

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Facultad de Ciencias y Filosofía



Desarrollo y validación de Marcadores genéticos

Microsatélites de Alpacas (*Vicugna pacos*)

conservados en rumiantes domésticos

Bach. Irene Rosa Maria Delgado de la Flor Montauban

Tesis para optar por el Título de Licenciado de Biología

Lima - Perú

2011

Dr. José R. Espinoza Babilón
Asesor

Jurado de Tesis

Dra. Margarita Arana
Presidenta

Dr. Guillermo Leguía
Vocal

Dr. Luis Destéfano
Secretario

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1 Marcadores genéticos	4
1.1 Polimorfismo de fragmentos de restricción	5
1.2 Polimorfismo de fragmentos amplificados	6
1.3 DNA polimórfico amplificado al azar	7
1.4 Polimorfismo de Nucleotido Simple	8
1.5 Marcadores Microsatélites	10
1.6 Parámetros genéticos	15
II. OBJETIVOS	19
1. Objetivo general	19
2. Objetivos específicos	19
III. METODOLOGIA	20
1. Localización del estudio	20
2. Animales	20
3. Colección de muestra	21
4. Extracción de ADN genómico	21
5. Elección de marcadores microsatélites con capacidad de amplificación multiespecie	22
6. Tamizado de marcadores microsatélites con capacidad de amplificación en alpacas	26
6.1 Amplificación de ADN microsatélites	26
6.2 Selección de microsatélites con amplificación en alpacas	27
7. Identificación de secuencias microsatélites	30
IV. RESULTADOS	32
1. Extracción y cuantificación de ADN	32
2. Amplificación de los Microsatélites	32
3. Identificación de marcadores microsatélites en alpacas	39
4. Caracterización del marcador BM1818	42
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	50
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	58

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Diversidad alélica.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AFLP	Polimorfismo de fragmento amplificado
APS	Amonio persulfato
dNTP	2'-deoxinucleotidos 5'-trifostato
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
h	Diversidad génica.
H	Heterocigosidad.
H _E	Heterocigosidad esperada.
H _O	Heterocigosidad observada.
K3E	Potasio -EDTA
LB	Medio de cultivo Luria-Bertoni
MI	Meiosis Informativa
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
Mg ⁺² .	Magnesio

mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar.
ng	Nanogramos
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PE	Probabilidad de exclusión.
PE1	Probabilidad de exclusión total para excluir un candidato a pariente dado solo el genotipo de la cría.
PE2	Probabilidad de exclusión total para excluir un candidato a pariente dado el genotipo de la cría y de otro pariente.
PE3	Probabilidad de exclusión para un par de candidatos a parientes.
PEA	Probabilidad de exclusión acumulada o total.
PIC	Contenido de información polimórfica.
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
RFLPs	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
SNPs	Polimorfismos de nucleótidos únicos.
SSRs	Simple secuencias repetidas.
STRs	Repeticiones cortas en serie.

TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina
Tris-HCl	Tris – Ácido Clorhídrico.
U	Unidad.
μL	Microlitro.
μM	Micromolar.
μg	Microgramo

RESUMEN

El presente trabajo busca identificar nuevos marcadores genéticos microsatélites en alpaca (*Vicugna pacos*) en base a la conservación de secuencias de ADN en el genoma de la familia Bovidae, particularmente vacunos, ovinos y caprinos, y la familia Camelidae. Se seleccionaron 38 marcadores microsatélites reportados en bovidos en base a los siguientes criterios: capacidad de amplificación multiespecie, contenido de información polimórfica (PIC), grado de heterocigosidad (HE), probabilidad de exclusión (PE), número de alelos (A) y número de meiosis informativas, siguiendo un algoritmo de selección. Estos marcadores fueron evaluados empleando muestras de ADN de alpaca de 6 localidades del Perú, y muestras de ADN control de bovino, ovino y caprino. De los 38 marcadores evaluados, doce de ellos (31.6%) presentaron amplificación cruzada. Solo el AGLA293 presentó amplificación específica de un fragmento de 150 pares de bases, sin embargo el fragmento amplificado no presentaba una secuencia microsatélite. Mientras BM1818 presentó una amplificación no específica de un fragmento de 236 pares de bases que incluía una secuencia microsatélite dinucleotido (CA)₁₀ obteniéndose una alta similaridad con una secuencia microsatélite reportada en caballo (*Equus caballus*) (e-value: 3.00E-33). Los resultados sugieren que la aproximación utilizada (amplificación cruzada) muestra una baja tasa de eficiencia (1/38; 2.63%) para la generación de nuevos marcadores microsatélites en la familia Camelidae.

ABSTRACT

This thesis research project aimed at developing new microsatellite genetic markers in alpacas (*Vicugna pacos*) based on the genomic DNA sequence conservation between the Bovidae family, particularly cattle, sheep and goat specimens, and the Camelidae family. Thirty eight microsatellite markers reported for the Bovidae family were chosen using a selection algorithm that included characteristics such as multispecies amplification ability, polymorphic index capacity (PIC) score, level of heterocigosity (HE), the exclusion probability (PE), the number of alleles (A) and the number of informative meioses. The selected markers were tested by PCR amplification using alpaca's DNA samples obtained from 4 different Peruvian locations and DNA samples from sheep, goat and cattle individuals. Only 12 of the 38 markers tested (31.6%) showed cross-amplification. The AGLA293 marker generated a 150bp DNA fragment that did not include a microsatellite sequence in it. Another marker, the BM1818, also showed unspecific amplification of a 236bp product and sequencing results demonstrated it included a dinucleotide microsatellite sequence (CA)₁₀, which has a high degree of similarity with a microsatellite sequence already reported in horses (*Equus caballus*) (e-value: 3.00E-33). Our results suggest that cross-amplification of conserved genetic markers in Bovidae has a low efficiency (1/38; 2.63%) in generating new microsatellites markers in the Camelidae family.

I. INTRODUCCION

Existen 4 especies de camélidos sudamericanos, dos silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) y dos domésticos: la llama (*Lama lama*), y la alpaca (*Vicugna pacos*). La alpaca es un mamífero ungulado que habita en las zonas altoandinas de Sudamerica. La fibra constituye el principal producto de la explotación alpaquera y por consiguiente, la alpaca es considerada un recurso de importancia socioeconómica para los pobladores altoandinos.

La alpaca se clasifica taxonómicamente dentro del Reino Animalia, Phylum Chordata, Clase Mamalia, Orden: Artiodactyla, Suborden: Tylopoda, Familia Camelidae, Genero *Vicugna*, Especie *V. pacos*. Los miembros del orden Artiodactyla se caracterizan por presentar cascos divididos que simulan un par de dedos. El origen del orden Artiodactyla se remonta hacia comienzos del Eoceno aproximadamente 54 millones de años atrás. Los artiodactilos están actualmente compuestos por 3 subórdenes conocidos: Suiformes, Tylopodas y Rumiantes¹. El suborden Suiformes se encuentra conformado por los cerdos, hipopótamos; el suborden Tylopoda comprende a los Camelidos, y el suborden Ruminantia comprende a los Tragulidae, Giraffidae, Cervidae, Moschidae, Antilocapridae y Bovidae.

En la actualidad los únicos representantes del Suborden Tylopoda son los miembros de la Familia Camelidae, la cual comprende a los camélidos sudamericanos (alpaca, vicuña, guanaco y llama) y a los camélidos del viejo mundo (camellos y dromedarios). El suborden Tylopoda aparece en Norte America entre 40 o 45 millones de años atrás, sin embargo la divergencia evolutiva entre sus miembros se dio hace aproximadamente 11 millones de años. Esta divergencia dio origen a dos subfamilias: la Lamini comprendida por los camélidos sudamericanos y la Camelini comprendida por los camélidos del viejo mundo². Las dos subfamilias iniciaron un proceso de migración hacia America del Sur (Lamini) y Asia (Camelini), asentándose en esas zonas dando origen a las especies actuales. En la actualidad no existen miembros de la familia Camelidae en America del norte, aunque si se pueden encontrar restos fósiles de ellos.

La subfamilia Lamini está compuesta por dos géneros, el genero *Vicugna* y el género *Lama*. Estudios moleculares han dilucidado las relaciones evolutivas entre las especies de camélidos sudamericanos, demostrando que el guanaco y la llama pertenecen al genero *Lama* mientras que la vicuña y la alpaca pertenece al género *Vicugna*³ atribuyéndose el origen de la alpaca a un proceso de domesticación de la vicuña en los andes peruanos hace aproximadamente 6000 años⁴.

En el Perú existen 3 millones de alpacas⁵ lo que nos convierte no solo en el país con el mayor número de ejemplares sino también en el mayor productor de fibra de alpaca. La fibra de alpaca se clasifica de acuerdo a su finura, la cual está dada por el

diámetro de la fibra, siendo un indicador de calidad⁶. Sin embargo, en los últimos años la calidad de la fibra ha ido disminuyendo de forma progresiva⁷ debido principalmente a un mal criterio e inadecuado control en la selección y manejo reproductivo. La calidad de la fibra es una característica de tipo cuantitativa, es decir es una característica determinada por la expresión de más de un gen, lo cual complica la identificación de asociaciones de tipo fenotipo-genotipo.

Existen técnicas que permiten rastrear la segregación de una característica cuantitativa mediante el uso de un gran número de marcadores genéticos. En la actualidad existen alrededor de 100 marcadores genéticos reportados y de utilidad en alpacas; constituyendo un número insuficiente para poder evaluar la segregación de un carácter cuantitativo como la finura de fibra^{8,9,10,11,12,13,14}

La información revisada muestra la ausencia de información de acceso libre acerca del genoma de la alpaca, existen 2 proyectos que actualmente trabajan en ello, uno de la Universidad de Washington y otro de Instituto Broad sin embargo no se encuentra información disponible de la aproximación empleada. Esta información puede ser encontrada en el NCBI o algún buscador libre. Hasta la fecha no hay publicaciones sobre el tema. La ausencia de esta información dificulta la posibilidad de conocer la ubicación de los marcadores genéticos reportados para alpaca. En el Genbank se encuentran reportadas 778923 secuencias nucleotídicas correspondientes a varios genes como el de citocromo b¹⁵ proteína VHH¹⁶ entre otras secuencias, muchas de ellas solo han sido acopladas al Genbank y los artículos correspondientes aun no han sido

publicados. En el Genbank también se encuentran reportados 7286 EST publicados por investigadores de la Universidad Agrícola de Shanxi (Shanxi Agricultural University).

1 Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son alelos asociados a un fenotipo fácilmente detectable que son empleados para identificar o seleccionar un gen ligado, un cromosoma, una célula o un individuo¹⁷ Un marcador genético se caracteriza por localizarse en una región única del genoma, ser polimórficos, insensible al medio ambiente y su alelo de menor frecuencia se presenta en una frecuencia mayor al 1%.

No existe una sola clasificación para los marcadores genéticos. Cada una de las varias clasificaciones que existen, se basan en distintas características de intereses que estos marcadores presentan, como el tipo de secuencia, el número de loci que te permite analizar y el tipo de información que brindan. El tipo de secuencia que conforma el marcador indica si este es de tipo 1 o de tipo 2, siendo las de Tipo 1 aquellas secuencias que comprenden los genes funcionales o estructurales y de tipo 2 las que comprenden las secuencias anónimas o repetitivas¹⁸ El número de loci que permite analizar, clasifica como marcadores “single-locus” o unilocus a aquellos que permiten estudiar un solo locus a la vez, como las regiones de DNA nuclear de copia única (scnDNA) y los SNPs ; o como marcadores multi-locus a aquellos que permiten analizar varios locus a la vez,

como los RFLP, RAPDs y AFLPs¹⁹ Otro tipo de clasificación divide a los marcadores entre aquellos que pueden diferenciar un homocigoto de un heterocigoto y aquellos que no lo hacen, los que permiten observar esta diferencia se denominan marcadores codominantes y aquellos que no brindan este tipo de información se denominan marcadores dominantes²⁰

La vasta información que aportan los marcadores genéticos es empleada para la generación de programas de manejo y conservación²¹ para establecer relaciones de parentesco, inferir relaciones evolutivas y establecer diferencias dentro y entre poblaciones de animales.^{22,23,24}

1.1 Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)

1.1.1 Definición

La técnica de RFLP consiste en emplear enzimas de restricción para cortar una secuencia de ADN corta. El empleo de una o varias enzimas de restricción permitirá cortar el fragmento de ADN a estudiar, en uno o varios pedazos mas pequeños, generando un patrón particular de corte en cada caso. Diferentes individuos podrían generar distintos patrones de corte debido a las variaciones en la secuencia trabajada²⁰

1.1.2 Características

El RFLP es un marcador de tipo codominante, m, que permite analizar varios alelos a la vez y es altamente reproducible, sin embargo es una técnica difícil de realizar y bastante laboriosa.

