestão com DTT e proteinase K, *overnight* ou o tempo que fosse necessário. Depois se seguiu o protocolo indicado. Para a extração de DNA a partir de sangue, o volume utilizado foi reduzido na extração (10 μ l), devido à presença de DNA proveniente das hemácias nucleadas das aves.

3.3. Microsatélites

Foram escolhidos e testados 14 marcadores STR heteroespecíficos de espécies de aves aparentadas ou não com o condor. Dos quais seis deles foram desenvolvidos para o condor da Califórnia (*Gymnogyps californianus*), ave da família Cathartidae (Romanov et al., 2006), três de bibliotecas de marcadores usados em aves de várias espécies (Primmer & Ellegreen., 1998), e cinco específicos para o gênero *Buteo*, desenvolvido do genoma do Gavião-papa-gafanhoto (*Buteo swainsoni*) (Hull et al., 2007). A descrição dos marcadores está na Tabela 4.

Figura 7-Coleta de amostras de sangue. Fonte: *Proyecto Cóndor*.

Tabela 3. Indivíduos com chip. Os indivíduos em cativeiro de diversos centros de fauna e zoológicos e os indivíduos silvestres com rastreador por satélite GPS.

	Nº	Ident.	Nome	Localização ou ZOO	Data de amostragem	Idade	Sexo
CATIVEIRO	1	P7	Curi	Parque Cóndor	22/01/15	27	Macho
	2	P8	Pacha	Parque Cóndor	22/01/15	9	Fêmea
	3	P9	Rucu	Hda Zuleta	01/02/15	40	Macho
	4	P10	Reina Pacha	Hda Zuleta	01/02/15	16	Fêmea
	5	P11	Coya	Hda Zuleta	01/02/15	9	Fêmea
	6	P12	Tarishca	Hda Zuleta	01/02/15	14	Macho
	7	P13	Inti-zuleta	Hda Zuleta	01/02/15	19	Macho
	8	P14	Ayu	Hda Zuleta	01/02/15	13	Fêmea
	9	P15	Pimampiro	Hda Zuleta	01/02/15	15	Macho
	10	P16	Cuatro	Baños	09/02/15	35	Macho
	11	P17	Tres	Baños	09/02/15	39	Macho
	12	P18	Dos	Baños	09/02/15	45	Macho
	13	P19	Yanita	Illitio	18/02/15	6	Fêmea
	14	P20	Inti-ilitio	Illitio	18/02/15	11	Macho
	15	P21	Guambi	Zoo Amaru	31/03/15	-	Macho
	16	P22	Awki	QuitoZOO	-	35	Macho
	17	P23	Kawsai	QuitoZOO	-	>22	Fêmea
	18	P24	Huayra	QuitoZOO	-	4,11	Macho
	19	P25	Quillari	QuitoZOO	-	2,9	Fêmea
SILVESTRES	1	P26	Felipe	Cuyuja	27/06/13	2	Macho
	2	P27	Polito	Parque Cóndor	23/01/14	1,5	Macho
	3	P28	Quipo	Baeza	16/06/14	1,5	Macho
	4	P29	Ares	Antisana	20/11/14	5	Fêmea
	5	P30	Zuleta	Hda Zuleta	06/11/14	<2	Fêmea
	6	P31	Awka	Hda Zuleta	06/11/14	5 - 6	Fêmea
	7	P32	l	Cotopaxi	03/03/15	subadulta	Fêmea
	8	P33	Chilintosa	Cotopaxi	03/03/15	subadulta	Fêmea
	9	P34	Sisa	Cotopaxi	07/04/15	5 - 6	Fêmea
	10	P35	Chunka	Cotopaxi	-	-	Fêmea
	11	P36	Huascar	Huayco-Lima	-	-	Macho
	12	P37	Atahualpa	Huayco-Lima	-	-	Macho

Tabela 4: Pares de *primers* utilizados para a amplificação de regiões microssatélites do condor andino. Origem do primer, nome, tamanho em pares de base, tipo e motivo da repetição.

Origem	Nome	Tamanho	Tipo	Motivo repetido
<i>Gymnogyps californianus</i> Romanov et al. 2006	A8	210-232 pb	Dinucleotídeo	CA
	A20	209-220 pb	Dinucleotídeo	CA
	B7	165 pb	Trinucleotídeo	TCA
	C5	179-191 pb	Trinucleotídeo	ATG
	H115	196 pb	Tetranucleotídeo	CATC
	H127	123 pb	Tetranucleotídeo	-
Banco de Microssatélites aves, Primmer & Ellegreen 1998	FhU2	75 pb	Dinucleotídeo	CT
	HrU2	150-200 pb	Dinucleotídeo	TG
	HrU6	193 pb	Tetranucleotídeo	GAAA
<i>Buteo swainsoni</i> Hull et al 2007	BswA110w	197-233 pb	Dinucleotídeo	CA
	BswD312w	119-209 pb	Pentanucleotídeo	GAGAA
	BswD122w	199-299 pb	Pentanucleotídeo	GAGAA
	BswD207w	215-312 pb	Pentanucleotídeo	GAGAA
	BswD223w	197-305 pb	Pentanucleotídeo	GAGAA

A amplificação dos marcadores foi feita por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizado nos primeiros testes o Kit *PCR Master Mix* da empresa Promega. O volume total da PCR foi de 16 μ l sendo divididos da seguinte maneira: 8 μ l de *PCR Master Mix* (que contém $MgCl_2$, Buffer de PCR, dNTP e *Taq* polimerase), 1 μ l de primer mix composto dos oligonucleótidos iniciadores *Forward* e *Reverse* a uma concentração de 2,5 μ M e 0,5 μ l do DNA extraído. Os marcadores foram amplificados em gradiente de 55°C a 65°C e de 45°C a 55°C, com o objetivo de determinar a melhor temperatura de anelamento para cada um. O resultado foi visualizado por meio de géis de poliacrilamida. Foram escolhidos para análises populacionais aqueles que tiveram sucesso na amplificação.

