

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS LLAMAS  
(*Lama glama*) DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRARIA  
SANTA ANA - INIA UTILIZANDO LA REGIÓN CONTROL DEL  
ADN MITOCONDRIAL”**

Presentada por:

**Wendy Beatriz Pajares Chirre**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

LIMA-PERÚ

2018

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermano.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los todos los docentes que día a día nos brindan sus conocimientos y motivación de seguir adelante en la vida académica así también a la UNALM por permitirme ser parte de la familia molinera.

A mi asesor, PhD. Gustavo Gutiérrez por su esfuerzo, tiempo y dedicación.

A mi co-asesora, la Ing. Victoria Rivas muy agradecida por la confianza y la motivación brindada.

A Claudia y Eudosio por su guía y experiencia en el laboratorio.

A Lenin, Harry, Jonathan, Mabel, Julissa, Marcos, Dante, Giancarlo, Wendy, Marthita, Marco y Orson por su significativo apoyo, consejos y ánimos en las diferentes etapas del desarrollo del presente trabajo.

A Eric, Eef y David con quienes realicé mi primera PCR gracias por su inmenso apoyo y amistad.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1	Antecedentes filogenéticos e históricos de los Camélidos.....	3
2.2	Las llamas.....	7
2.2.1	Generalidades.....	7
2.2.2	Tipos de llamas.....	8
2.2.3	Importancia de la llama.....	10
2.2.4	Población y distribución de llamas en el Perú.....	12
2.3	ADN mitocondrial.....	13
2.3.1	Descripción.....	13
2.3.2	Evolución y aplicaciones.....	13
2.4	Medidas de variabilidad genética.....	15
2.4.1	Variabilidad Haplotípica.....	15
2.4.2	Variabilidad nucleotídica.....	15
2.5	Red de haplotipos.....	16
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1	Fase de Campo.....	17
3.2	Fase de Laboratorio.....	18
3.2.1	Extracción de ADN genómico a partir del folículo piloso.....	19
3.2.2	Calidad y cuantificación del ADN genómico extraído.....	21
3.2.3	Amplificación del segmento de la RC en el ADNmt.....	21
3.2.4	Secuenciamiento del segmento de la RC en el ADNmt.....	23

3.3	Fase de Análisis Bioinformático.....	24
3.3.1	Edición de secuencia.....	24
3.3.2	Análisis de las secuencias.....	24
3.3.3	Análisis de la variabilidad genética.....	25
3.3.4	Red de haplotipos.....	26
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
4.1	Calidad y cuantificación del ADN genómico extraído.....	30
4.2	Amplificación del segmento de la RC en el ADNmt.....	31
4.3	Secuenciamiento del segmento de la RC en el ADNmt.....	32
4.4	Análisis y descripción de las secuencias del segmento de la RC en el ADNmt.....	32
4.5	Alineamiento múltiple de secuencias.....	36
4.6	Medidas de variabilidad.....	41
4.7	Red de Haplotipos.....	41
4.8	Prueba D y Fs.....	47
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación de los camélidos. ....	3
Figura 2.	Llama Chaqu .....	8
Figura 3.	Llama K'ara.....	9
Figura 4.	Altura a la cruz (h).....	10
Figura 5.	Ubicación de la Estación Experimental Agraria Santa Ana.....	17
Figura 6.	Tipos de transiciones y transversiones. ....	25
Figura 7.	Electroforesis mostrando la calidad del ADN genómico extraído a partir de folículos pilosos de 7 primeras llamas analizadas.....	30
Figura 8.	Electroforesis mostrando la calidad del ADN genómico diluido a una concentración de aproximadamente 25ng/μl.....	31
Figura 9.	Electroforesis en gel de agarosa al 2 % mostrando marcador (L) productos de la PCR de los individuos LG747-LG766 provenientes de la EEASA y dos controles positivos .....	31
Figura 10.	Segmento del electroferograma obtenido luego de la secuenciación del segmento de la RC.....	32
Figura 11.	Gráfica de transiciones y transversiones para el segmento de la RC de los individuos de <i>Lama glama</i> comparadas contra la distancia corregida Kimura 2 parámetros (K80).....	35
Figura 12.	Alineamiento posiciones 1-60. ....	36
Figura 13.	Alineamiento posiciones 61-120. ....	36
Figura 14.	Alineamiento posiciones 121-180. ....	37
Figura 15.	Alineamiento posiciones 181-240. ....	37
Figura 16.	Alineamiento posiciones 241-300. ....	37
Figura 17.	Alineamiento posiciones 301-360. ....	38
Figura 18.	Alineamiento posiciones 361-420. ....	38
Figura 19.	Alineamiento posiciones 421-480. ....	38
Figura 20.	Alineamiento posiciones 480-514. ....	39
Figura 21.	Número de individuos por haplotipo encontrado. ....	40
Figura 22.	Red de haplotipos para <i>Lama glama</i> de la EEASA basada en el segmento de la RC.....	42