Esta técnica se empleadas en estudios forenses²⁵ identificación de especies^{26,27} identificar marcadores y elaborar mapas de ligamiento²⁸ y evaluar desequilibrio de ligamiento.²⁹

1.2 Polimorfismo de fragmente amplificado (AFLP)

1.2.1 Definición

La técnica de AFLP consistes en cortar un fragmento de ADN mediante enzimas de restricción y luego unir a los extremos de cada fragmento un adaptador al cual se une un cebador de secuencia conocida que permita ampliar el fragmento mediante la técnica de PCR.^{30,20,31,32}

1.2.2 Características

El AFLP es un marcador dominante, multilocus, de elevado polimorfismo, alta reproducibilidad e informatividad.³²

Es esta técnica es ampliamente utilizadas en estudios de ecología y genética molecular³³, filogenética³² diversidad genética³⁴, evolución y taxonomía.³⁵ Sin embargo en la bibliografía revisada no muestra la aplicación de esta técnica para estudios en camélidos sudamericanos.

1.3 DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD)

1.3.1 Definición

Consiste en amplificar de forma aleatoria fragmentos de ADN, para ello se emplean cebadores pequeños no específicos que son capaces de unirse a varios sitios del genoma permitiendo la amplificación de una gran cantidad de fragmentos. Esto permite identificar polimorfismos en la secuencia y con ello diferenciar distintos individuos o alelos.^{20,30,36}

1.3.2 Características

Es un marcador de tipo dominante, multilocus y bastante polimórfico, sin embargo es una técnica con bajo índice de reproducibilidad y puede ser difícil de emplear si no se cuenta con herramientas especializadas necesarias para ello.

La técnica RAPD es ampliamente empleada en mapeo genético³⁷, programas de reproducción³⁶ y genética poblacional.^{38,39} En alpacas se ha empleado esta técnica para analizar la presencia de individuos híbridos y puros pero sin mucho éxito.⁴⁰

1.4 Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)

1.1.4.1 Definición

Se denomina SNP al cambio en un nucleótido en una secuencia de ADN^{41,42}, sin embargo para que una sustitución de nucleótido única sea considerada un SNP, esta debe de presentarse en una frecuencia alélica mayor al 1%.^{43,41}

1.4.2 Características

Los SNP son considerados marcadores bialélicos principalmente por dos razones: a) la baja frecuencia de sustitución de nucleótidos únicos ($1 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-9}$

por nucleótidos por año), razón por la cual se generan los SNP^{44,45} y b) el sesgo en los tipo de mutación, ocurre con mayor frecuencia una transición que una transversión. En roedores y en humanos la tasa de transición/transversión es de 1.4⁴⁶ mientras que en aves la tasa es mayor que en mamíferos con valores de 2.3⁴⁷ a 4⁴⁸ a partir de ESTs y 2.36 de secuencias no codantes.⁴¹

Otras características de los SNP es que son marcadores codominantes y presentan una herencia de tipo mendeliana simple. Sin embargo el contenido de información polimorfa (PIC) es menor que el de los marcadores microsatélites, lo que los hace menos informativos a nivel individual pero esto se balancea debido a una mayor abundancia de ellos.⁴²

Los SNPs pueden ser encontrados tanto en regiones codantes como no codantes del genoma aunque la mayoría de ellos se encuentra en regiones no codantes⁴⁹. El 90% de la variación genética en humanos corresponde a las SNP⁵⁰ y se estima la presencia de 1 SNP cada 1331 pb de ADN genómico en humanos⁴¹. De los 5 millones de SNPs reportados en humanos 4 millones de ellos han sido validados.⁵¹

El empleo de SNPs presenta ciertas limitaciones como el bajo nivel de polimorfismo en relación a otros marcadores genéticos empleados, lo costoso de la técnica y una limitada disponibilidad de bases de datos e información, a excepción del caso del hombre.⁵² Sin embargo en la actualidad es una técnica cada vez mas empleada.

Los SNP se usan en el mapeo genético, en estudios de asociación, en genética poblacional, evolutiva ⁴⁹ y genética forense. ⁵¹

1.5 Marcadores Microsatélites

1.5.1 Definición

Los marcadores genéticos microsatélites, conocidos también como SSR (simple sequence repeats) o STR (short tandem repeats), son secuencias repetitivas con unidades de repetición de hasta 6 pares de bases que se encuentran distribuidas a lo largo de todo el genoma eucarionte ^{53,30,54,55} y pueden ser di-, tri-, tetra-, penta-, o hexanucleotidos. ³⁰ (Figura 1)

1.5.2 Características

Los marcadores microsatélites se caracterizan por tener una herencia de tipo mendeliana simple, una distribución frecuente en el genoma, ser codominantes y tener un alto grado de polimorfismo (presencia de múltiples alelos). ³⁰

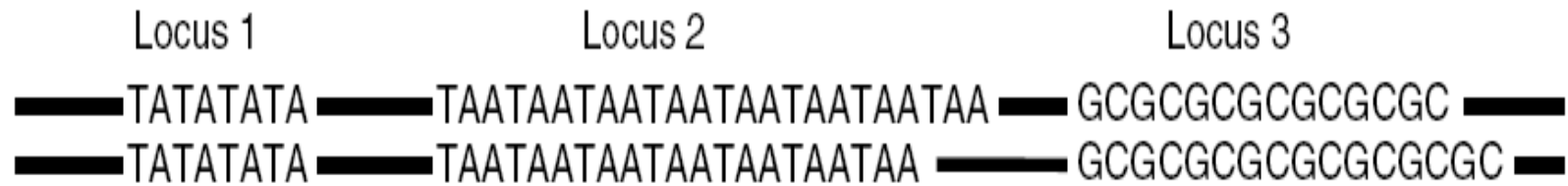


Figura 1. Esquematización de tres loci microsatélites (TA)_n, (TAA)_n y (GC)_n. Se aprecia que el locus 1 (TA) se encuentra en estado de homocigosis, mientras que los locus 2 (TAA)₇, (TAA)₈ y el locus 3 (GC)₇, (GC)₈ se encuentran en estado de heterocigosis. Modificado de Freeland (2005)

Estas características determinan que en la actualidad sean los marcadores moleculares mas utilizados en estudios de genética poblacional⁵⁶, variabilidad poblacional⁵⁷, genética de la conservación⁵⁸, relaciones de parentesco^{59,60} y generación de mapas de ligamiento en mamíferos.⁶¹

La distribución de los microsatélites a lo largo del genoma se encuentra influenciada principalmente por dos factores: i) el tipo de secuencia dentro del genoma, siendo mas frecuente en zonas no codantes en comparación con zonas codantes¹⁸ esto se cumple para la mayoría de los casos a excepción de los microsatélites trinucleótidos debido a que estos no alteran el marco de lectura de un gen⁶². ii) la composición de la secuencia repetida, siendo las secuencias dinucleótidas las más frecuentes (30 a 67% del total de microsatélites). En el genoma de los vertebrados, las repeticiones dinucleótidas mas frecuentes son (AC)_n y (GT)_n.⁵⁴

1.5.3 Estabilidad

Los microsatélites presentan una tasa mutacional de $10^{-4} - 10^{-5}$ eventos por locus por replicación la cual es mucho mayor que la del resto del genoma (10^{-6}).³⁰ Sin embargo esta tasa mutacional no es constante y varía de una especie a otra.

Se postula que este alto grado de mutación se debe a errores de alineamiento entre las hebras y a un resbalamiento de la ADN polimerasa durante la replicación del ADN.³⁰ A diferencia del caso de una hebra de secuencia no repetitiva, la secuencia

repetitiva de un microsatélites favorece, durante el proceso de síntesis de la hebra complementaria, la generación de un desfase al momento del alineamiento ocasionando la síntesis de un mayor o menor número de repeticiones, generando la aparición de nuevos alelos en un marcadores microsatélites.

Se considera a la recombinación otra posible causa de la variación del número de repeticiones presentes en un microsatélite; al comparar los rangos de mutación de los microsatélites entre células en proceso de mitosis y células en proceso de meiosis, en levadura, se observa que son muy similares, sin embargo el grado de recombinación en células en meiosis es mucho mayor.⁶²

1.5.4 Evolución

Las secuencias que flanquean a los microsatélites suelen ser secuencias únicas⁵⁶ las cuales sirven para el diseño de cebadores que son utilizados para amplificar el marcador microsatélite mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas secuencias tienden a ser altamente conservadas entre especies que se encuentran cercanamente relacionadas por lo que en ciertas ocasiones puede observarse amplificación cruzada.^{63,30,64} Estudios señalan la presencia de amplificación cruzada entre especies que divergieron hasta 470 millones de años atrás.¹⁸

Se han reportado 1516 marcadores microsatélites putativos⁶⁵ y aproximadamente 100 marcadores microsatélites validados para camélidos sudamericanos.^{8,9,10,11,12,13,14} La mayoría de ellos fueron identificados a partir de ADN genómico de camélidos sudamericanos.^{11,12,13,14} Se observa un 100% de amplificación cruzada entre las especies de la subfamilia Lamini: llama- guanaco¹⁴, alpaca llama guanaco^{11,12,13}, lo que indica que las especies dentro de la subfamilia Lamini son evolutivamente muy cercanos.

Sin embargo también se observa un alto nivel de amplificación cruzada entre los camélidos sudamericanos y los camélidos del viejo mundo.^{66,67,8} Mariasegaran reporta que el 75% (6/8) de los marcados generados para dromedarios (*Camelus dromedarios*) muestran amplificación en alpacas.⁶⁶ Jianlin y col reporta que el 95% (19/20) de los marcadores generados para camélidos sudamericanos amplifican en dromedarios y bactrianos (*Camelus bactrianus*).⁶⁷

Distintos estudios señalen la presencia de amplificación cruzada de marcadores microsatelites entre diferentes especies de rumiantes como vacunos, ovinos y caprinos^{68,69,70,71} debido a la conservación de las secuencias de flanqueantes (cebadores). La conservación de las secuencias flanqueantes en microsatélites de rumiantes y camélidos podría ocurrir debido a su cercanía evolutiva, permitiendo la amplificación cruzada, aunque en menor grado en alpacas.

1.6 Parámetros Genéticos

1.6.1 Polimorfismo genético

El Polimorfismo genético es la presencia de dos o más alelos asociados a un locus, en donde el alelo más raro debe de presentarse en una frecuencia mayor al 1%. El polimorfismo genético se genera principalmente debido a mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, conversión génica y recombinación intralélica.⁷²

1.6.2 Probabilidad de exclusión (PE)

Se denomina probabilidad de exclusión (PE) a la capacidad de un marcador genético para excluir a un falsamente asignado padre en términos de probabilidad.⁷³ La probabilidad de exclusión se encuentra determinada por el número de alelos y de las frecuencias alélicas del marcador y no por las frecuencias genotípicas observadas.⁷⁴

Jamieson y Taylor (1997) señalan 4 formulas distintas para determinar la probabilidad de exclusión (PE), en base a los datos disponibles para el análisis:⁷⁵

a) PE1: Probabilidad de exclusión para un candidato a parentesco.

$$PE1 = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

Donde: p_i es la frecuencia del alelo i y n es el número de alelos en un locus.

b) PE2: Probabilidad de exclusión para candidato a parentesco dado el genotipo de un pariente conocido del sexo opuesto.

$$PE2 = 1 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^4$$

Donde: p_i es la frecuencia del alelo i y n es el número de alelos en un locus.

c) PE3: Probabilidad de exclusión para un par de candidatos a parentesco.

$$PE3 = 1 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^6 - 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right) + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right)^2$$

Donde: p_i es la frecuencia del alelo i y n es el número de alelos en un locus.

d) PEA = Probabilidad de exclusión acumulada o total.

$$PE \text{ acumulada o total} = 1 - (1 - P_1) (1 - P_2) (1 - P_3) \cdots (1 - P_k)$$

Donde: P_k es la probabilidad de exclusión del locus K .