Depois foi realizada a análise de fragmento, para isso foram desenhados novos primers *Forward* com a mesma sequência, mas dessa vez marcados em 5' com fluoróforos da Matriz DC-33 da Applied Biosystem (Tabela 5). A amplificação por PCR dos marcadores com fluorescência foi padronizada usando a polimerase *Hotstart*

de alta fidelidade *JumpStart™ AccuTaq™ LA DNA Polymerase* da empresa SIGMA-ALDRICH, para evitar a formação de fragmentos não específicos que possam confundir os resultados. A padronização foi feita independentemente para cada marcador tomando como base os resultados obtidos anteriormente. O volume total da PCR foi ajustado para 10 μ l em cada reação, sendo: 1 μ l de mix de PCR que já contém $MgCl_2$, Buffer de PCR, 0,5 μ l de dNTP a 10 mM, 0,2 μ l de polimerase a 2,5 U/ μ l, de 0,5 a 1 μ l de mix de *primers* (*Forward* marcado e *Reverse* sem marcar) a 2,5 μ M dependendo de cada microssatélite. O DNA extraído foi diluído a 1,4ng/ μ l como diluição de trabalho e foi usado entre 1,5 e 7 μ l por reação também dependendo de cada microssatélite, e finalmente água ultrapura (miliQ) até completar o volume de PCR indicado.

Tabela 5. Primers marcados em 5' com fluoróforo.

Microssatélite	Fluorescência	Cor
A20	VIC	Verde
C5		
H127		
B7	6-FAM	Azul
D312w		
HrU6		
A8	NED	Amarelo
HrU2		
A110w		
D207w		
H115	PET	Vermelho
FhU2		
D122w		
D223w		

Os resultados foram observados em géis de poliacrilamida denaturante e não denaturante, e aqueles microssatélites que amplificaram com sucesso foram usados para análises de fragmento por meio de eletroforese capilar.

A análise de fragmento foi padronizada seguindo as especificações dos fornecedores do serviço e buscando otimizar o uso de reagentes e a leitura das amostras. Para o mencionado processo foi utilizado um volume total de 10 μ l por poço em placas de 96 poços, divididos da seguinte maneira: 0,8 μ l de PCR, 0,4 μ l do marcador de peso interno *GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0* da Applied Biosystems e 8,8 μ l de formamida para permitir a denaturação e a eletroforese capilar. A análise de fragmento foi realizada no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO - na UNESP campus Jaboticabal, onde foi efetuada a denaturação das amostras a 95°C durante 3 minutos e depois o choque térmico imediato a 0°C. A eletroforese capilar foi feita no Sequenciador automático de 96 capilares, *ABI 3730 XL DNA analyzer* (Applied Biosystems). Os resultados das corridas foram analisados no software Genemarker 2.6 (SoftGenetics). Aqueles marcadores que apresentaram problemas na amplificação ou na interpretação dos alelos, foram sempre que possível excluídos das análises.

3.4. Análises populacionais

A fim de descrever a dinâmica e a estrutura populacional do condor, foram comparadas inicialmente as populações em cativeiro e livres, porém, uma análise que indique a formação de clusters entre os indivíduos foi testada visando obter grupos populacionais suficientemente diferenciados para realizar comparações entre eles. Os seguintes testes foram efetuados:

3.4.1. Estatística descritiva

Para descrever a diversidade genética foram utilizadas as seguintes medidas: Número de alelos observados (N_a) e efetivos (N_e), Conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice de informação de Shannon, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e índice de fixação (F), usando os pacotes de Microsoft Excel *Microsatellite tools* (Park., 2001) e *GenAlex* (Peakall & Smouse, 2006), também alelo nulo no programa *CERVUS* 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007). Frequência genotípica, aderência ao equilíbrio

de Hardy-Weinberg testando como hipótese alternativa o excesso de heterozigotos foram realizadas no software *Genepop 4.4*. (Rousset, 2008). Desequilíbrio de ligação foi feito no software *Arlequin 3.1* (Excoffier et al. 2005).

3.4.2. Identificação de indivíduos e parentesco

A identificação das amostras como indivíduos foi feita através da comparação da porcentagem de alelos compartilhados entre amostras, no programa *Microsatellite tools* (Park, 2001) para *Microsoft Excel* e através da opção *Identity analysis* do programa *CERVUS 3.0.7* (Kalinowski et al., 2007). O parentesco e o valor do teste como prova de identidade e paternidade foram avaliados também com o software *CERVUS* que atribui a filiação usando uma abordagem baseada na verossimilhança e na probabilidade de exclusão. O *CERVUS* calcula a probabilidade logarítmica de cada pai candidato ser o progenitor verdadeiro comparado a qualquer indivíduo aleatório e posteriormente calcula a diferença entre os dois pais mais prováveis como o valor de Delta, Δ . Os valores críticos de Δ são determinados por simulação usando os valores das frequências gênicas da população amostrada. Uma prova de filiação foi realizada comparando indivíduos juvenis com rastreador por satélite e indivíduos adultos livres do resto da amostras. A prova foi realizada para identificação de dois parentais e sem identificação do sexo dos mesmos.

3.4.3. Estrutura populacional

Para definir a estrutura da população mediante inferência de Clusters por estatística bayesiana foi utilizado o programa *Structure 2.3.4* (Pritchard et al., 2000). Para determinar o número de clusters ou grupos populacionais testou-se em primeiro lugar vários intervalos de clusters possíveis, entre 1 e 5, entre 1 e 8, entre 1 e 10, entre 1 e 12, e finalmente entre 1 e 15. Foi escolhido como modelo de ancestralidade o *admixture model*, pois se ajusta melhor a realidade da maioria das populações. Foi usado um período de *burnin* de 100000 e 1000000 repetições no método MCMC (Monte Carlo Markov Chain), e em cada teste se usou 10 corridas por vez.