Figura 23.	Esquema alineamiento múltiple realizado con las secuencias generadas en esta investigación en la EEASA, en Mestanza (2014) del CIPQ y en Díaz (2014) de localidades de Perú y Ecuador. ....	43
Figura 24.	Diagrama de Venn de los haplotipos presentes en EEASA, CIPQ y localidades de Perú y Ecuador. ....	44
Figura 25.	Red de haplotipos para EEASA, CIPQ y localidades de Perú y Ecuador. ....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Población de llamas por departamento en Perú.....	12
Tabla 2.	Cebadores usados para amplificar el segmento de la RC en el ADNmt. ....	22
Tabla 3.	Condiciones del máster mix para la PCR. ....	22
Tabla 4.	Programa de amplificación. ....	23
Tabla 5.	Resultados de comparar las secuencias de los individuos provenientes de la EEASA con todas las secuencias presentes en el Genbank, se presenta la similitud nucleotíca encontrada para cada individuo .....	33
Tabla 6.	Lista de individuos de <i>Lama glama</i> indicando el haplotipo encontrado y las posiciones variables en el segmento de la RC.....	39
Tabla 7.	Lista de haplotipos para EEASA, CIPQ y localidades de Perú y Ecuador. ....	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Datos de colecta de cada llama seleccionada de la Estación experimental agraria Santa Ana.....	62
Anexo 2.	Cuantificación del ADN extraído a partir de folículos pilosos de llamas.....	72
Anexo 3.	Cálculos de dilución del ADN genómico. ....	73
Anexo 4.	Cuantificación del ADN genómico diluido. ....	74

## RESUMEN

El presente trabajo evaluó la variabilidad genética mitocondrial en las llamas (*Lama glama*) provenientes de la Estación Experimental Agraria Santa Ana (EEASA) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) en Junín. La extracción del ADN se realizó a partir de folículos pilosos provenientes de 20 individuos, se amplificó un segmento de la región control en el ADN mitocondrial utilizando los cebadores: LThr ARTIO y H15998. Los productos de la amplificación fueron secuenciados y se logró obtener la información genética de 18 de los 20 individuos muestreados. A partir de estas secuencias se analizó la variabilidad genética, también se compararon las secuencias obtenidas con secuencias de llamas provenientes del Centro de Investigación y Producción Quimsachata (CIPQ) del INIA en Puno y con secuencias de llamas de Perú y Ecuador depositadas en el GenBank. A partir de las 18 secuencias se identificaron 8 haplotipos. Los individuos presentaron una considerable diversidad haplotípica ( $H_d$ ) de 0,791 y una baja diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00465. La red de haplotipos no mostró una topología definida, sin embargo al construirla junto con las otras secuencias se observa una tipología tipo estrella. La información obtenida en el presente trabajo podría servir de apoyo en cuanto a la toma de decisiones respecto al manejo de los individuos de la estación así como para establecer planes de conservación eficientes.

**Palabras clave:** *Lama glama*, variabilidad genética, ADN mitocondrial.

## ABSTRACT

The mitochondrial genetic variability in llamas from the Santa Ana Agricultural Experimental Station (EEASA) of the National Institute of Agrarian Innovation (INIA) in Junin was assessed. The DNA extraction was performed from hair follicles from 20 individuals, a segment of the control region in the mitochondrial DNA was amplified using primers: LTHR ARTIO and H15998. The amplification products were sequenced and genetic information of 18 individuals out of 20 sampled was obtained. From these sequences the genetic variability was analyzed, the sequences obtained were also compared with llama sequences from the Quimsachata Center for Research and Production (CIPQ) INIA in Puno and llamas sequences from Peru and Ecuador. 8 haplotypes were identified from 18 sequences. The individuals had a considerable haplotype diversity ( $H_d$ ) of 0.791 and a low nucleotide diversity ( $\pi$ ) of 0.00465. The haplotype network did not show a defined topology, however, when constructed along with other sequences a star-like typology was observed. The information obtained in this study could bring support to the decision maker regarding the management of individuals from the station and in establishing efficient conservation plans.