1.6.3 Contenido de información polimórfica (PIC)

El contenido de información polimórfica (PIC) constituye una medida de la informatividad y polimorfismo de un locus genético.⁷⁶ El valor de PIC es determinado mediante la siguiente formula:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Donde: p_i es la frecuencia del alelo I, p_j es la frecuencia del alelo J y n es el número de alelos en un locus.⁷⁶

1.6.4 Heterocigosidad

La heterocigosidad (H) indica la proporción de individuos heterocigotos de una población. Un alto valor de heterocigosidad indica una alta diversidad alélica presente en la muestra analizada.⁷⁴ Existen dos indicadores de heterocigosidad: la heterocigosidad esperada (H_E) y la heterocigosidad observada (H_O).

La heterocigosidad esperada (H_E) o diversidad génica (h)⁷⁷, es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes.⁷³

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde: p_i es la frecuencia del alelo I y n es el número de alelos en un locus.⁷⁷

La H_E indica el nivel de heterocigosidad que esperado para una población que se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg.³⁰

La heterocigosidad observada (H_O) indica la proporción de individuos heterocigotos observados para un locus en particular en una población.⁷³

$$H_O = \frac{\text{Número de individuos heterocigotos}}{\text{Número total de individuos}}$$

1.6.5 Meiosis informativa (MI)

Una meiosis informativa cuando se puede identificar si el gameto es o no recombinante. Se emplea para determinar si los marcadores se encuentran ligados o que tan cerca están el uno del otro.⁷⁸

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Generar y caracterizar nuevos microsatélites de alpaca altamente informativos a partir de marcadores conservados en la familia Bovidae.

2. Objetivos específicos

Evaluar la capacidad de amplificación de 38 marcadores microsatélites de caprino, ovino y bovino con ADN genómico de alpaca

Identificar y caracterizar nuevos microsatélites con capacidad de amplificación cruzada en ADN genómico de alpaca

III. METODOLOGÍA

1 Localización del estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UBM-UPCH) ubicado en el distrito de San Martín de Porres, provincia de Lima, departamento de Lima.

2 Animales

Se emplearon un total de 36 alpacas (*Vicugna pacos*) adultas, 6 de cada localidad, no emparentadas de la raza Huacaya, de color blanco y clínicamente sanas provenientes de 6 localidades: i) *Unidad de Producción de Cochas - SAIS Tupac Amaru*, distrito de Canchayllo, provincia de Jauja, departamento de Junín, ii) *Sector A de Carnicería - CC.CC. Santa Barbara*, distrito de Huancavelica, provincia de Huancavelica, departamento de Huancavelica, iii) *Sector B de Carnicería - CC.CC. Santa Barbara*, distrito de Huancavelica, provincia de Huancavelica, departamento de Huancavelica, iv) *Sector Pallccapampa - CC.CC. Santa Barbara*, distrito de Huancavelica, provincia de Huancavelica, departamento de Huancavelica, v) *Sector de Lachocc - Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos Lachocc – Universidad de Huancavelica*, distrito de Huancavelica, provincia de Huancavelica, departamento de

Huancavelica, vi) *Sector Malkini*, distrito de Muñani, provincia de Melgar, departamento de Puno.

3 Colección de muestra

Se colectó 5ml de sangre mediante punción en la vena yugular utilizando tubos BD Vacutainer® con anticoagulante (K3E: Potasio – EDTA al 15%) y agujas de colección Vacutainer® 20G 1 ½ a 36 alpacas adultas. Adicionalmente, se colectó de 3 muestras de sangre y/o tejido muscular de ganado vacuno, ovino y caprino. La totalidad de las muestras colectadas fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

4 Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN genómico de 36 alpacas, 1 vacuno, 1 ovino y 1 caprino a partir de 300 µL de sangre y/o 200 mg de tejido muscular mediante lisis celular, digestión proteica con Proteinasa K, precipitación de proteínas y precipitación de ADN con isopropanol utilizando Wizard DNA isolation kit (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico fue colocado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenado a – 20°C. La calidad y cantidad del ADN extraído fue determinada mediante electroforesis en gel, utilizando geles de agarosa al 1% y diluciones seriadas de un marcador de peso molecular DNA lambda *Hind III* (Fermentas).

5 Elección de marcadores microsatélites con capacidad de amplificación multiespecie

Treinta y ocho microsatélites (Tabla 1) fueron elegidos a partir de 2000 microsatélites utilizados en mapeo genético en ovinos, bovinos y caprinos,^{79,80,81,82,83} siguiendo un algoritmo de selección (Figura 2) que incluye los siguientes parámetros: i) capacidad de amplificación multiespecie, ii) contenido de información polimórfica (PIC) mayor de 0.4, iii) heterocigosidad (H_E) mayor de 0.4, iv) probabilidad de exclusión (PE) mayor a 0.4, v) número de alelos (A) mayor a 4 y vi) número de meiosis informativas: mayor a 5.

Para la selección de los marcadores se determinó un valor para cada marcador asignándole un puntaje de acuerdo a si cumplía o no los parámetros de selección anteriormente expuestos. Se le asignó 1 punto por cada una de las especies en las que presentó amplificación y otro punto por el nivel de informatividad del marcador de acuerdo a los datos obtenidos en la bibliografía. El puntaje mínimo aceptable es de 3 pero se seleccionaron aquellos que presentaran un mayor puntaje.

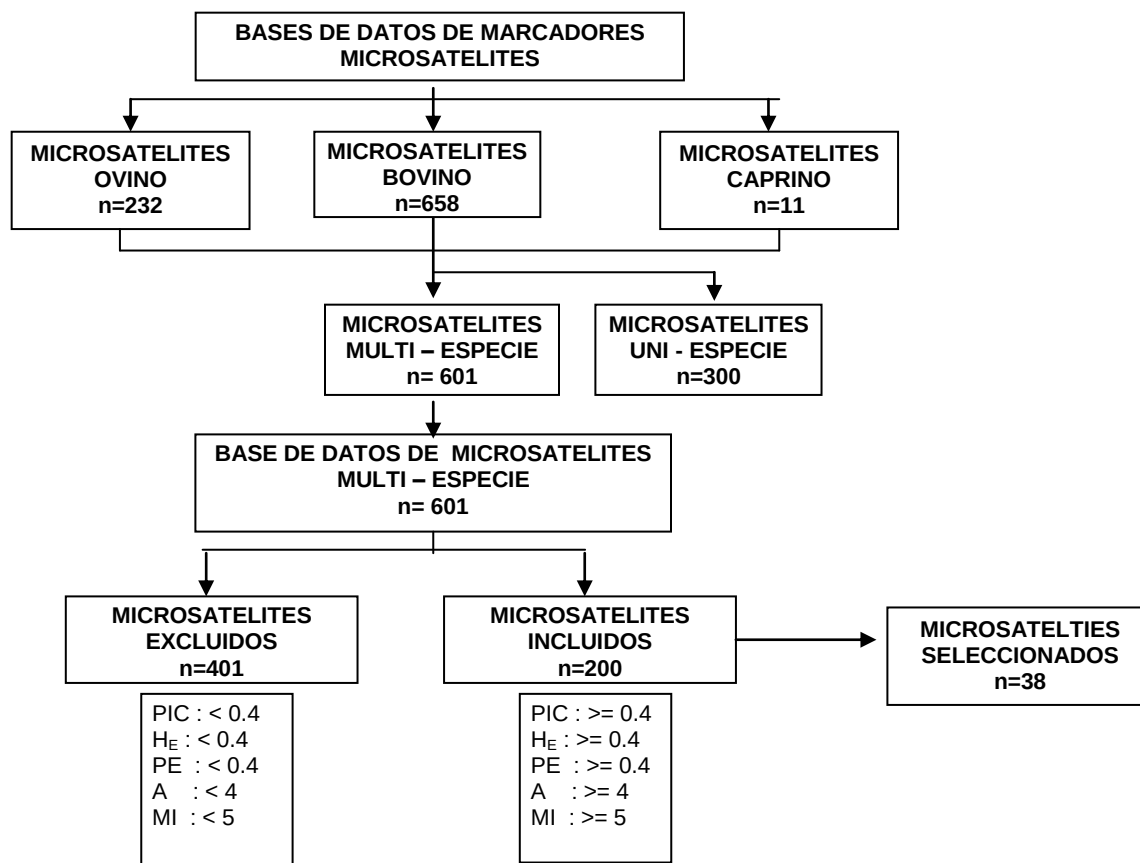


Figura 2. Algoritmo de selección de marcadores microsatélites para uso en alpacas. PIC, contenido de información polimórfica; He, heterocigocidad esperada; PE, probabilidad de exclusión; A, numero de alelos; MI, meiosis informativas.

Tabla 1. Marcadores microsatélites utilizados

Locus	Secuencia 5' - 3'	Origen	Referencia
BM6444	CTCTGGGTACAACACTGAGTCC TAGAGAGTTTCCCTGTCCATCC	bovino	Crawford y col 1995
TGLA10	CTAAATTTATCCCACTGTGCTT CAATCTGCAGTAGCATACATCCTTG	caprino	Crawford y col 1995
McM527	GTCCATTGCCTCAAATCAATTC AAACCACTEACTACTCCCCAA	caprino	Vaiman D. y col 1996
BM4513	GCGCAAGTTTCCTCATGC TCAGCAATTCAGTACATCACCC	caprino	Vaiman D. y col 1996
BM4630	TGGTTTGCTGGTGAGATTAGG TTCATAATGGGGTGAGTGAGTG	caprino	Vaiman D. y col 1996
BM121	TGGCATTGTGAAAAGAAGTAAA ACTAGCACTATCTGGCAAGCA	caprino	Vaiman D. y col 1996
ILSTS058	GCCTTACTACCATTTCCAGC CATCCTGACTTTGGCTGTGG	caprino	Vaiman D. y col 1996
HEL10	ATCTGCCTGAAGCCAGTCAC GGTTTCCTGCACCTGCATGA	ovino	Crawford y col 1995
TGLA 122	AATCACATGGGUATAAGTACATC CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	ovino	Crawford y col 1995
BM1818	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	caprino	Vaiman D. y col 1996
CSSM066	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	caprino	Vaiman D. y col 1996
ILSTS005	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	caprino	Vaiman D. y col 1996
TGLA53	CAGCAGACAGCTGCAAGAGTTAGC CTTTCAGAAATAGTTTGCAATTCATGCAG	ovino	Crawford y col 1995
ETH225	GATCACCTTGCCACTATITCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	caprino	Vaiman D. y col 1996
INRA023	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTCA	caprino	Vaiman D. y col 1996
INRA032	AAACTGTATTCTCTAATAGCTAC GCAAGACATATCTCCATTCCTTT	caprino	Vaiman D. y col 1996
INRA063	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	caprino	Vaiman D. y col 1996
AGLA293	GTCTGAAATTGGAGGCAATGAGGC CCCAAGACAACCTCAAGTCAAAGGACC	caprino	Crawford v1995
BM2113	GCTGCC'TTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	bovino	Crawford y col 1995