Os resultados destas análises foram examinadas no site *Structure harvester* (Earl & vonHoldt, 2012) que utiliza o método de Evanno (Evanno et al., 2005) para determinar o melhor Delta K de entre os intervalos testados.

As corridas do *Structure* apresentam comumente uma incompatibilidade entre os rótulos que o *Structure* coloca a cada cluster e os valores desses cluster nos indivíduos, para resolver esse problema foi utilizado o software *CLUMPP* (Jakobsson & Rosenberg, 2007), que é um programa de correspondência de agrupamentos e permutação para lidar com a mudança de rótulo e multimodalidade na análise da estrutura populacional. Por questão do tempo que a análise requer, foi escolhido o algoritmo *Greedy* com 1000 permutações entre os três que o *CLUMPP* oferece. Para ilustrar graficamente o resultado final da estrutura populacional se utilizou o programa *Distruct* (Rosenberg, 2004). Para definir a variabilidade entre e dentro dos indivíduos foi utilizada a análise de variância molecular (AMOVA), por meio do *Arlequin 3.1*.

4. RESULTADOS

4.1. Extração DNA

A quantificação da extração de DNA dependeu muito da qualidade da amostra de pena. As amostras das quais se obteve o melhor rendimento de DNA extraído e amplificado de PCR, foram aquelas sem sinais visíveis de degradação, com cálcio ainda transparente e com as barbas e as bárbulas quase intactas (Hogan et al., 2008). No caso de amostras de penas de muda, o ambiente em que a amostra esteve ou foi conservada após a coleta, e o tempo decorrido desde a queda dessa pena e a conservação afetou muito a qualidade do material. No caso específico desta pesquisa, se teve a oportunidade de trabalhar com penas com uma grande diferença de tamanho, desde pequenas penas de cobertura do corpo, até grandes penas de voo.

A grande maioria das amostras foi de tamanho médio e baixa qualidade, consequentemente a quantidade de DNA extraído estava em concentração significativamente mais baixa do que o esperado (menor de 8 ng/ μ l). Porém, a padronização das reações permite usar pouca quantidade de DNA para amplificar microsatélites, em uma quantidade aceitável de amostras.

4.2. Análise de Fragmentos de Microsatélites

Nos resultados das análises de fragmento conseguiu-se a amplificação de 10 marcadores, sendo 3 deles monomórficos (*FhU2*, *HrU2* e *BswA110w*) e portanto não informativos, e houve dificuldade em amplificar o marcador *BswD207w* na maioria das amostras. Assim as análises prosseguiram apenas com 7 microsatélites.(Tabela 6).

Tabela 6: Resumo do processo de amplificação por PCR Tamanho do fragmento amplificado.

Origem	Nome	Tamanho prévio	Não marcado	Marcado '5	Tamanho posterior	Número de alelos
<i>Gymnogyps californianus</i> Romanov et al. 2006	A8	210-232 pb	Amplificou	Amplificou	212-224pb	6
	A20	209-220 pb	Amplificou	Amplificou	205-215 pb	6
	B7	165 pb	Amplificou	Amplificou	164-170 pb	3
	C5	179-191 pb	Amplificou	Amplificou	178-215 pb	6
	H115	196 pb	Amplificou	-	-	-
	H127	123 pb	Amplificou	Amplificou	132-148 pb	4
Banco de STR aves Primmer & Ellegreen 1998	FhU2	75 pb	Amplificou	Amplificou	122	Monomórfico
	HrU2	150-200 pb	Amplificou	Amplificou	135	Monomórfico
	HrU6	193 pb	-	-	-	-
<i>Buteo swainsoni</i> Hull et al 2007	BswA110w	197-233 pb	Amplificou	Amplificou	221	Monomórfico
	BswD312w	119-209 pb	Amplificou	-	-	-
	BswD122w	199-299 pb	Amplificou	Amplificou	184-214 pb	7
	BswD207w	215-312 pb	Amplificou	-	-	-
	BswD223w	197-305 pb	Amplificou	Amplificou	236-246 pb	2

Encontrou-se entre 2 a 7 alelos, marcador *BswD223w* (D223) com dois alelos, *B7* com 3, *H127* com quatro, *C5*, *A20* e *A8* apresentaram 6 alelos e *BswD122w* (D122) 7 alelos, como apresentado na Tabela 7. Nesta tabela também estão descritas as frequências alélicas.

Tabela 7. Microssatélites utilizados, tamanho dos alelos encontrados e frequências.

[illegible]

4.3. Análises populacionais

4.3.1. Estatística descritiva

4.3.1.1. Diversidade genética e Hardy-Weinberg

Nos resultados globais (Tabela 8) observa-se uma clara diferença entre o número observado de alelos e o número efetivo de alelos, o que indica uma menor possibilidade de passar toda a diversidade alélica existente para as seguintes gerações (Kimura & Crowd., 1964), a diferença é claramente causada pela alta frequência de poucos alelos em alguns locus, o que diminui a possibilidade de ser herdado dos alelos mais raros. Não existe uma grande diferença entre a heterozigosidade observada e a esperada nos microssatélites na população total. O índice de fixação é sempre baixo.

Os mesmos índices são usados para comparar os grupos cativo e livre (Tabela 9). O número de alelos médio nos dois grupos é menor do que o valor da população total, porém no grupo em cativeiro este número é muito mais baixo. O número efetivo de alelos nos dois grupos não difere muito do valor da população total o que acontece também na heterozigosidade observada e esperada.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) obteve valores médios na maioria dos loci, entre 2,4 e 7,1 indicando a qualidade dos microssatélites como marcadores polimórficos e um nível informativo de médio a alto. A frequência de alelos nulos resulta negativa em dois loci (A20 e A8), mas nos outros se encontra entre valores de 0,02 a 0,14. Isto é importante porque nos indica a probabilidade de 2 a 14% de genótipos que aparecem como homozigotos serem na verdade heterozigotos.