**Keywords:** *Lama glama*, genetic variability, mitochondrial DNA.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde la época prehispánica, la crianza de camélidos sudamericanos ha sido de importancia cultural y económica para los pobladores alto-andinos (Cano *et al.*, 2012; Wheeler, 1995). Entre ellos, encontramos a la llama (*Lama glama*), como el camélido sudamericano doméstico más grande y mejor adaptado a un amplio rango de condiciones medioambientales (Bustamante *et al.*, 2006). La llama presenta dos variedades o fenotipos: K´ara o Pelada y Chaqu o Lanuda. Actualmente en muchos lugares de los Andes, la llama sigue prestando valiosos servicios por estar adaptada a vivir en altura y en zonas de escasos recursos naturales, por ejemplo, como animal de carga. Además, proporciona productos de alta calidad como la carne, y subproductos como pieles y cuero que tienen múltiples usos industriales y artesanales (Pinto *et al.*, 2010).

El Perú es el segundo país con el mayor número de llamas y presenta como reto el aprovechamiento de esta especie para poder luchar contra la pobreza y la inseguridad alimentaria que afecta a las comunidades campesinas que viven de la crianza de esta especie (FAO, 2005). Entonces, se necesita establecer futuros planes de manejo sostenible, mejoramiento genético y conservación de la diversidad genética de esta especie. Por lo tanto es necesario conocer la variabilidad genética y su distribución en las poblaciones, así como identificar alelos raros que indiquen la presencia de variantes genéticas únicas (González-Candelas y Montolio, 2000). En ese sentido, la Estación Experimental Agraria Santa Ana viene contribuyendo a la conservación de la variabilidad genética de las llamas mediante el mantenimiento de un núcleo de animales.

Una de las principales líneas de acción en los programas de conservación consiste en caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones existentes mediante el empleo de marcadores moleculares con la finalidad de que la información obtenida sea útil para la

implementación de programas de conservación y manejo sostenible, ayudando a asegurar los niveles apropiados de variabilidad genética y a evitar la endogamia (Torres, 1995; Marín *et al.*, 2007).

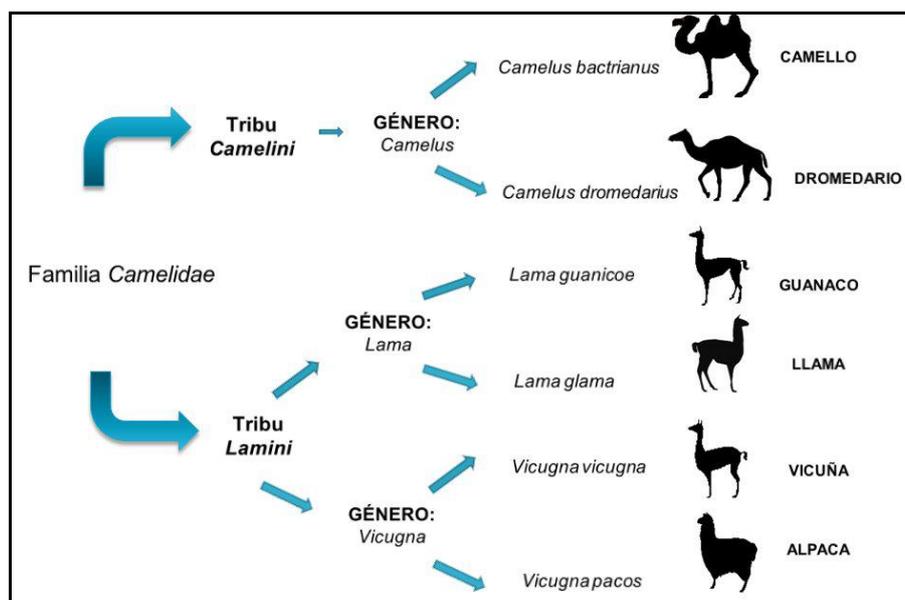
Entre las herramientas moleculares utilizadas para estudiar la variabilidad genética en muchas especies, incluyendo camélidos, tenemos a los marcadores tipo ADN mitocondrial (ADNmt) pues permiten identificar la variabilidad genética, además de la distribución de haplotipos y filogenia (Maté *et al.*, 2004; Kadwell *et al.*, 2001). Asimismo, en el ADNmt se encuentra la región control (RC), secuencia que presenta una alta variación inclusive entre especies relacionadas (Bruford *et al.*, 2003).