BM4005	AGTCCATGGGACCACAAAAG ACTGTACAGCAAAGTGATTTCAGAT	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
BM4621	CAAATTGACTTATCCTTGGCTG TGTAACATATGGGCTGCATC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
BM1824	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	bovino	Crawford <i>y col</i> 1994&1995
BM6438	TTGAGCACAGACACAGACTGG ACTGAATGCCTCCTTTGTGC	bovino	Crawford <i>y col</i> 1994&1995
HEL13	TAAGGACTTGAGATAAGGAG CATCTACCTCCATCTTAAC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
INRA037	GATCCTGCTTATATTTAACCAC AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
INRA081	CGGCTCACGGTCTCTATCGG GCGAACCCAAGAATCAGACTC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
TGLA179	CTTTAATCAGCACACAGCTTCCCA ATATGTGCTAGAAGTTTGGTCAACC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
TGLA73	GCTTCTTTCTCTTTAAATTCTATATGG GAGAGGAGAATCACCTAGAGAGGC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
TGLA49	AGAAAAGGAATAATGAGACAGATTA GGCAGGACTTCACTCTTTTTTCA	ovino	Crawford <i>y col</i> 1994&1995
BM143	ACCTGGGAAGCCTCCATATC CTGCAGGCAGATTCTTTATCG	bovino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
BM302	GAATTCCTCCATCACTCTCTCAGC GTTCTCCATTGAACCAACTTCA	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
BM415	GCTACAGCCCTTCTGGTTTG GAGCTAATCACCAACAGCAAG	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
BM4505	TTATCTTGGCTTCTGGGTGC ATCTTCACTTGGGATGCAGG	bovino	Crawford <i>y col</i> 1994&1995
ILSTS011	GCTTGCTACATGGAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
ILSTS030	CTGCAGTTCTGCATATGTGG CTTAGACAACAGGGGTTTGG	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
INRA040	TCAGTCTCCAGGAGAGAAAAC CTCTGCCCTGGGGATGATTG	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
MAF70	GCAGGACTCTACGGGCCTITGC CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996
OarFCB20	AAATGTGTITAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	caprino	Vaiman D. <i>y col</i> 1996

6. Tamizado de marcadores microsatélites con capacidad de amplificación en alpacas

6.1 Amplificación de ADN microsatélite

Se amplificaron 38 loci microsatélites (Tabla 1) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 3 muestras de ADN genómico de alpaca y 3 de ADN vacuno, ovino y caprino (controles de amplificación). La PCR se realizó en un volumen final de 20 uL conteniendo 20 ng de ADN genómico, 1X Buffer PCR, 2.0 mM de Mg^{2+} , 0.2 mM de dNTPs, 0.25 U DNA polimerasa Hot Star Taq Plus (Qiagen), 5 pmoles de cada cebador.

Las condiciones termales utilizadas fueron: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento por 1 minuto, 72°C por 30 segundos y 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. La temperatura de alineamiento utilizada inicialmente fue de 58°C en base a los datos descritos por Vaiman y col 1996^{8 3}, posteriormente fueron evaluados a distintas temperaturas de alineamiento en un rango de 58°C a 50 °C con intervalos de 2 °C (50°C, 52°C, 54 °C, 56°C, 58°C). La PCR se realizó en un termociclador modelo 9700 GeneAmp® (Applied Biosystem).

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, TBE 0.5X (Tris-borato 0.045 M y EDTA 0.001M) a 40 V por 90

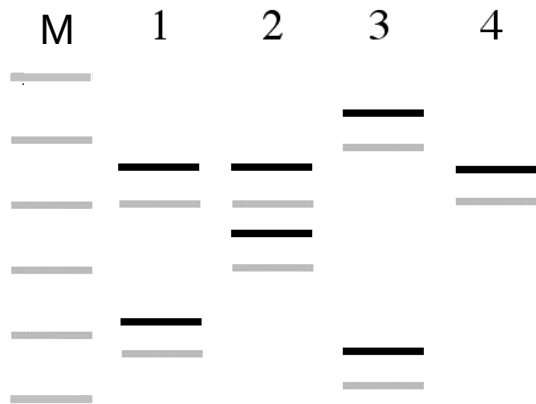
minutos. La visualización de los fragmentos se realizó mediante tinción con una solución de bromuro de etidio (0.5 ug/ mL) posterior a la electroforesis. La presencia de productos de amplificación determinó la capacidad de amplificación cruzada para cada uno de los marcadores de rumiantes probados en alpacas.

6.2 Selección de microsatélites con amplificación en alpacas

Se seleccionaron los microsatélites que presentaron amplificación en ADN genómico de alpaca y se procedió a la reamplificación con 2 muestras de ADN de alpacas provenientes de Huancavelica (Sector Pallcapampa) y de Junín (Unidad de producción de Cochas) y un control positivo para el que se empleó una muestra de ADN ovino, vacuno o caprino. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (29:1 acrilamida:bisacrilamida), TBE 1X (Tris-borato 0.09 mM y EDTA 0.002mM), 0.005% de APS, y 0.0005% de TEMED a 100 voltios por 18 horas. Los microsatélites amplificados fueron visualizados mediante tinción con nitrato de plata. El proceso de tinción se realizó de la siguiente manera: se sumergió el gel por 15 minutos en una solución de lavado (10% de etanol y 0.5% de ácido acético); seguido de un lavado con agua miliQ por 30 segundos, a continuación se sumergió el gel en una solución de tinción (nitrato de plata al 1%) por 10 minutos, se realizó otro lavado con agua miliQ y finalmente se procedió a sumergir el gel en una solución de revelado (0.375M de hidróxido de sodio y 0.37% de formaldehído) a 4°C. Se detuvo el revelado agregando 300 mL de solución de lavado.

Se seleccionaron marcadores microsatélites putativos en base a los patrones de migración para microsatélites dinucleótidos (Figura 3) en geles de poliacrilamida. Los microsatélites elegidos fueron amplificados por PCR, separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata (mismas condiciones previamente descritas) en 20 muestras de ADN genómico de alpacas provenientes de 4 localidades de Huancavelica, 1 de Junin y 1 de Puno.

A



B

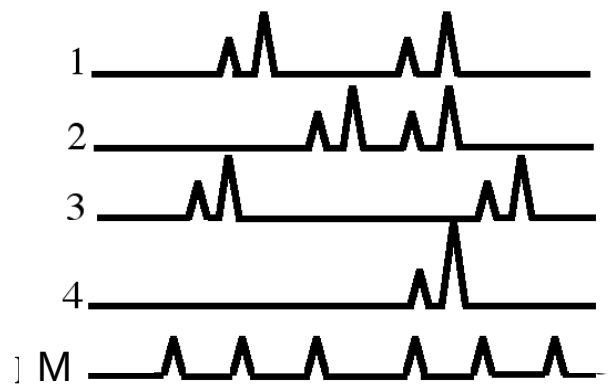


Figura 3. Esquema de la morfología de un marcador microsatélites en una electroforesis (A) y el un cromatograma (B). En el caso de la figura A la banda de color negro señala al microsatélites y la de color gris que al *stutter*, mientras que en la figura B el microsatélite es representado por el pico mayor tamaño y el *stutter* por el de menor tamaño. La fila M indica el marcador, las filas de la 1 - 3 presenta individuos heterocigotos y la fila 4 es un individuo homocigoto.

7. Identificación de secuencia microsatélite

Los microsatélites identificados mediante tinción con nitrato de plata, fueron amplificados mediante PCR. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, TBE 0.5X a 40V por 1.5 horas. Se procedió a purificar el producto de PCR a partir del gel de agarosa utilizando QuiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El producto de PCR purificado fue clonado utilizando el Topo TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se comprobó la presencia del inserto (fragmento de PCR) en 5 colonias mediante una PCR. La PCR presento las siguientes características 1X Buffer PCR, 1.5 mM de Mg^{2+} , 0.125 mM de dNTPs, 0.6 U DNA polimerasa (Fermentas), 2 pmoles del cebador M13R (5'TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC3') y 2 pmoles del cebador M13F (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, TBE 0.5X a 40V por 90 minutos, determinándose el tamaño del fragmento amplificado y comparándolo con el tamaño esperado del inserto.

Las colonias que presentaron el inserto del tamaño esperado fueron sembradas en 50ml de medio LB con 50ug/ml de kanamicina y fueron incubadas a 37°C por 16 horas. A partir de las colonias, se extrajeron los plásmidos utilizando el kit comercial Wizard

Plus S V Minipreps (Promega). El ADN plasmídico fue secuenciado en ambas direcciones utilizando BigDye Sequencing kit 3.1 en un analizador Genético ABI 3130 DNA sequencers® (Applied Biosystems) utilizando los cebadores M13F y M13R. Las secuencias generadas fueron editadas utilizando el programa MEGA v4.0⁸⁴ y se les realizó un análisis de similaridad mediante Blast.

IV. RESULTADOS

1 Extracción y cuantificación de ADN

Las 36 muestras de ADN extraídas se encontraron a una concentración de entre 50ng/ul y 100 ng/ul. Se prepararon alícuotas de cada una de las muestras todas a una concentración de 20 ng/ul.

2 Amplificación de los Microsatélites

Los 38 marcadores seleccionados fueron evaluados en muestras de ADN de ovino, caprino o bovino y en muestras de ADN de alpaca. Todos los marcadores presentaron amplificación en las muestras de ADN control empleadas (ovino, caprino o bovino), sin embargo no se observó lo mismo en las muestras de alpaca.

Las condiciones de temperatura empleadas inicialmente para la PCR fueron modificadas para buscar una amplificación mas específica en las muestras de alpaca. Las condiciones finalmente empleadas fueron: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento por 1 minuto, 72°C por 30 segundos.

De los 38 marcadores microsatélites probados solo 12 presentaron producto de amplificación en los geles de agarosa (Anexos 1-2) sin embargo solo se logro obtener amplificación especifica para uno de ellos, el marcador AGLA293. Los resultados obtenidos se observan en al Tabla 2.

Los 12 marcadores que presentaron productos de amplificación también fueron evaluados en geles de poliacrilamida (Figuras 4-6) observándose la presencia de múltiples bandas inespecíficas las cuales presentaban un patrón diferente al del control positivo (ADN ovino, vacuno, caprino); en algunos casos el patrón de bandas no era conservado entre las dos muestras de ADN de alpaca esto indica un alta inespecificidad del cebador. Se observo en uno de los geles que el fragmento de menor tamaño (236bp) del marcador BM1818 presento la morfología de un marcador microsatélite dinucleotido (Figura7).

Tabla 2. Tamaño de los fragmentos amplificados por los 12 marcadores microsatélites que mostraron amplificación. Se observan los resultados obtenidos a distintas temperaturas de alineamiento en alpacas.