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos como hipótese alternativa obteve um valor de zero para a população total e também para a população em liberdade, já no grupo em cativeiro o número foi bastante baixo, como mostrado na Tabela 10. Os resultados do teste por loci amostra também valores baixos próximos a 0, e sempre menor de 0,2 (Tabela 11). Tudo indica a rejeição da hipótese de deficiência de heterozigotos.

Tabela 8. Medidas de diversidade genética da população total e por locus.

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F	PIC	F(Null)
H127	72	4	1,333	0,528	0,236	0,250	0,251	0,054	0,236427	0,0334
C5	71	6	3,153	1,265	0,507	0,683	0,688	0,257	0,620743	0,1422
B7	64	3	2,453	0,989	0,547	0,592	0,597	0,077	0,5226277	0,0241
A20	72	6	2,899	1,237	0,778	0,655	0,660	-0,187	0,5947228	-0,0995
A8	72	6	2,827	1,190	0,708	0,646	0,651	-0,096	0,5809200	-0,0569
D122	72	7	3,869	1,584	0,597	0,742	0,747	0,195	0,7091951	0,0960
D223	65	2	1,777	0,629	0,400	0,437	0,441	0,085	0,3417386	0,0447
Media	69,714	4,857	2,616	1,060	0,539	0,572	0,576	0,055	0,5146	0,02628
SE	1,358	0,705	0,322	0,141	0,069	0,065	0,065	0,058	-	-

Tabela 9. Medidas de diversidade genética do grupo dos cativos e do grupo dos livres.

Pop		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
Cativos	Mean	19,000	3,714	2,448	0,999	0,579	0,567	0,582	-0,007
	SE	0,000	0,360	0,233	0,093	0,067	0,044	0,045	0,066
Livres	Mean	50,714	4,571	2,638	1,055	0,525	0,568	0,574	0,056
	SE	1,358	0,719	0,342	0,156	0,074	0,072	0,073	0,072

Na: número de alelos; Ne: número efetivo de alelos; I=índice de informação de Shanon; Ho: Heterozigosidade observada; He: Heterozigosidade esperada; uHe Heterozigosidade esperada sem desvio; F: índice de fixação; PIC: Conteúdo de informação polimórfica; F(Null): Frequência de alelo nulo.

Tabela 10: Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos de indivíduos em cativo e livres

População	P-val	S.E.	switches
Cativeiro	0.1277	0.0022	134411.00
Livres	0.0000	0.0000	155254.29
Todos	0.0000	0.0000	144832.64

Tabela 11: Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos por loci

Locus	P-val	S.E.	switches
H127	0.1401	0.0021	58202.50
C5	0.0003	0.0001	118043.50
B7	0.1474	0.0018	242068.50
A20	0.0112	0.0010	85399.00
A8	0.0153	0.0014	72452.50
D122	0.0011	0.0002	100713.50
D223	0.1904	0.0011	336949.00

S.E. Erro estandar; Switches: número de comutações.

4.3.1.2. Desequilíbrio de ligação

No teste realizado no *Arlequin* encontrou-se em várias combinações de locus pareados a dependência das frequências entre eles sendo significativas, isso quer dizer que existe um desequilíbrio de ligação. Estas combinações são C5-A20, H127-B7, C5-D122, A20-A8 H127-A20 e C5-D223 indicando que as frequências gênicas desses microsatélites são estatisticamente dependentes (Tabela 11).

4.3.2. Identificação de indivíduos

Para rotular as identidades das amostras segundo os padrões de microsatélites como provindos do mesmo indivíduo, era necessário que ambos compartilhassem 100% dos alelos. Os resultados da matriz de alelos compartilhados indicou que dois indivíduos foram amostrados mais de uma vez, as amostras L063, L114, L115, L117, L121, L291,

compartilham a totalidade dos marcadores sendo consideradas como amostras de um mesmo indivíduo. Também ocorre a mesma situação nas amostras L159 e L257 como indica na Tabela 12.

Tabela 11: Teste de desequilíbrio de ligação significativo (+) para os microsatélites, nível de significância $p=0,05$.

Locus	H127	C5	B7	A20	A8	D122	D223
H127	*	-	+	+	-	-	-
C5		*	-	+	-	+	+
B7			*	-	-	-	-
A20				*	+	-	-
A8					*	-	-
D122						*	-
D223							*

Tabela 12: Indivíduos compatíveis em mais de 6 loci e a probabilidade de exclusão para identidade individual e de irmãos completos

1° Ind	N° Loci	2° Ind	N° Loci	Loci compatíveis	Prob. de não-excl. Identidade	Prob. não-excl. de irmão completo
L113	7	L115	6	6	3.00E-04	2.66E-02
L113	7	L121	7	7	1.38E-04	1.87E-02
L114	7	L115	6	6	3.00E-04	2.66E-02
L114	7	L117	7	7	1.31E-04	1.62E-02
L114	7	L291	7	7	1.31E-04	1.62E-02
L114	7	L63	7	7	1.31E-04	1.62E-02
L115	6	L117	7	6	3.00E-04	2.66E-02
L115	6	L121	7	6	3.00E-04	2.66E-02
L115	6	L291	7	6	3.00E-04	2.66E-02
L115	6	L63	7	6	3.00E-04	2.66E-02
L117	7	L291	7	7	1.31E-04	1.62E-02
L117	7	L63	7	7	1.31E-04	1.62E-02
L291	7	L63	7	7	1.31E-04	1.62E-02
L159	6	L257	7	6	1.32E-05	1.39E-02

4.3.3. Microsatélites para filiação e identificação no condor andino.

Se obteve a probabilidade de não-exclusão por locus e combinada pode ser entendida como a probabilidade que o conjunto de microsatélites ou marcadores não assignem a identidade ou o progenitor correto, quer dizer uma medida do poder dos marcadores.