Consecuentemente, el presente trabajo tiene como objetivo general determinar la variabilidad genética de las llamas de la Estación Experimental Agraria Santa Ana (EEASA) mediante el análisis de un segmento de la región control (RC) en el ADNmt y como objetivos específicos determinar el número de haplotipos ( $h$ ), la diversidad haplotípica ( $H_d$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), y construir una red de haplotipos. Asimismo, comparar la información genética obtenida de las llamas de la EEASA con la de las llamas del Centro de Investigación y Producción Quimsachata (CIPQ) del INIA en Puno y con la información extraída del GenBank de llamas de Ecuador y Perú para dilucidar que individuos representarían un acervo genético diferente que justifique esfuerzos de conservación.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES FILOGENÉTICOS E HISTÓRICOS DE LOS CAMÉLIDOS

Según hallazgos fósiles la familia *Camelidae*, se habría originado en América del Norte aproximadamente en el Eoceno hace unos 40 - 45 millones de años. Posteriormente, hace unos 11 millones de años, habría ocurrido una división filogenética, la cual dio origen a dos tribus: *Camelini* y *Lamini*. Estas dos tribus migraron hacia América del Sur y Asia respectivamente, alrededor de 3 millones de años atrás. En América del Norte desaparecieron estas dos tribus hace unos 10,000 años. En Asia, la tribu *Camelini* desarrolló a los camellos y dromedarios actuales, mientras que en América del Sur la tribu *Lamini* desarrolló cuatro especies, dos de ellas silvestres: el guanaco (*Lama guanicoe* Müller, 1776) y la vicuña (*Vicugna vicugna* Molina, 1782), y dos de ellas domésticas: llama (*Lama glama* Linnaeus, 1758) y la alpaca (*Vicugna pacos*) (Honey *et al.*, 1998; Marín, 2007b; Wheeler, 2012).



**Figura 1: Clasificación de los camélidos.**

FUENTE: Pinto et al., 2010.

Respecto a las cuatro especies de América del Sur, Frisch (1775) propuso que sean indexadas en el género *Lama*. Sin embargo, no fue sino hasta 1924 que Miller separó a la vicuña en el género *Vicugna*, tomando como referencia la base del crecimiento continuo de los incisivos. No obstante, Miller no incluyó incisivos de alpaca en su estudio y en consecuencia no se percató de la similitud entre éstos y los incisivos de la vicuña, por lo que a causa de esta omisión ambas formas domésticas y el guanaco compartían el género *Lama* (Wheeler; 2005). Estudios posteriores en los que además de tener en cuenta la morfología dentaria (incisivos), también se consideraron características del pelaje, patrones de conducta, así como análisis moleculares, contribuyeron a la controversia respecto del origen de las formas domésticas.

Respecto a la comparación de la morfología de incisivos en restos arqueológicos de la puna peruana, se detectaron similitudes entre alpacas y vicuñas, lo que permitió concluir que las alpacas eran formas domésticas de las vicuñas (Wheeler, 1984; Wheeler, 1995) con lo cual se desvirtuó la hipótesis de que la alpaca fuese descendiente del guanaco, la vicuña y la llama. Paralelamente, las evidencias arqueológicas apuntaron a múltiples eventos de domesticación en el área de distribución del guanaco *L.g. cacsilensis*, incluyendo el Perú, posiblemente hace 6.000 años (Wheeler *et al.*, 1976; Wing, 1977)

En cuanto a los análisis moleculares realizados con la finalidad de dilucidar las relaciones filogenéticas y diferenciación genética entre los camélidos sudamericanos, la mayoría de estos se encuentran basados en un solo gen mitocondrial o en pequeñas porciones de genes mitocondriales, esto es porque las regiones presentes en el ADNmt han demostrado ser mucho más variables, en más de 10 veces, que las regiones no codificantes en el genoma nuclear (Di Rocco *et al.*, 2010). Estos análisis han servido de gran apoyo para dilucidar el origen de las formas domésticas pues, debido principalmente a la alta tasa de hibridación entre llamas y alpacas y a dificultades en la interpretación de los restos zoo arqueológicos (Kadwell *et al.*, 2001), el origen de llamas y alpacas ha sido históricamente material de controversia (Wheeler, 2005).