	Tamaño esperado	56°C	58 °C	60°C
BM4630	154-162 ⁷¹	400, 500, 900	400, 550, 950	-
BM1818	252-282 ⁶⁸	250, 800	250 , 800	-
CSSM066	184-194 ⁷⁰	350	350, 400, 500, 700	-
AGLA293	200-232 ⁸⁵	150	150	-
BM4621	133-147 ⁸⁵	700, 900	650, 800, 850	-
TGLA179	90-121 ⁸⁵	350, 500	400, 510, 800	-
ILSTS011	264-295 ⁶⁸	200, 500, 700, 1000	250, 500, 8000	-
MAF70	130-150 ⁶⁸	150, 500, 600, 650	150, 500, 600, 700	-
BM6444	128-134 ⁷¹	250, (650), 750	250, 700	-
BM6438	263-277 ⁸⁵	100, 400, 450	400, 1000	-
BM4505	247-310 ⁶⁸	350	350	-
HEL10	118-126 ⁷¹	350, 400, 700, 900, 1000	350, 400, 450, 700, 900	-

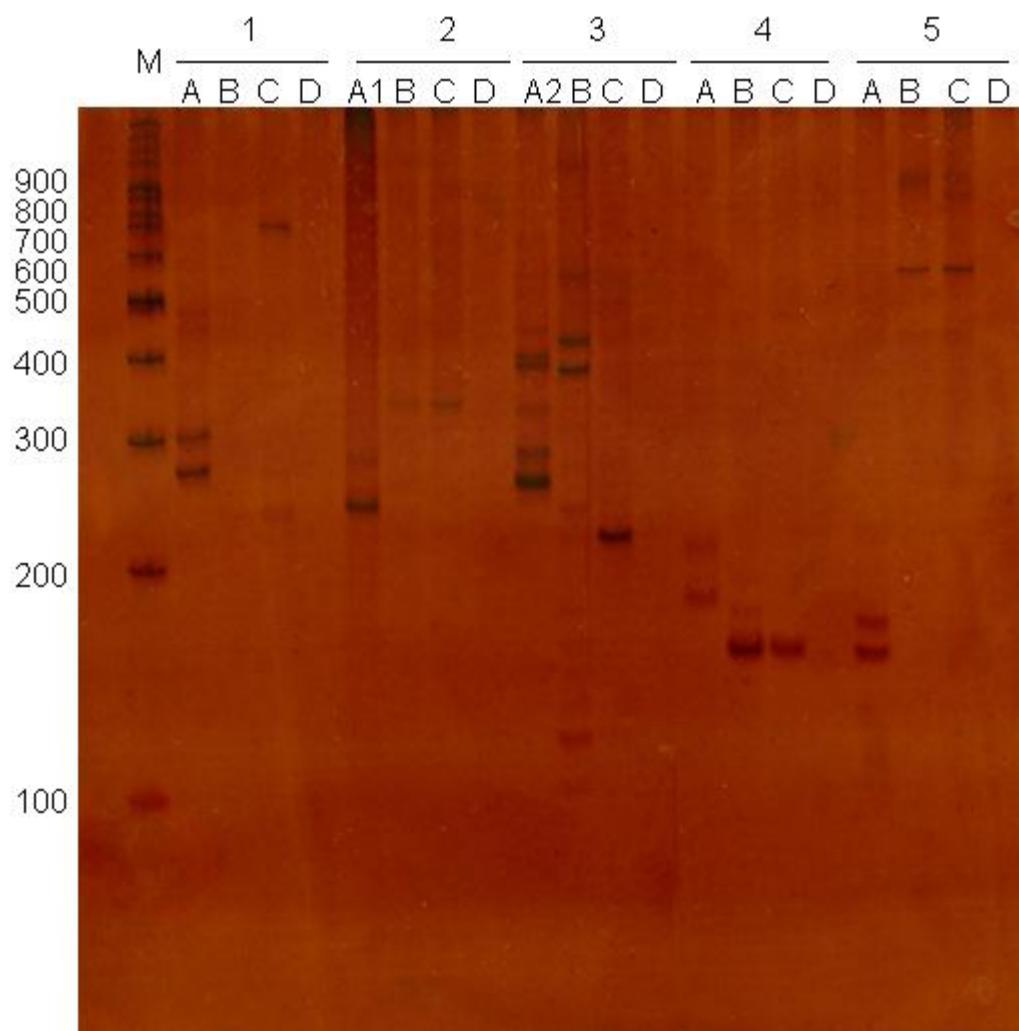


Figura 4: Productos de amplificación de 5 marcadores moleculares en alpaca. 1. BM1818, 2.BM4505, 3.BM6438, 4.AGLA 293, 5.BM4630. M indica en marcador de peso molecular 100bp. A. muestra de ADN vacuno, A1 muestra de ADN caprino, A2 muestra de ADN ovino, B- C muestras de ADN de alpaca, D. blanco. Poliacrilamida 12% - tinción en plata

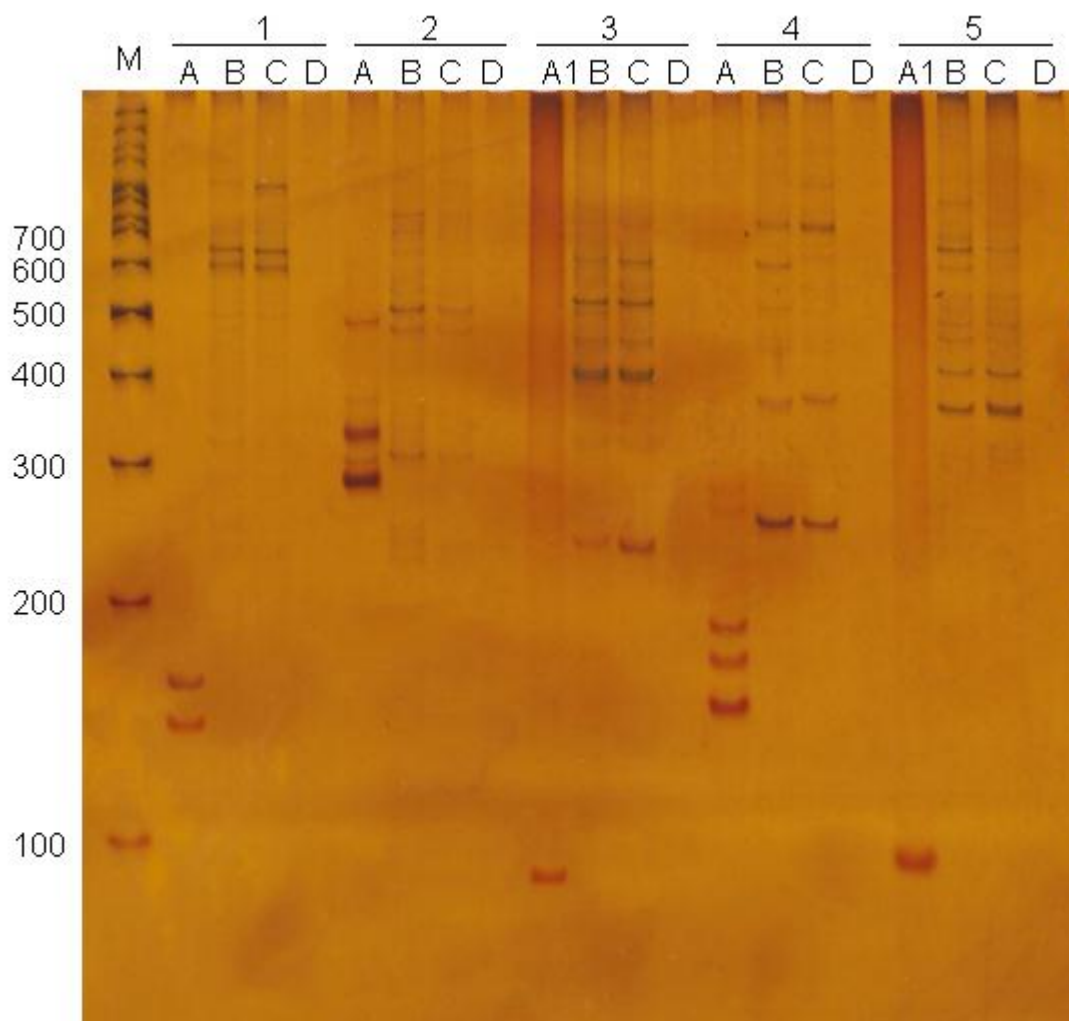


Figura 5: Productos de amplificación de 5 marcadores moleculares en alpaca. 1.BM4621, 2. ILSTS011, 3.TGLA179, 4.BM6444, 5.HEL10. M indica en marcador de peso molecular 100bp. A. muestra de ADN vacuno A1 muestra de ADN caprino, B- C muestras de ADN de alpaca, D. blanco. Poliacrilamida 12% - tinción en plata

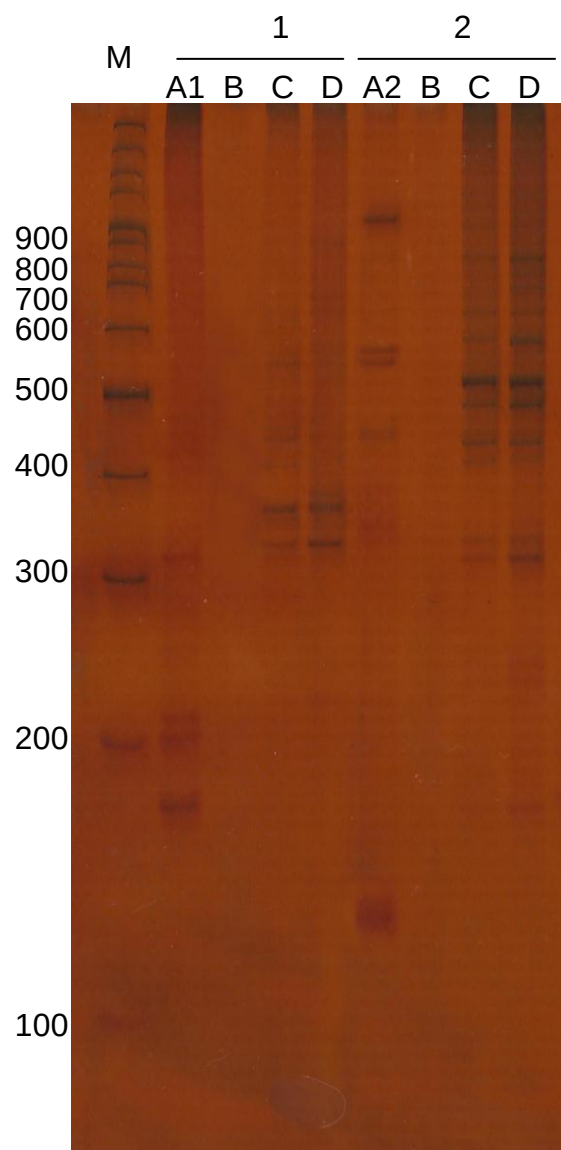


Figura 6: Productos de amplificación de 5 marcadores moleculares en alpaca.

1.CSSM066, 2.Maf70. M indica en marcador de peso molecular 100bp. A1 muestra de ADN caprino, A2 muestra de ADN ovino, B blanco, C - D muestras de ADN de alpaca. Poliacrilamida 12% - tinción en plata

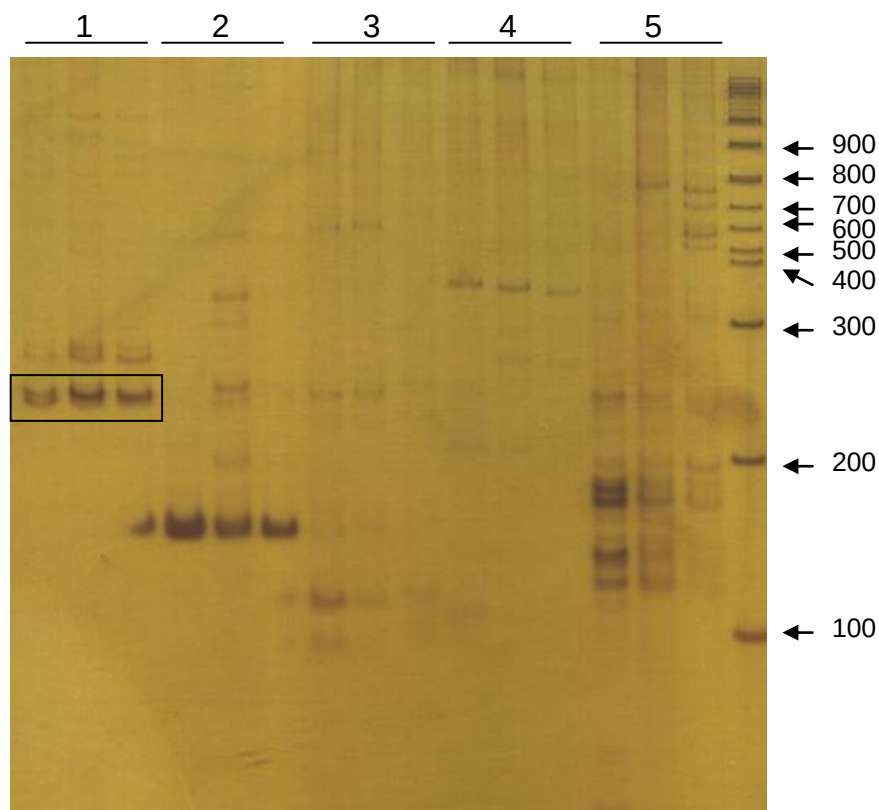


Figura 7: Morfología de microsatélite del marcador BM1818. Se observan los productos de amplificación de 5 de los 12 marcadores que amplificaron en alpaca. 1.BM1818, 2.AGLA293 3.BM6438, 4.BM4505, 5.MAF70. en 3 muestras de ADN de alpaca. M indica en marcador de peso molecular 100bp. En cuadrado señala los productos de amplificación del marcador BM1818 el cual muestra la morfología de un microsatélite. Poliacrilamida 12% - Tinción en plata

3 Identificación de marcadores microsatélites en alpacas

A partir de la purificación de un fragmento de 150 pb del marcador AGLA193 y del fragmento de 236 pb del marcador BM1818 se clonaron y secuenciaron ambos fragmentos.(Anexo 3-4) El análisis de la secuencia del fragmento de 150 pb del marcador AGLA293 indicó la ausencia de secuencias repetitivas que señalaran la presencia de un microsatélite en la región amplificada. Al realizar un análisis de alineamiento y similitud mediante el programa Blast indicó que el fragmento amplificado no presentaba similitud con un marcador microsatélite sino con una región del citocromo P450 (91% similitud y e-value 0.002) de *Homo sapiens* (Tabla 3). En la secuencia obtenida del fragmento de 236 pb del marcador BM1818 se observa la presencia de una secuencia repetitiva conformada por 10 repeticiones de CA (citosa, adenina), identificada como un microsatélite dinucleótido. (Figura 8). Al realizar un análisis de alineamiento y similitud mediante el programa Blast indicó que el fragmento amplificado presentaba similitud con un marcador microsatélite (83 % similitud y e-value $3.00e^{-33}$) en equino (*Equus caballus*) (Tabla 3).