O conjunto de microsatélites obteve valores de probabilidade de não-exclusão combinada médios a altos (Tabela 13). Para identificação de um dos progenitores o valor foi de 0,21, para identificar o segundo progenitor conhecendo o primeiro foi de 0,05, para identificação dos dois progenitores foi de 0,007, para diferenciação de indivíduos foi de 0,00003 e para identificar irmãos de ambos os pais foi de 0,01.

Tabela 13: Probabilidade de não-exclusão por locus e combinada

Locus	Probabilidade de Não-Exclusão para:				
	Primeiro Progenitor	Segundo progenitor	Par de Progenitores	Identidade Individual	Identidade de irmão completo
H127	0.968	0.870	0.768	0.576	0.769
C5	0.747	0.587	0.421	0.163	0.449
B7	0.825	0.683	0.533	0.236	0.513
A20	0.764	0.606	0.434	0.179	0.467
A8	0.777	0.624	0.459	0.190	0.475
D122	0.653	0.471	0.275	0.102	0.407
D223	0.904	0.829	0.739	0.412	0.634
Prob. de Não-Excl. combinada	0.2092906	0.0514663	0.0069739	0.0000316	0.0101389

O teste realizado para filiação entre os indivíduos livres está resumido na tabela 14. A tabela resume as comparações que o programa *CERVUS* realizou entre os indivíduos e os possíveis pais. Só os pares que obtiveram o valor LOD mais alto foram incluídos porém isto não é certeza de atribuição de paternidade. Nenhum dos pares candidatos com LOD mais alto foram atribuído como progenitores de algum dos indivíduos. Porém a paternidade individual em nível relaxado foi atribuída nos pares P29 (filho) com L257 (pai), e P33 (filho) com L257 (pai).

Tabela 14. Trio de progenitores candidatos para cada indivíduo, que obtiveram o maior LOD.

Indivíduo			Candidato 1			Candidato 2			Trio candidato	
ID	Prob NE 1P	Prob NE PP	ID	LOD Par	Conf	ID	LOD Par	Conf	LOD trio	Conf
P26	3,21E-01	1,99E-02	L227	1,22E+14	n	L271	2,19E+14	-	5,15E+14	-
P27	3,98E-01	9,14E-03	L59	1,01E+14	n	L194	2,98E+14	-	6,09E+14	-
P28	2,98E-01	2,80E-03	L83B	3,43E+14	-	L247	1,12E+14	n	6,04E+14	-
P29	4,65E-02	6,79E-04	L199	2,77E+14	n	L257	5,39E+14	+	9,16E+14	-
P30	3,73E-01	2,09E-02	L172	6,14E+13	n	L62	3,06E+14	-	5,18E+14	-
P31	2,62E-02	2,36E-05	L144	-5,06E+13	-	L208	8,16E+13	-	3,49E+14	-
P32	1,03E-01	9,89E-04	L83B	-2,46E+13	n	L257	3,63E+14	-	3,94E+14	-
P33	1,90E-01	1,99E-03	L130	9,00E+13	n	L271	5,62E+14	+	7,76E+14	-
P34	2,30E-02	1,58E-05	L52	-7,80E+13	n	L271	4,43E+14	-	4,43E+14	-
P35	2,31E-01	3,00E-03	L156	4,05E+13	n	L194	-8,34E+13	n	2,03E+14	-

Prob NE 1P: Probabilidade de não-exclusão para um único candidato não relacionado; Prob NE PP: Probabilidade de não-exclusão para um par de candidatos não relacionados; LOD Par: LOD entre o candidato progenitor e o indivíduo; LOD trio: LOD entre os dois candidatos com o LOD mais alto e o indivíduo; Conf: Confiabilidade: *, paternidade atribuída em nível estrito 95%; +, paternidade atribuída em nível relaxado 80%; -, candidato mais provável mas paternidade não atribuída; n, não é o candidato mais provável.

4.3.4. Análises de estrutura populacional

Os resultados dos testes no *Structure* analisados no site *Structure Harvester* são mostrados na tabela 12. Na maioria de intervalos testados, quatro clusters foi o número que obteve o maior delta k, esse número foi tomado como a quantidade mais provável de clusters.

Tabela 15. Intervalo de clusters testados no *Structure* e posteriormente analisados no *Structure Harvester*.

Intervalo de clusters	Nº de cluster com maior delta K
1 -5	4
1-8	4
1-10	5
1-12	4
1-15	4

Posteriormente, após o uso do programa CLUMPP observou-se que não existia uma subestrutura ligada aos locais geográficos onde as amostras foram coletadas. Todos os indivíduos tem baixo grau de identidade com qualquer um dos quatro clusters sugerindo miscigenação entre os indivíduos amostrados. Embora nas análises não seja evidente uma forte estruturação, pode se observar apenas certa afinidade entre indivíduos baseado na porcentagem de cada cluster. Esta diferenciação, como pode ser observada na Figura 8, apresenta uma mudança gradual entre a primeira e a última amostra, sendo elas as mais divergentes. A Figura 9 representa a organização dos indivíduos com configuração mais semelhantes um do lado do outro

As análises de estruturação populacional não apresentaram grupos fortemente diferenciados. Os indivíduos com uma configuração genética parecida podem ser agrupados de forma sequencial, mais o agrupamento não tem correspondência com os lugares de amostragem.

A análise de variância molecular (AMOVA) evidenciou que a maior porcentagem da variação se encontra dentro dos indivíduos (93,8%) e o restante se encontra entre os indivíduos (6,2%). A falta de estrutura populacional impediu realizar a análise entre vários grupos.

Figura 8: Gráfico da análises de estruturação no software *Structure*. A organização do gráfico corresponde ao lugar de amostragem, os condores em cativeiros foram colocados juntos devido a que não existe registro da origem da ave antes de permanecer em zoológicos o centro de fauna.

Tabela 16: Análise de variância molecular AMOVA

Fonte da Variação	SQ	CV	V(%)
Entre os indivíduos	146.835	0.12491	6,19645
Dentro dos indivíduos	132.000	189.089	93,80355
Total	278.835	201.579	100,00000

SQ: soma de quadrados; CV: componentes de variância; V(%): Porcentagem da variância.