Entre los estudios moleculares realizados en camélidos sudamericanos, se encuentra el del análisis de la secuencia parcial del gen citocromo *b* (900pb), en el cual Palma *et al.*, (2001) evaluaron el estatus taxonómico de 3 subespecies de guanaco (*Lama guanicoe guanicoe*, *L. g. cacsilensis* y *L. g. huanacus*) y de ambas subespecies de vicuñas (*V. vicugna* y *V. mensalis*). Como resultado en este estudio se reforzó la monofilia de *L. guanicoe*, sin embargo, se mostró a *V. vicugna* como grupo polifilético, dejando a la llama como el taxón hermano del guanaco, y a la alpaca de la vicuña. Asimismo, analizando también, secuencias parciales del gen para citocromo *b* del ADNmt (Stanley *et al.*, 1994; Wheeler *et al.*, 2006) y la disposición de ADN satélite (Vidal-Rioja, 1994), se estableció la ocurrencia de hibridación en el pasado. Del mismo modo, a partir del análisis de la secuencia parcial del gen citocromo *b* y de cuatro microsátélites en una muestra de llamas, alpacas, vicuñas y guanacos de Chile, Argentina y Perú, a nivel transandino, se concluyó en líneas generales que *Lama* y *Vicugna* son géneros válidos que se separaron de 2-3 millones años atrás, además se sugirió que cada género contiene dos especies: Un ancestro silvestre y su correspondiente descendiente doméstico, considerándose a la alpaca como descendiente de la vicuña, mientras que a la llama como descendiente del guanaco ( Stanley *et al.*, 1994; Kadwell *et al.*, 2001; Sarno *et al.*, 2001). En concordancia a lo antes mencionado, mediante análisis de patrones de Bandas G de los cromosomas, y así como las secuencias del gen citocromo *b* y la región hipervariable I de la región control del ADNmt, quedó una vez más demostrada la alta similitud genética entre las llamas y los guanacos así como entre las alpacas y las vicuñas. (Marín *et al.*, 2007a).

Por otra parte, el guanaco (*Lama guanicoe*) es el artiodáctilo silvestre de mayor tamaño en América del Sur, tradicionalmente en base a su distribución, tamaño y coloración cuatro subespecies han sido reconocidas: *L. guanicoe guanicoe* Müller, 1776; *L.g. huanacus* Molina, 1782; *L.g. cacsilensis* Lönnberg, 1913; y *L.g. voglii* Krumbiegel, 1994 (Marin *et al.*, 2008; Wheeler, 1995). Para evaluar a nivel molecular la validez de las cuatros subespecies históricamente descritas se analizaron la región parcial de la región control del ADNmt y el gen completo del citocromo *b* examinándose la estructura filogeográfica de *L. guanicoe* a lo largo de su rango geográfico, los resultados mostraron que los guanacos de Perú, Bolivia, Argentina y Chile constituyen un grupo monofilético y que a pesar de su extensa distribución los guanacos presentan una baja diversidad genética cuando se les compara con otras especies de distribución extensa.

Además, los datos moleculares no apoyaron la ocurrencia de las 4 subespecies de guanacos, sin embargo se aprecia la estructuración de las poblaciones más septentrionales (Perú y norte de Chile) con respecto a los guanacos de Argentina, Bolivia y resto de Chile. (Marín *et al.*, 2008)

Entonces, en base a los resultados de los estudios moleculares usando ADNmt y nuclear, se fortaleció la hipótesis proveniente de evidencias arqueozoológicas que sugieren que la llama doméstica se originó en los andes centrales peruanos entre 7000 y 6000 años atrás a partir de poblaciones de guanacos del norte (*L.g. cacsilensis*) (Wheeler, 1986). Aunque, si bien los análisis de secuencias de ADNmt apoyan estas relaciones filogenéticas entre el guanaco y la llama, también han abierto la posibilidad de la existencia de más de un centro de domesticación en América del Sur así como que el proceso de domesticación de llamas no habría ocurrido en una sola localización geográfica pues se encontraron haplotipos de llamas compartidos con guanacos del sur (Barreta *et al.*, 2012).

En el Perú, la mayoría de estudios moleculares realizados en camélidos son principalmente en alpacas y vicuñas (Wheeler *et al.*, 1995; Vallejo, 2008) y son escasos aquellos en llamas y guanacos. Además, los estudios genéticos en llamas son básicamente limitados al análisis de parámetros cuantitativos de rasgos relacionados al crecimiento y la fibra (Cristofanelli *et al.*, 2005; Quispe *et al.*, 2009). En la actualidad el conocimiento de la variabilidad genética de las llamas de Junín se encuentra limitado al estudio realizado por Cano *et al.*, 2012 en el cual se analizó el ADNmt de 50 llamas K'ara que presentaban fenotipo guanaco y se encontró que todos los individuos presentaron el haplotipo ancestral guanaco. Estos animales en su fenotipo mantenían, homogéneamente el color ancestral del guanaco; este tipo de llamas descrito reveló la posible existencia de una desconocida variabilidad genética de camélidos en el país la cual necesita ser estudiada (Cano *et al.*, 2012).