Tabla 3 : Resultados obtenidos del Blast para el marcador AGLA293 y el BM1818

Marcadores	Código de Acceso	Descripción	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
BM1818	gi 242109016 FN405678.1	<i>Equus caballus</i> microsatellite DNA, locus ABGe14074	150	150	61%	3.00E-33	85%
AGLA293	gi 195927052 NG_008338.1	<i>Homo sapiens</i> cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 (CYP7B1) on chromosome 8	50.7	50.7	23%	0.002	91%

TAGCTGGGAA TATAACCAAA GGAAACAAGA GCACTAACTT	40
GAAAAGATAT CTGCAGCCCT ATGTTACAG CAGCACAATT	80
TACAACAGCC AAGACATGGA AACAACTTCA GGGTCCATCA	120
GTGGATGAAT GTATAAAGAA GTTATGGTAC <u>ACACACACAC</u>	160
<u>ACACACACAG</u> GAATGTTACT CACCCATAAA AAATGAGGAA	200
ATTGCAACAA CTTGCATGGA CCTTGAAAGC ACTAA	236

Figura 8. Secuencia de nucleótidos del fragmento de 236 bp del marcador BM1818. La secuencia de color azul subrayada señala el microsatélite (CA)₁₀.

4 Caracterización del Marcado BM1818

Con la finalidad de evaluar el grado de polimorfismo del microsatélite encontrado se realizó una PCR del marcador BM1818 para 20 muestras de ADN genómico de alpaca de distintas localidades y los productos de la PCR fueron evaluados en un gel de poliacrilamida 12%.

En los geles se evaluó principalmente las diferencias en el patrón de bandas observadas entre los 200 pb y 300 pb. Los resultados mostraron la presencia varias bandas en esa zona, sin embargo dos de ellas de aproximadamente 236 pb mostrando variaciones en su patrón de electroforesis, observándose la presencia de una bandas inconstante en todos los individuos (Figura 9) lo cual podría indicar la presencia de polimorfismos.

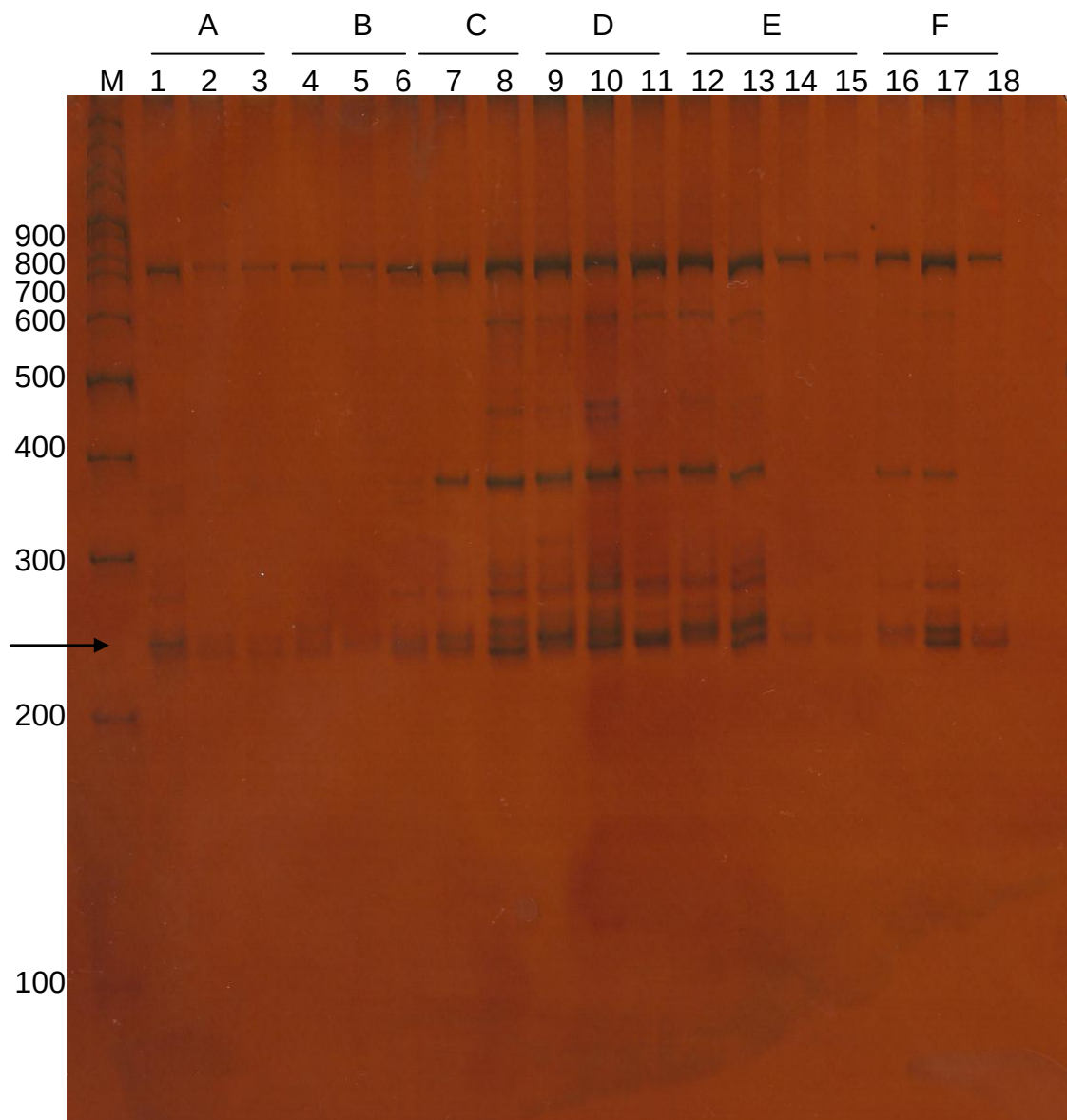


Figura 9: Polimorfismo del marcador BM1818. El marcador fue probado en 18 muestras de ADN de alpaca de distintas localidades con la finalidad de identificar la presencia de polimorfismos. La ultima fila es el blanco (19). A. Sector Carnicería B, B. Sector Carniceria A, C. Sector Cochas, D. Sector Lachoc, E. Sector Malkini, F. Sector Pallcapampa. La flecha señala el microsatélite de interés (236bp). Poliacrilamidad 12% - tincion en plata.

V. DISCUSIÓN

La fibra de alpaca es un recurso económico de gran importancia en el Perú. El país cuenta a la fecha con aproximadamente 3 millones de ejemplares,⁵ convirtiéndolo en el mayor productor de fibra de alpaca a nivel mundial. En los últimos años la calidad de la fibra de alpaca ha decaído enormemente debido a una inadecuada selección y mal manejo de la reproducción de los ejemplares.

Es necesario un número considerable de marcadores moleculares para poder entender el patrón de segregación de la finura de la fibra. En la actualidad se han reportado alrededor de 100 marcadores genéticos validados para alpaca, número insuficiente para rastrear el carácter de interés, por lo que es necesario generar un mayor número de marcadores para esta especie.^{8,9,10,11,12,13,14}

Una de las técnicas utilizadas para generar marcadores microsatélites en forma rápida, es el empleo de marcadores microsatélites conservados de especies relacionadas, lo cual se basa en la capacidad de amplificación cruzada entre especies evolutivamente cercanas. Dos especies poseen dicha cercanía, cuando las secuencias nucleotídicas de sus genomas se encuentran conservadas, lo que implica que se han diferenciado hace poco tiempo. Esto otorga la posibilidad de que algunos de los marcadores moleculares de una especie puedan amplificar en otra.

Con la finalidad de generar nuevos marcadores microsatélites en alpacas se evaluó la presencia de amplificación cruzada para marcadores microsatélites reportados para la familia Bovidae (ovinos, bovinos y caprinos), los cuales al igual que la Familia Camelidae son miembros del Orden Artiodactyla. La divergencia de estas familias data del Eoceno (54 - 34 millones de años), estudios reportados señalan la conservación de las secuencias flanqueantes de microsatélites entre especies que han divergido hasta 470 millones de años.¹⁸

De los 38 marcadores microsatélites evaluados, se obtuvo amplificación cruzada en 12 de ellos (31.6%) en alpaca (Tabla 2). Solo uno marcador (AGLA293) presentó un producto de amplificación específico en geles de agarosa, pero al ser evaluado en geles de poliacrilamida mostró la presencia de bandas inespecíficas. Se analizó la secuencia nucleotídica sin encontrar la presencia de un marcador microsatélites. Al realizar una comparación de la secuencia mediante Blast, ésta mostró ser similar a un citocromo p450 de humanos (Tabla 3). Esto puede deberse a una degeneración del microsatélite debido a mutaciones que llevaron a la pérdida de su secuencia o a la del cebador, lo cual se ocasiona por la divergencia entre rumiantes y camélidos.⁸⁶

Por otro lado, el fragmento de 236 pb del marcador BM1818, fue evaluado en geles de poliacrilamida y presentó la morfología característica de un microsatélite dinucleotido, con la presencia de 2 bandas de solo un par de nucleótidos de diferente tamaño. Esta morfología se debe a que la ADN polimerasa se “desliza” al sintetizar la secuencia suprimiendo una de las repeticiones del marcador ocasionando que se generen

fragmentos con 2 pares de bases de diferencia.⁵⁴ La presencia del microsatélite fue comprobada mediante el clonamiento y secuenciamento del fragmento, confirmando la presencia de un microsatélite dinucleótido compuesto de 10 repeticiones de Citosina y Adenina (CA)₁₀. La secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado mostró ser similar a una secuencia reportada de un marcador microsatélite de caballo (*Equus caballus*) (Tabla 3).

Estos resultados contrastan con lo reportado entre distintas especies como: bovinos-caprinos-ovinos⁶¹, ungulados-ciervos⁶³, bovidos-ciervos rojos⁸⁷, caribu-cervidos y caribu- bovidos⁸⁸, cervidos⁸⁹, oveja-oveja y oveja-cabra⁹⁰, aves⁹¹ que indican la conservación de las secuencias flanqueantes.