5. DISCUSSÃO

Espécies animais de grande porte, reprodução lenta e amplo espaço de distribuição geográfica costumam apresentar baixa diversidade e pouca estruturação genética como foi visto em aves e mamíferos como baleias (Hoelzel & Dover, 1991) e ursos (Cronin, Amstrup, Garner, & Vise, 1991) e por isso era esperado que pudessemos encontrar este padrão para os condores.

Hendrickson et al. (2003) tinham sugerido uma situação deste tipo para o condor andino; as análises do DNA mitocondrial mostraram que os cinco haplótipos encontrados não se achavam fortemente separados geograficamente. Os resultados das análises usando microssatélites heteroespecíficos na população do condor andino equatoriano parecem sugerir uma situação parecida, mostrando que a constância deste resultado, mesmo com marcadores fluxo gênico recente e as mudanças antropogênicas impostas nos últimos anos não foram capazes de isolar as populações.

Dados de rastreamento por satélite indicam que os ambientes convenientes são percorridos indiscriminadamente pelos indivíduos abrangendo o território do Equador, o sul da Colômbia e o norte do Peru. Sendo uma explicação plausível para a sutil diferenciação encontrada entre os condores analisados. Então deve-se considerar que esses condores podem ser parte de um conjunto populacional maior distribuído em uma extensa área geográfica além das fronteiras nacionais dos 3 países.

O condor por ser um ave grande e capaz de percorrer grandes distâncias em voo não teria limitações de tipo geográfico, como cordilheiras ou rios que modelassem a estruturação populacional. Mas apesar dessa grande capacidade de voo, as populações distanciadas grandemente ao longo da cordilheira dos andes não seriam capazes de ter cruzamentos entre indivíduos ou migrações significativas em períodos de tempo

correspondentes a uma geração. Qualquer condor que habite entre os territórios do Equador e da Colômbia dificilmente tem a chance de acasalar com um outro indivíduo que habite a cordilheira chilena ou argentina, então cabe a possibilidade de algum tipo de estruturação populacional decorrente da distância como os modelos de isolamento por distância ou steppin-stone descritos por Wright (1934).

Como os dados só confirmam uma débil estruturação dentro da área pesquisada, para conferir se isto acontece para toda a distribuição da ave, são necessários análises que incluam outras áreas da América andina.

Uma diferença notável entre as medias do número de alelos observados (4,8) e efetivos (2,6) da população toda sugere que estatisticamente só a metade dos alelos tem chances de ser herdada para as seguintes gerações. Esta diferença ocorre quando a frequência de um ou poucos alelos é muito alta, e a maioria dos alelos restantes são relativamente escassos, o que incrementa a probabilidade desses alelos raros de desaparecer na seguinte geração o que causaria uma perda da diversidade genética observada na população amostrada (Kimura & Crowd, 1964). Tendo em mente que a variabilidade dos loci analisados serve como imagem da variabilidade existente no genoma todo, a diminuição dela é muito perigosa para uma população com estas características populacionais e biológicas, tornando ainda mais necessárias pesquisas genéticas para sua conservação. Apesar da diversidade genética não ser muito alta, os valores do índice de fixação por locus e na população total são baixos (0,055), e, a diferença entre a heterozigosidade observada (0,539) e a esperada (0,572) sugere que pode-se considerar que esta população não apresenta acasalamentos seletivos, ou seja, não foi observado endogamia. Isto também pode ser explicado pela ampla distribuição geográfica e a grande capacidade de dispersão mediante o voo da espécie

Um fato importante de manter em mente é que o resultado do teste Hardy-Weinberg na população apresenta excesso de heterozigotos. Porém, explicar isso como consequência do efeito Wahlund, ou existência de subestrutura populacional se torna difícil, pois já foi visto que não é encontrado subpopulações mesmo levemente divididas

A estruturação por distância é um cenário possível, levando em consideração a área de distribuição da espécie. Então existe a possibilidade que as amostras analisadas nesta pesquisa provavelmente fazem parte de vários grupos populacionais pouco diferenciados, medianamente distantes no território mas que se sobrepõe nas áreas que percorrem, e com o suficiente fluxo gênico entre eles para manter certa semelhança nos

mais próximos, porém suficientemente diferentes como para explicar os resultados da clusterização e do excesso de heterozigotos.

A análise da variância molecular AMOVA indica que a maior parte da variação ocorre dentro dos indivíduos (93,8%) o que pode ser interpretado como a inexistência de subestrutura populacional. Os indivíduos amostrados podem ser considerados como parte de uma população com cruzamentos panmíticos. O resultado da variância molecular reforça a ideia da falta de estruturação entre as amostras.

O desequilíbrio de ligação tem algumas implicações importantes nos estudos populacionais e nos testes de paternidade. Em alguns casos pode se dever a proximidade física dos loci analisados, o que só pode ser comprovado experimentalmente através do mapeamento genético e a localização dos loci ligados (Morton, 2005), a estruturação da população pode também ser um fator importante entre outros, em qualquer caso é importante notar que o desequilíbrio de ligação pode produzir a sobre estimação da máxima verossimilhança das inferências para paternidade ou identidade (Marshall et al., 1998). Para o grupo de microssatélites usados nesta pesquisa onde teve vários que apresentaram desequilíbrio de ligação significativo entre eles implica que o poder de diferenciação é menor do que o calculado devido a que em teoria se pode prescindir daqueles marcadores que estariam no mesmo cromossoma para paternidades ou identificação, pois a informação proporcionada seria redundante.