## 2.2 LAS LLAMAS

### 2.2.1 GENERALIDADES

La llama pertenece al orden *Artiodactyla*, suborden *Tylopoda*, familia *Camelidae*, tribu *Lamini* género *Lama* y especie *Lama glama*. Es el camélido sudamericano doméstico más grande y mejor adaptado a un amplio rango de condiciones medioambientales, por lo que pueden ser encontradas a lo largo de toda la región andina, con una distribución geográfica de 2-27°S. Bolivia cuenta con el 66% de la población total con aproximadamente 2,5 millones de individuos (Wheeler *et al.*, 2004; Bustamante *et al.*, 2006; Barreta *et al.*, 2012); y en el Perú, la población fue de 746 269 individuos en el último censo INEI (2012), encontrándose una mayor concentración en los departamentos de Puno y Cusco.

La organización social de la llama es similar a la de los guanacos silvestres, la cual consiste de rebaños formados por machos, hembras y sus crías, donde se establecen jerarquías sociales con un macho dominante que controla el acceso de otros machos a su territorio de reproducción, alimento y bebida. Cada rebaño tiene un territorio permanente establecido por un macho reproductor, quien expulsa a las crías macho antes de que cumplan un año de edad y retiene a las hembras para asegurar el crecimiento del rebaño (Franklin, 1992).

La cría de estos animales está dirigida a la producción de carne y en menor proporción de fibra. Las técnicas de manejo de los rebaños, aunque conservan parte de la tradición cultural de la zona tienen un alto componente de técnicas europeas. La selección dentro de los rebaños se realiza en base a rasgos fenotípicos y, si bien los pastores tradicionalmente admiten la existencia de híbridos entre llamas y alpacas, no siempre es posible reconocer estos animales basándose solamente en su fenotipo (Kadwell *et al.*, 2001).

Esta existencia de híbridos entre llamas y alpacas ha sido en parte evidenciada por medio del uso de herramientas moleculares, la evidencia genética fue generada mediante el secuenciamiento del ADNmt y sus resultados ubicaron al 86% de las llamas estudiadas en el genotipo tipo guanaco (Stanley *et al.*, 1994). Como el guanaco, la llama se ha adaptado a un gran rango de condiciones ambientales y la semejanza con su

progenitor, *L. guanicoe*, es evidente en un sinnúmero de aspectos morfológicos y etológicos.

### **2.2.2. TIPOS DE LLAMAS**

Se clasifican en base a su apariencia física y características de su fibra en Chaqu y K'ara, conocidas también como lanuda y pelada. Respectivamente; mientras que la Chaqu tiene mayor cobertura de fibra, la K'ara tiene una apariencia de mayor fortaleza corporal. Su fibra es de menor calidad que la de alpaca y se produce en menor cantidad. Presenta dos capas de fibra: Una interior, fina y otra exterior, gruesa (Wheeler *et al.*, 1992). Estos fenotipos tienen carácter hereditario y se identifican en el rebaño como fenotipos extremos; sin embargo, existen también los fenotipos intermedios de difícil categorización (Iñiguez *et al.*, 1998).

La llama Chaqu también conocida como “Chaco”, “Cha’co”, “Tkaja” y “Lanuda”, presenta una mayor cobertura de vellón que las llamas K'ara, sus fibras son levemente rizadas y uniformes al tacto. Asimismo, en comparación con las K'ara, presentan menor cantidad de pelo grueso y variabilidad en su finura (Maquera, 1991 y Franco *et al.*, 2009). Respecto a su tamaño corporal, Cortez *et al.* (2006), indican una altura promedio a la cruz de  $100.4 \pm 13.2$  cm en llamas de Bolivia mayores de 3 años, mientras que Maquera (1991) encontró medidas promedio de perímetro torácico de 106.63 cm. en llamas de Perú mayores de 2 años.



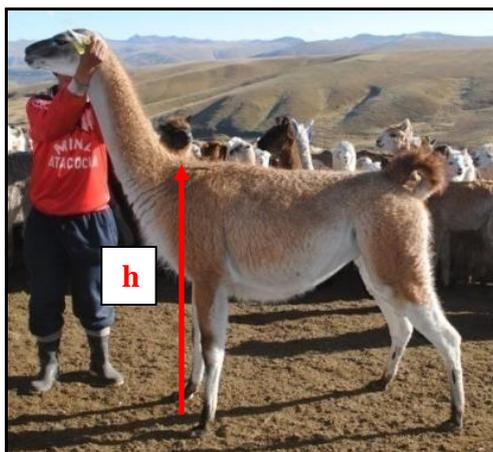
**Figura 2: Llama Chaqu**

La llama K'ara también conocida como “Gala”, “Ccara”, “Gara” y “Pelada”; presenta un vellón menos abundante que las Chaqu (especialmente en cuello y extremidades) distribuido en dos capas: Una inferior con fibra fina y densa que cubre toda la superficie del cuerpo y una superior compuesta por fibras más gruesas y largas que se aprecian sobre el vellón como cerdas en baja densidad. (Maquera, 1991; Barros, 1997 y Franco *et al.*, 2009). Respecto a su tamaño corporal, Cortez *et al.*, (2006) y Cano *et al.*, (2012), encontraron una altura promedio a la cruz de  $102.4\pm 10$  en llamas de Bolivia y  $123.2\pm 12.2$ cm en llamas de Perú, mientras que Maquera (1991), reportó un perímetro torácico de hasta 109.35 cm en animales adultos.