Sin embargo los autores no obtiene un 100% de éxito, Roed y Mididthjell (1998) reportan solo un 73.9% (17/23) de amplificación cruzada entre distintas especies de cervidos⁸⁹. Niemczewski y col (2002) obtuvo 44% de amplificación cruzada entre bóvidos y el ciervo rojo de mazurian (*Cervus elaphus*)⁸⁷. Poissant y col consiguieron 38.12% de amplificación cruzada entre oveja domestica (*Ovis aries*) y oveja salvaje (*Ovis canadensis*) y solo 25.9% de ellos amplificó también en cabra de monte (*Oreamnos americanus*)⁹⁰, mientras que Huang y col (2005) reportó amplificación cruzada entre pato y el pollo, el ganso o el pavo real; obteniendo un 14.3% (5/35) de amplificación cruzada entre pato y pollo, un 62.9% (22/35) de amplificación cruzada entre el pollo y el ganso, y un 0% de amplificación específica entre el pollo y el pavo real.⁹¹

Esto indica que si bien existe un grado de conservación de las secuencias flanqueantes éste no es homogéneo a lo largo de todo el genoma. Se observa también que hay variaciones en el número de alelos reportados para ciertos loci, indicando que la informatividad del marcador depende de la especie.

La ausencia de conservación de las secuencias flanqueantes entre bóvidos y alpacas podría deberse al tiempo de divergencia de estos dos subordenes. La diferenciación entre ambos sería mayor a la inicialmente asumida, razón por la cual no se observa amplificación específica para los microsatélites analizados.

Sin embargo la secuencia del fragmento de 236bp del marcador BM1818 presentó una alta similitud con la secuencia de un microsatélite reportado en caballos (*Equus caballus*) (Tabla 3). Los caballos son miembros del orden Perissodactyla, el cual se diferenció del orden Artiodactyla a finales del Paleoceno, y para principios del Eoceno (hace 54 millones de años) ya estaba diversificado.^{92, 93} El tiempo de divergencia entre los equinos y las alpacas es mayor que entre los bóvidos y las alpacas, no obstante existen datos que reportan la conservación de las secuencias flanqueantes de marcadores microsatélites entre especies que divergieron hace 470 millones de años.¹⁸

Al analizar el grado de polimorfismo del marcador BM1818, se observó una variación en el número de bandas obtenidas en el gel de poliacrilamida en la zona correspondiente a un tamaño de 236bp, lo cual podría indicar la presencia de

polimorfismo. El indicio de polimorfismo no es del todo concluyente debido a la inespecificidad de los cebadores, que son los causantes de la presencia de un gran número de bandas inespecíficas en el gel, ocasionando que sea difícil identificar la presencia de distintos alelos para el marcador analizado.

Los resultados obtenidos durante el experimento indican la ausencia de amplificación específica para los marcadores microsatélites de bóvidos evaluados en alpacas y solo un 2.63% (1/38) de éxito de amplificación de microsatélites, lo cual señala un bajo grado de conservación entre las secuencias flanqueante de los marcadores evaluados.

VI. CONCLUSIONES

1. Los resultados señalan un bajo grado de conservación de los marcadores genéticos de la familia Bovidae en familia Camelidae.
2. Los cebadores, AGLA293, BM1818, no corresponden a marcadores genéticos informativos.
3. El cebador AGLA293 presenta amplificación específica sin embargo su secuencia no incluye un microsatélites.
4. El cebador BM1818 presenta un microsatélite dinucleotido CA₁₀ en el fragmento de 236bp.

VII RECOMENDACIONES

1. No se recomienda el uso de marcadores de otras especies de la familia Bovidae para la generación de marcadores genéticos de las especies dentro de la Familia Camelidae.
2. Se recomienda el diseño de cebadores específicos del marcador BM1818 para poder determinar si este es polimórfico.
3. Se recomienda buscar nuevos marcadores genéticos informativos para alpacas entre los hallados en la subfamilia Camelini.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JANIS C. M. (1998) Evolution of tertiary mammals of north America Volumen 1: Terrestrial Carnovores, ungulates and ungulatelike mammals. *Cambridge University Press*. 338- 342
2. WHEELER J., CHIKHI. L., BRUOFRD M. (2006) Genetic Analysis of the Origins of Domestic South American Camelids. 331-343
3. KADWELL M., FERNANDEZ M., STANLEY H., WHEELER M. J., ROSADIO R., BRUFORD, M. (2001) Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268:2575-2584
4. WHEELER J. (1995) Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of th Linnean Society*, 54(3):271-295
5. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2005) Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina (TCP/RLA/2914):1-62
6. MINAG (2004) Norma Técnica Peruana 231.300:2004
7. BONAVIA D (1996) Los Camelidos Sudamericanos: (una introducción a su studio), *Travaux de l'I.F.E.A.* 93:843-853
8. SASSE J., MARIASEGARAM M., JAHABAR ALI M., PULLENAYEGUM S., BABU R., KINNE J., WERNERY U. (2000) Development of a microsatellite parentage and identity verification test for dromedary racing camels. *Abstracts of the 27th Conference of the international society of animal genetics (ISAG)*. Mineapolis. EE.UU.
9. MCPARTLAN H.C., MATTHEWS M.E., ROBINSON N.A. (1998) Alpaca micro- satellites at the VIAS A1 and VIAS A2 loci. *Animal Genetics*, 29:158.
10. OBREQUE V., COOGLE L., HENNEY P., BAILEY E., MANCILLA R., GARCIA-HUIDOBRO J., HINRICHSEN P., COTHRAN E. (1998) Characterisation of 10 polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. *Animal Genetics*, 29:461-462
11. PENEDO M.C., CAETANO A.R., CORDOVA K.I. (1998) Microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics*, 29(5):411-2
12. PENEDO M.C., CAETANO A.R., CORDOVA K . (1999) Eight microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics*, 30(2):166-7.
13. PENEDO M.C., CAETANO A.R., CORDOVA K.I. (1999) Six microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics*, 30(5):399.
14. BUSTAMANTE A.V., MAT M. L. , ZAMBELLI A., VIDAL-RIOJA L. (2003) Isolation and characterization of 10 polymorphic dinucleotide microsatellite markers for llama and guanaco. *Molecular ecology Notes*, 3(1):68-69
15. STANLEY H.F., KADWELL M.K., WHEELER J.C. (1994) Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *H Proc R. Soc. Lond B*.256:1-6
16. LAFAYE P., ACHOURA I., ENGLANDB P., DUYCKAERTSC C., ROUGEON F. (2009) Single-domain antibodies recognize selectively small

- oligomeric forms of amyloid β , prevent A β -induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Molecular Immunology*, 46(4):695-704
17. LODISH H., BERK A., ZIPURSKY L., MATSUDAIRA P., BALTIMORE D., DARNELL J. *Molecular Cell Biology*, 4th edition W. H. Freeman; 2000 2004
 18. CHISTIYAKOV D., HELLEMANS B., VOLCKAERT F. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255:1-29
 19. SUNNUCKS P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, 15(5):199-202
 20. FÉRAL J.P. (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268:121-145
 21. MORITZ C. (1994) Defining “evolutionarily significant units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9:373-375.
 22. AVISE J., ARNOLD J., BALL R., BIRMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J., REEB C., SAUNDERS N. (1987). Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*, 18:489-522.
 23. AVISE J.(2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2da. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA:161-169
 24. HARRISON R. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population biology and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 3:535-546
 25. PANNEERCHELVAM S., NORAZMI M. (2003) Forensic DNA profiling and database. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 10 (2): 20-26
 26. PAVIA P., CALDERON C., PUERTA C. (2005) Diferenciación de especies de *Rhodococcus* mediante una prueba de PCR-RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16S ribosomal. *NOVA - Publicación Científica*, 3(4):1-116
 27. DICKIE I.A., FITZJOHN R. G. (2007) Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17(4):259-270
 28. BOWDEM D.W., MULLER-KAHLE H., GRAVIUS T.C., HELMS C., WATT-MORGAN D., GREEN P., DONIS-KELLER H. (1989) Identification and Characterization of 23 RFLP Loci By Screening Random Cosmid Genomic Clones. *Am. J. Hum. Genet.*, 44:671-678.
 29. LOBOS E. A., RUDNICK C. H., WATSON M. S., ISENBERG K. E.,(1989) Linkage Disequilibrium Study of RFLPs Detected at the Human Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes. *Am. J. Hum. Genet.*, 44:522-533
 30. FREELAND J.R. (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons. pg 51 – 53
 31. BLEARS M., DE GRANDIS S., LEE H., TREVORS J. (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21(3):99-114

32. MEUDT H.M., CLARKE, A.C. (2007) Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, 12:106-117
33. BENSCH S, AKESSON M. (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, 14(10):2899-914.
34. KARAM D., WESTRA P., NISSEN S.J., WARD S.M., FIGUEIREDO J. (2004) Genetic diversity among proso millet (*Panicum miliaceum*) biotypes assessed by AFLP technique. *Planta Daninha*, 22(2):167-174
35. AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27(4):617-31
36. BAHY A., HUANG T., QIN D., WANG X. (2004) A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 4: 443-453
37. KUMAR S., NEEKHRA B., PANDEY D, JAIN K. (2010) RAPD marker system in insect study: A review. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 7-12
38. BIELAWSKI J., PAND PUMO D. (1997) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity*, 78:32-40
39. BARDAKCI F., SKIBINSKI D. (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73:117-123
40. ALFARO C. O. (2004) Amplificación de la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) en el estudio molecular de Lama pacos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos
41. VIGNAL A., MILAN D., SAN CRISTOBAL M., EGGEN A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.*, 34:275-305.
42. LIU Z. (2007) Single nucleotide polymorphism (SNP). In: *Aquaculture genome technologies*. Eds. Z. Liu. Blackwell Publishing. USA:59-72
43. BROOKS A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene*, 234 (2):177-186
44. LI W., GOJOBORI T., NEI M. (1981) Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature*, 292:237-239.
45. MARTINEZ-ARIAS R., CALAFELL F., MATEU E., COMAS D., ANDRES A., BERTRANPETIT J. (2001) Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Res.*, 11:1071-1085.
46. COLLINS D.W., JUKES T.H. (1994) Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*, 20:386-396.
47. SMITH E., SHI L., DRUMMOND P., RODRIGUEZ L., HAMILTON R., RAMLAL S., SMITH G., PIERCE K., FOSTER J. (2001) Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized 10-day-old White Leghorn whole embryo cDNA library: 1. DNA sequence characterization and linkage analysis. *Journal of Heredity*, 92:1-8.
48. KIM H., SCHMIDT C., DECKER K., EMARA M. (2002) Chicken SNP discovery by EST data mining, in: *Plant, Animal & Microbe Genomes X*, 12-16 January 2002, San Diego. Disponible: http://www.intl-pag.org/pag/10/abstracts/PAGX_P246.html

49. SYVANEN A. (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Review Genetics*, 2(12):930-942.
50. COLLINS F., BROOKS L., CHAKRAVARTI A. (1998) A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Research*, 8: 1229-1231
51. SOBRINO A., BRIÓN M., CARRACEDO A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154:181–194.
52. GILL P. (2001) An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.*, 114:204–210.
53. ZOU F., YUE B., XU L., ZHANG Y. (2005) Insolation and Characterization of Microsatellite Loci from Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*). *Zoological Science*, 22, 593-598
54. HANCOCK J. (1991) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Microsatellites. Evolution and applications. Goldstein D, Schlötterer C. *Oxford University Press*. Oxford:1-9.
55. ROIZÈS G. (2000) Identification of Microsatellite Markers: Screening for Repeat Sequence and Mapping Polymorphism. *Eaton Publishing*. 35-48
56. DEWOODY J.A., HONYCUTT R.L., SKOW L.C. (1995) Microsatellite markers in white-tailed deer. *The Journal of Heredity*, 86:317-318
57. MAUDET C., MILLER C., BASSANO B., BREITENOMOSEER-WURSTEN C., GAUTHIER D., LUIKART G. *et al.* (2002) Microsatellite DNA and recent stadistical methods in wildlife conservation management: applications in alpine Ibex (*Capra ibex(ibex)*). *Molecular Ecology*, 11:421-436
58. CAÑÓN J., CHECA M., CARLEOS C., VEGA-PLA J., DUNNER S. (2000) The genetic structure of Spanish celtic horse breeds inferrec from microsatellites data. *Animal Genetics*, 31: 39-48
59. AGAPITO J., RODRIGUEZ J., HERRERA-VELIT P., TIMOTEO O., ROJAS P., BOETTCHER P., GARCIA F., ESPINOZA J. (2008) Parentage testing in alpacas (*Vicugna pacos*) by using semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 10 microsatellite markers. *Animal genetics*, 39:201-203.
60. ANDERSON J.D., HONYCUTT R.L., GONZALES R.A., GEE K.L., SKOW L.C., GALLAGHER R.L., HONYCUTT D.A., DEYOUNG R.W. (2002) Development of microsatellite DNA markers for the automated genetic characterization of White-Tailed Deer Populations. *Journal of Wildlife management*, 66: 67-74.
61. KEMP S., HISHIDA O., WAMBUGU J., RINK A., LONGERI M., MA R., DA Y., LEWIN H., BARENDSE W., TEALE A. (1995) A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics*, 26: 299-306
62. HANCOCK J. (2003) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms En: Microsatellites Evolution and Applications. *Oxford University Press* pag 1-6
63. GALAN M., COSSON J., AULAGNIER S., MAILLARD J., THÉVENON S. AND HEWISON A. (2003) Cross-amplification tests of ungulate primers in roe