O padrão de alelos de grupo de marcadores polimórficos e não ligados constitui uma identidade genética única que permite identificar individualmente um grupo de amostras. Neste caso de novas amostragens nos locais de coleta ou de captura de condores livres. Desta forma se pode conseguir uma quantificação do número de indivíduos livres, evitando erros de contagem que podem acontecer na observação visual, e assim obter um dado mais próximo ao número real de condores no país. A capacidade do grupo de marcadores para identificar entre indivíduos computada no software *CERVUS* e expressada como a probabilidade de não-exclusão foi de 0,0000316, o que é interpretado como uma baixa probabilidade de identificar duas amostras de dois indivíduos diferentes como o sendo mesmo indivíduo, ou o que é o mesmo que a capacidade de 99,9968% de sucesso. O valor para a identificação de irmãos completos foi de 0,0101389, mesmo que maior do que o valor para identificação individual a prova ainda tem a capacidade de identificar 98,986% das vezes a relação de irmãos do mesmos dois pais.

A utilidade do conjunto de marcadores como prova de paternidade não foi tão alta como no caso anterior. A probabilidade de não-exclusão para um progenitor sem conhecer o outro foi de 0,2092906, isto significa que a chance de assinalar um progenitor errado para um indivíduo é de 21% o que se considera bastante alto. Porém quando conhecido um dos progenitores a probabilidade muda para 0,0514663, dando um maior poder de identificação neste caso. Quando se trata de atribuir os dois progenitores o valor cai para 0,0069739, assim podemos dizer que a probabilidade de acertar os dois pais de um grupo de candidatos seria de 99,303%, o que é um resultado importante no caso, devido ao número pequeno de indivíduos que existem no país e próximo às suas fronteiras, poder identificar indivíduos e atribuir paternidade corretamente é um recurso valioso para qualquer programa de conservação e reintrodução e em uma população pequena como é a do condor no Equador vai permitir ter um panorama claro das relações de entre eles.

No teste realizado para paternidade entre os indivíduos livres tomando como possível progênie os indivíduos com marcadores por satélite e que se tem certeza que são jovens sub-adultos e como possíveis progenitores as amostras anônimas obtidas em liberdade, não foi atribuída a paternidade para nenhum dos pares com o maior LOD. Mesmo assim foi atribuída paternidade individual a alguns dos candidatos no modo relaxado de 80% de confiabilidade, o indivíduo L257 como progenitor de P29 e o indivíduo L271 como progenitor de P33. Existe uma probabilidade alta de que o desequilíbrio de ligação diminuía o poder de grupo de marcadores como teste de paternidade devido a que alguns alelos não se herdam independentemente, então se pode prescindir de um dos marcadores ligados e obter resultados parecidos, já que de qualquer um dos dois marcadores ligados se obteria a mesma informação. Um teste de paternidade ideal seria conformado por marcadores não ligados sendo assim mais informativo sobre a diversidade do genoma.

Na identificação de indivíduos, como esperado, a origem anônima da maioria das amostras de penas fez com que várias delas fossem de indivíduos repetidos. No caso de um desses indivíduos, várias penas coletadas (L114, L115, L117, L121) no mesmo dia e no mesmo local (13 de março do 2012 - Peñon condor) resultaram pertencer a ele, e também outras duas penas coletadas (L063) em local geográfico e um ano depois (3 de março de 2013 – San Antonio de Pichincha). O outro indivíduo amostrado duas vezes foi também encontrado em datas e locais diferentes (L062, San Antonio de Pichincha, 3 de março de 2013; e L257 Antisanilla, 9 de setembro de 2014), mais de um

ano depois. Identificação realizada em duas regiões do país e com um grande lapso de tempo entre amostragem evidencia a importância da padronização do teste de molecular, como uma possível ferramenta para manter um registro de movimentação por meio de amostragens não invasivas.

Um efeito esperado do projeto é incentivar o interesse de pesquisadores de outras áreas e países envolvidos com o condor sob o ponto de vista genético, e estender a análise para a grande parte da geografia dos Andes, para obter um diagnóstico da espécie na maior parte de sua área de extensão. Também dar visibilidade os esforços científicos de vários profissionais comprometidos com a conservação, chamando a atenção com este projeto de uma espécie emblema, para trazer à superfície o trabalho anônimo de pesquisadores de espécies menos conhecidas pela opinião pública.

Os resultados da diversidade genética da população do país ajudarão na tomada de decisões sobre o manejo da reprodução de aves em cativeiro e reintrodução dos seus filhotes em áreas de condores livres com a menor semelhança genética possível. Também serão úteis na tomada de decisões largamente discutidas, como é a introdução de condores de outros países com populações muito maiores e estáveis onde a perda de indivíduos não foi tão acelerada como foi o caso do Equador.

6. CONCLUSÕES

A população do condor-dos-andes no Equador percorre a extensão total do país, em voo, com grande facilidade, de forma que sua área de distribuição também inclui áreas dos países vizinhos. Por isso não se observam limitações que gerem estruturação populacional no grupo analisado, geneticamente a totalidade das amostras constituem membros de uma população.

Esta população não pode ser considerada como endogâmica segundo os resultados obtidos. Mesmo assim a diversidade genética parece ser baixa e com uma probabilidade importante de perda de alelos no futuro. Esse resultado afeta os programas de conservação e os incita a ser cuidadosos nos cruzamentos e liberações de aves, visando a preservação da diversidade da espécie.

O uso de marcadores heteroespecíficos é útil para resolver rápida e economicamente a falta de marcadores próprios da espécie, porém é sempre melhor

possuir ferramentas desenhadas na mesma espécie que evitem problemas como frequências consideráveis de alelos nulos ou desequilíbrio de ligação entre os loci analisados.

Foi comprovado que é possível usar um método não invasivo para amostragem e identificação de indivíduos livres como método para registrar a população e os lugares por onde se distribui.

7. RECOMENDAÇÕES

Existe a possibilidade de encontrar algum tipo de estruturação populacional na espécie do condor, porém seria no modelo de isolamento por distância. Para comprovar essa hipótese é necessário realizar uma ampliação da pesquisa, atingindo locais do habitat do condor extremamente distantes entre eles através de novas amostragem em vários países da América do sul como Argentina, Bolívia e Chile.