**Figura 3: Llama K'ara**

Las llamas de fenotipo intermedio no presentan mechass de fibra en orejas y cabeza, muestran una menor cobertura de vellón en la mitad superior del cuello, dándole una apariencia piramidal en su base. En algunos casos, exhiben en su cara dorsal (frente y zona nasal) cerdas que sobresalen de las fibras finas, no observadas en llamas K'ara y Chaqu. En cuanto a su tamaño corporal, se indica una altura promedio a la cruz en hembras y machos de 1.11m (Maquera, 1991).



**Figura 4: Altura a la cruz (h).**

### **2.2.3 IMPORTANCIA DE LA LLAMA**

Desde tiempos ancestrales los camélidos domésticos, llamas y alpacas, fueron de gran importancia en los Andes, representando estatus, riqueza y proveyendo un amplio rango de bienes y servicios, incluyendo sacrificios religiosos, transporte y medicina (Shimada *et al.*, 1985). Durante el incanato, caravanas de llamas habrían acompañado a los ejércitos reales, extendiendo su distribución a lo largo de los Andes, desde el sur de Colombia a la zona central de Chile (Wheeler, 1995) Hace 1 400 años la crianza de llamas era establecida en la costa del Perú (Shimada y Shimada 1985, Wheeler *et al.*, 1995) y Ecuador (Wing, 1986) llegando a jugar un rol importante en la economía local.

Entre sus principales usos tenemos: fibras (textil), carne y transporte. El uso textil de sus fibras se inició con la Cultura Huaca Prieta hace 2500 años (Wheeler *et al.*, 2004), tuvo un desarrollo evidente en la Cultura Paracas y posteriormente alcanzó niveles de excelencia en la cultura Mochica (Wing, 1977). La fibra de llama es una proteína natural sin lanolina (grasa), clasificada como una fibra especial y caracterizada como fina, resistente, abrigadora y ligera (Campero, 2005a).

Respecto a la carne de llama, ésta representa una importante fuente de proteínas para el poblador alto-andino, su valor proteico promedio varía entre 21.5% y 23.88% en llamas adultas, mayores de 3 años (Pérez, 1999 y Mamani-Linares y Gallo 2011). Este valor proteico es superior a los valores encontrados en carne bovina (20%) y porcina (17%). El producto más comercializado a partir de la carne de llama es el “charqui”, obtenido

por medio de su desecación al medio ambiente; en promedio contiene un 20% de humedad, contenido proteico mínimo de 45% y valores de grasa de aproximadamente 12% (Pérez *et al.*, 1999; Oyague *et al.*, 2010; Mamani-Linares y Cayo, 2011).

Asimismo, los camélidos desempeñaron a lo largo de la historia una función fundamental no sólo en el transporte e intercambio de productos entre distintas regiones, sino también en los intercambios sociales que permitieron la sobrevivencia y el desarrollo de muchas culturas andinas (Wheeler *et al.*, 1995; Iñiguez y Alem, 1996 y Barreta 2012a). Su capacidad de carga alcanza hasta los 45 kilogramos, realizando viajes de hasta 20 días a razón de 35 km por día (Iñiguez y Alem, 1996; Egey y Miragaya, 2006; Reigadas, 2007 y Franco *et al.*, 2009).

Actualmente en estudios de biomedicina referentes a la elaboración de vacunas contra el virus del sida (VIH) se han utilizado nano anticuerpos provenientes de llamas. La importancia en utilizar anticuerpos provenientes de llamas radica en que estos anticuerpos están constituidos por un solo gen, mientras que los anticuerpos de humanos y los de la mayoría de las especies están formados por dos genes, que tienen que ser emparejados correctamente. Otra ventaja es que los anticuerpos de llama son más pequeños que los anticuerpos humanos y se unen más fácilmente a la superficie del virus. Por lo que las llamas constituyen un modelo útil para generar anticuerpos específicos contra patógenos difíciles de combatir, como el VIH (McCoy *et al.*, 2014).