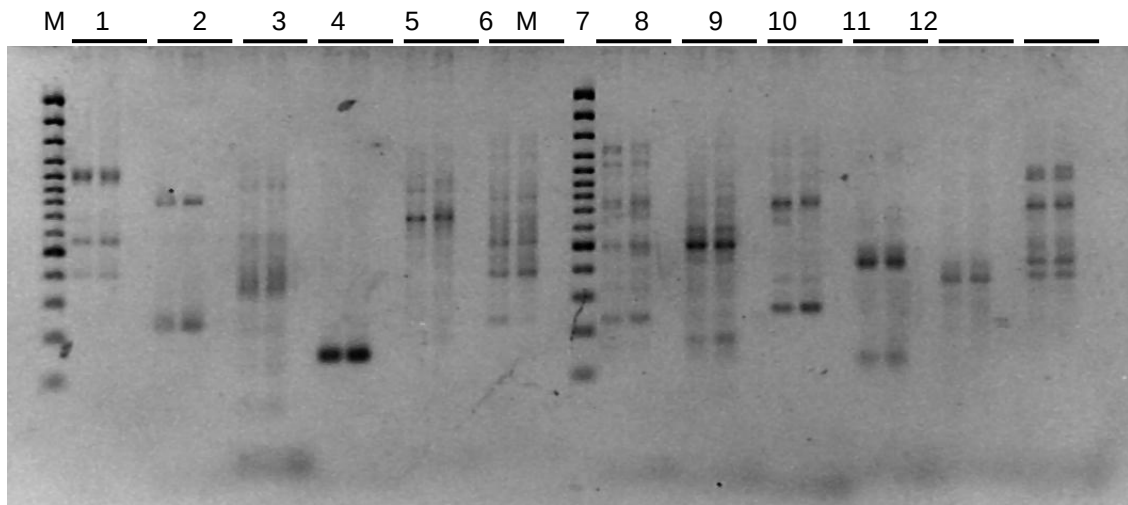
- deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3:142-146.
64. DA FONTOURO-RODRIGUES M., LIMA-ROSA C., TCHAICKA L., VALDEZ F., RODRIGUES F., EIZIRIK D. et al. (2008) Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular ecology Resources*, 4:898-900
 65. REED, K. M., CHAVES, L. D. (2008). Simple Sequence Repeats for Genetic Studies of Alpaca. *Animal Biotechnology*, 19:4, 243 - 309
 66. MARIASEGARAM M., PULLENAYEGUM S., JAHABAR ALI M., SHAH R. S., PENEDO M. C., WERNERY U., SASSE J. (2002) Isolation and characterization of eight microsatellite markers in *Camelus dromedarius* and cross-species amplification in *C. bactrianus* and *Lama pacos*. *Animal Genetics*, 33(5):385-387.
 67. JIANLIN, H., MBURU, D., OCHIENG, J., KAUFMANN, B., REGE, J.E.O., HANOTTE, O. (2000) Application of New World Camelidae microsatellite primers for amplification of polymorphic loci in Old World camelids. *Animal Genetics*, 31:404-405
 68. MAUDET C., BEJA-PEREIRA A., ZEYL E., NAGASH H., LUIKART G. et al (2004) A standard set of polymorphic microsatellites for threatened mountain ungulates (Caprini, Artiodactyla). *Molecular Ecology Notes*, 4:49-55
 69. ELBELTAGY A., SALAH GALAL M., ABDELSALAM, A., EL KERABY F., BLASI M., MAHASSEN M. (2008) Biodiversity in Mediterranean buffalo using two microsatellite multiplexes. *Livestock Science*, 114:341-346.
 70. KIM K., MIN M., AN J., LEE H. (2004) Cross-species amplification of Bovidae Microsatellites and Low Diversity of the Endangered Korean Goral. *Journal of Heredity*, 95: 521-525
 71. MAINGUY J., LLEWELLYN A., WORLEY K., CÔTÉ S., COLTMAN D. (2005) Characterization of 29 polymorphic artiodactyl microsatellite markers for the mountain goat (*Oreamnos americanus*). *Molecular Ecology Notes*, 5:809-811.
 72. NEI M., KUMAR S. (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press*. USA: 231-275
 73. WEIR, B. (1996) Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. *Sinauer Associates Inc Publishers*. Massachusetts: 150-156; 209-211.
 74. BUTLER J.M. (2005) Forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers. 2da. Ed. *Elsevier Academic Press*. USA: 455-539
 75. JAMIESON A., TAYLOR S. (1997) Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal genetics*, 28:397-400.
 76. BOTSTEIN D., WHITE R., SKOLNICK M., DAVIS R (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32:314-31.
 77. NEI M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences USA*, 70:3321-3323.

78. STRACHAN T., READ A., (1999) Human Molecular Genetics, 2nd edition. Chp 11: Genetic mapping of complex characters. *Ed. Wiley-Liss.*
79. BARENDESEN W., ARMITAGE S., KOSSAREK L., HALOMA S., KIRLPATRICK B., HETZEL D., et al (1994) A genetics linkage map of the bovine genome. *Nature genetics*, 6:227-235
80. BISHOP M., KAPPES S., KEELE J., STONE R., SUNDEN S., CRAIG W., BEATTIE C. et al (1994) A Genetic Linkage Map for Cattle. *Genetics Society of America*, 196:619-639
81. CRAWFORD A. M., DODDS K. G., EDE A. J., PIERSON C. A., MONTGOMERY G. W., BEATTIE C. W. et al (1995) An Autosomal Genetic Linkage Map of the Sheep Genome. *Genetics*;140:703-724
82. CRAWFORD A.M. , MONTGOMERY G.W., PIERSON C.A., BROWN T., DODDS K.G. , HILL D.F. et al. (1994) Sheep Linkage Mapping: Nineteen Linkage Groups Derived From the Analysis of Paternal Half-sib Families. *Genetics*,137:573-579
83. VAIMAN D., LAURENT SCHIBLER L., FLORENCE BOURGEOIS F., OUSTRY A., AMIGUEST Y., CRIBIU E. (1996) A Genetic Linkage Map of the Male Goat Genome *Genetics Society of America*, 144: 279-305
84. TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics análisis (MEGA) Software Version 4.0 *Mol. Biol. Evolucion*, 24(8):1596–1599.
85. NGUYEN T., GENINI S., MÉNÉTREY F., MALEK M., VÖGELI P., GOE M., STRANZINGER G. (2005) Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of Swiss yak (*Poephagus grunniens*). *Animal Genetics*, 36:484-489.
86. EISEN J. (2003) Mechanistic basis for microsatellite instability EN: Microsatellites evolution and applications. Goldstein D, Schlötterer C. *Oxford University Press*. Oxford:1-9.
87. NIEMCZEWSKI C., RUTKOWSKI J., ZURKOWSKI M. (2002) Preliminary investigationon the polymorphism of microsatellite markers in mazurian red deer (*Cervus elaphus*). *Animal Science Papers and reports*, 20:169-174
88. WILSON G., STROBECK C., WU L., COFFIN J. (1997) Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus* and their use in other artiodactyls. *Molecular ecology*, 6:697-699
89. ROED K.H., MIDTHJELL L. (1998) Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. *Molecular Ecology*, 7:12:1771-1775
90. POISSANT J., SHAFER A., DAVIS C., MAINGUY J., COLTMAN D. ET al (2009) Genome-wide cross-amplification of domestic sheep microsatellites in bighorn sheep and mountain goats. *Molecular Ecology Resources*, 9:1121–1126 24.
91. HUANG Y., TU J., CHENG X., TANG B., LI N. et al. (2005) Characterization of 35 novel microsatelliteDNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genet. Sel. Evol.*, 37:455-472
92. RADINSKY L.B. (1969) The Early Evolution of the Perissodactyla. *Evolution*. 23 (2):308-328

93. CIFELLI R.L. (1981) Patterns of th Evolution among the Arthiodactyla and Perissodactyla (Mammalia) *Evolution* 35(3):433-440

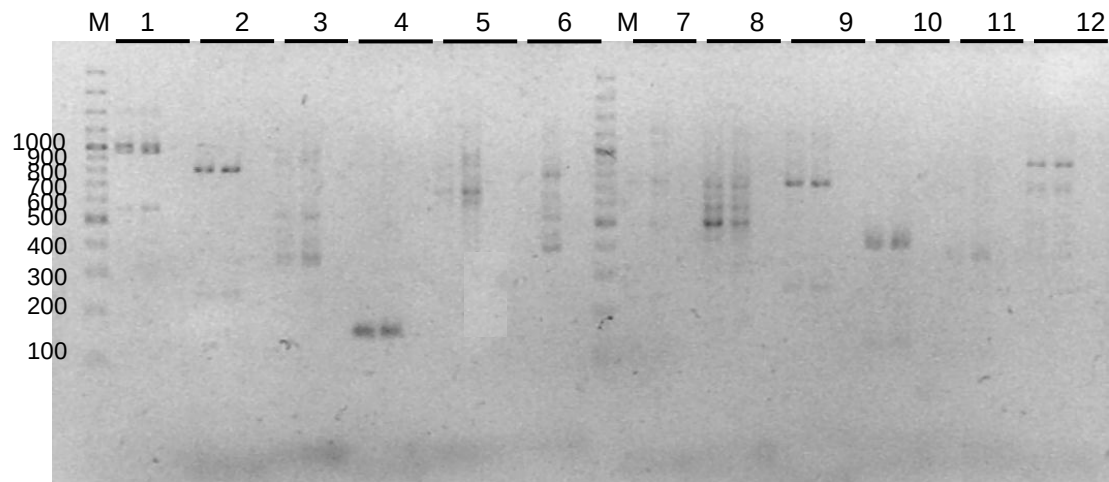
ANEXO 1

Amplificación de 12 marcadores microsatélites en alpaca mediante la técnica de PCR a una temperatura de alineamiento de 56°C. La M indica al marcador 100bp 1.BM4630, 2.BM1818, 3.CSSM066, 4.AGLA293, 5.BM4621, 6.TGLA179, 7.ILSTSO11, 8.MAF70, 9.BM6444, 10.BM6438, 11.BM4505, 12.HEL10



ANEXO 2

Amplificación de 12 marcadores microsatélites en alpaca mediante la técnica de PCR a una temperatura de alineamiento de 58°C. La M indica al marcador 100bp 1.BM4630, 2.BM1818, 3.CSSM066, 4.AGLA293, 5.BM4621, 6.TGLA179, 7.ILSTSO11, 8.MAF70, 9.BM6444, 10.BM6438, 11.BM4505, 12.HEL10



ANEXO 3

Cromatograma obtenido del Secuenciamiento del marcador BM1818 con el primer primer M13F.

ANEXO 4

Cromatograma obtenido del Secuenciamiento del marcador BM1818 con el primer primer M13R.