Para poder avaliar essa possibilidade também é necessário possuir ferramentas moleculares mais poderosas e mais específicas que melhorem a descrição da diversidade genética de uma espécie com pouca população como o condor.

8. REFERÊNCIAS

- Alattal, Y., AlGhamdi, A., & Alsharhi, M. (2014). Population Structure of the Yemeni Honey Bee (*Apis mellifera jemenitica*) Entails an Urgent Conservation Strategy in Saudi Arabia. *Journal of Entomology*, 11(3), 163-169.
- 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.
- Bonatti, V., Simões, Z. L. P., Franco, F. F., & Francoy, T. M. (2014). Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, 101(1), 17-24.

- Bruford, M. W., Bradley, D. G., & Luikart, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4(11), 900-910.
- CITES. (1973). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: Cathartidae, New World Vultures. Washington DC, EEUU: CITES.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1(5), 1-5.
- Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10, 783-796.
- Crispo, E., Moore, J. S., Lee-Yaw, J. A., Gray, S. M., & Haller, B. C. (2011). Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals. *BioEssays*, 33(7), 508-518.
- Cronin, M., Amstrup, S., Garner, S., & Vise, A. (1991). Interspecific and intraspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (*Ursus*). *Canadian Journal of Zoology*. 69(12), 2985–2992.
- Del Hoyo, J., Elliott, A., & Sargatal, J. (1994). Handbook of the birds of the world-New World vultures to guinea fowl (Vol. 2). Barcelona, Espanha: Lynx Editions.
- de la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., & Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40(3), 263-284.
- Díaz, 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.
- Drummond, A., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185.

- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, S. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, And R. J. G. Dawson. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071–1075.
- Groom, M. J., Meffe, G. K., & Carroll, C. R. (2006). *Principles of conservation biology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Gordillo, S. (2002). El cóndor andino como patrimonio cultural y natural de Sudamérica. *Actas Primer Congreso Internacional de Patrimonio Cultural, Córdoba, Argentina*.
- 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.
- Hoelzel, A., & Dover, G. (1991). Genetic differentiation between sympatric killer whale populations. *Journal of Heredity*, 66(1), 191–195.
- Hogan, F. E., Cooke, R., Burrridge, C. P., & Norman, J. A. (2008). Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Molecular Ecology Resources*, 8, 561–567.

- Hull, J. M., Tufts, D., TOPINKA, J., May, B., & Ernest, H. B. (2007). Development of 19 microsatellite loci for Swainson's hawks (*Buteo swainsoni*) and other buteos. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 346-349.
- Jaffé, R., Pope, N., Acosta, A. L., Alves, D. A., Arias, M. C., De la Rúa, P., ... & Tavares, M. G. (2016). Beekeeping practices and geographic distance, not land use, drive gene flow across tropical bees. *Molecular Ecology*, 25(21), 5345-5358.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806.
- Jensen, A. B., Palmer, K. A., Boomsma, J. J., & Pedersen, B. V. (2005). Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology*, 14(1), 93-106.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106.
- Kimura, M., & Crowd, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725-738.
- 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.A. (2007). Biología y conservación del Cóndor Andino (*Vultur gryphus*) en Argentina. *El hornero*, 22(2), 149-158.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. And Pemberton, J. M. (1998), Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639–655.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador-MAE. (2009). Estrategia Nacional para la Conservación del Cóndor Andino. Grupo de trabajo para la conservación

del Cóndor Andino. Quito-Ecuador. Disponivel online:
<http://suia.ambiente.gob.ec/documents/10179/346519/CONDOR+ANDINO.pdf/424dc796-f8ac-4dd3-b943-a325bff109f9>

- Morton, N. E. (2005). Linkage disequilibrium maps and association mapping. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1425-1430.
- Naveda-Rodríguez A, Vargas FH, Kohn S, Zapata-Ríos G (2016) Andean Condor (*Vultur gryphus*) in Ecuador: Geographic Distribution, Population Size and Extinction Risk. *PLoS ONE*, 11(3):
- Nazareno, A. G., & Dos Reis, M. S. (2014). Where did they come from? Genetic diversity and forensic investigation of the threatened palm species *Butia eriospatha*. *Conservation genetics*, 15(2), 441-452.
- Oleksa, A., Chybicki, I., Tofilski, A., & Burczyk, J. (2011). Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research*, 50(2), 116-129.
- Park, S. (2001). MS_Toolkit: Excel add-in tool package for microsatellite data. *Genetics Department, Trinity College, Dublin*. Parker, H. G., Kim, L. V., Sutter, N. B., Carlson, S., Lorentzen, T. D., Malek, T. B., ... & Kruglyak, L. (2004). Genetic structure of the purebred domestic dog. *science*, 304(5674), 1160-1164.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks, *Trends in Ecology & Evolution*, 16(1), 37-45.
- Primmer, C. R., & Ellegren, H. (1998). Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, 15(8), 997-1008.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.

- Ralls, R., Ballou, J.D., Rideout, B.A., and Frankham, R. (2000). Genetic management of chondrodystrophy in California condors. *Animal Conservation*, 3, pp 145-153.
- Romanov, M. N., Koriabine, M., Nefedov, M., de Jong, P. J., & Ryder, O. A. (2006). Construction of a California condor BAC library and first-generation chicken–condor comparative physical map as an endangered species conservation genomics resource. *Genomics*, 88(6), 711-718.
- 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.
- Rosenberg, N. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Rousset, F., (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- Schenekar, T., Lerceteau-Köhler, E., & Weiss, S. (2014). Fine-scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post-glacial colonization and a pre-dominance of natural versus anthropogenic admixture. *Conservation genetics*, 15(3), 561-572.
- Templeton, A. R. (2006). *Population genetics and microevolutionary theory*. Hoboken, N.J: Wiley-Liss.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114.
- Zayed, A. (2004). Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. *Heredity*, 93(6), 627-630.