En resumen, las llamas son uno de los animales más útiles e importantes para las familias del altiplano pues a partir de su ganadería se obtiene fibra y carne, su excremento como combustible, ocasionalmente sus intestinos son usados para hacer cuerdas y tambores, (Wilson y Reeder, 2005). Además, las llamas constituyen un recurso genético nativo, son patrimonio natural, cultural, histórico y de vital importancia en la serranía central del Perú.

## 2.2.4 POBLACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LLAMAS EN EL PERÚ

Se estima que la población de llamas existentes en el Tahuantinsuyo fue aproximadamente 23 millones. Con la conquista del Perú en el año 1532, documentos de los siglos XVI y XVII registraron una disminución severa de llamas y alpacas, como causa de la transmisión de enfermedades foráneas que acarrearón las especies introducidas por los colonos (Murra *et al.*, 1986). Después de la colonización española se generó una masiva mortalidad de aproximadamente el 90% de los camélidos domésticos, llamas y alpacas, los animales sobrevivientes fueron desplazados a zonas muy altas aptándose a una ecología agreste y en la cual no prosperaban animales de origen europeo (Flores Ochoa, 1982; Novoa, 1984).

Al año 2012, la población de llamas en nuestro país fue de 746 269 animales (Tabla 1) encontrándose una mayor concentración en los departamento de Puno y Cusco. La tendencia de variación del número de llamas a nivel nacional descendió en un 25.81% entre los años 1994 y 2012.

**Tabla 1: Población de llamas por departamento en Perú.**

Departamento	Número	Porcentaje
Puno	237 669	31.85
Cusco	121 898	16.33
Arequipa	102 536	13.74
Huancavelica	54 600	7.32
Pasco	43 970	5.89
Ayacucho	43 961	5.89
Junín	36 094	4.84
Apurímac	36 042	4.83
Moquegua	26 493	3.55
Tacna	21 602	2.89
Lima	13 082	1.75

Continuación

Huánuco	5 733	0.77
Ancash	726	0.10
Cajamarca	563	0.08
Piura	360	0.05
La Libertad	310	0.04
Otras provincias	2385	0.08
Total	746 269	100

FUENTE: INEI (2012)

## 2.3 ADN MITOCONDRIAL

### 2.3.1 DESCRIPCIÓN

Las mitocondrias son orgánulos celulares, situados en el citoplasma, encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, por tanto, actúan sintetizando ATP a expensas de los glucosa, ácidos grasos y aminoácidos. Presentan una estructura característica, mostrando una forma alargada u oval de varias micras de longitud. Este orgánulo presenta dos membranas distintas, una externa y otra interna muy replegada, formando las crestas mitocondriales. Dichas membranas definen dos compartimentos, un espacio interno denominado matriz y un espacio intermembranal. Cada célula somática típica contiene de 500 a 1000 unidades y cada una de ellas acoge entre 5 y 11 copias del genoma mitocondrial (Cavelier *et al.*, 2000). En consecuencia, existe un gran número de copias del genoma mitocondrial por célula.

### 2.3.2 EVOLUCIÓN Y APLICACIONES

El ADNmt es haploide y de herencia uniparental, del tipo materno, por lo tanto, la variabilidad en la secuencia del genoma es introducida solamente por mutaciones. El grado de sustitución en el genoma mitocondrial es generalmente de 5 a 10 veces más alto que el del ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979). La razón de esta alta tasa de sustitución es la baja eficiencia de reparación de la ADN polimerasa en la replicación de

su genoma (Lansman y Clayton, 1975), que es 1000 veces más alta que en el caso de la replicación del ADN nuclear (Johnson y Johnson, 2001a y b).

El ADNmt es considerado como un marcador estrictamente neutro, pese a presentar una tasa de mutación elevada (Brown *et al.*, 1979; Vawter y Brow, 1986). Las distintas substituciones heterogéneas y el exceso relativo de polimorfismo de reemplazo (substituciones conduciendo a cambios de aminoácido no-sinónimas) proponen una idea de papel que ocupa la selección en el polimorfismo del ADNmt (Ballard y Kreitman, 1995). Preestablecer una evolución neutral de ADNmt, es esencial para el análisis que implica estimaciones de distancias genéticas y del reloj molecular (Avise *et al.*, 1987). Si realmente el ADNmt fuera estrictamente neutro, sería un indicador sensible de procesos a nivel demográfico de relaciones entre linajes maternos en una población. También puede ser usado a la hora de remontar acontecimientos históricos poblacionales demográficos como “cuellos de botella”, o para analizar zonas híbridas. El ADNmt también puede ser muy útil en la resolución de relaciones filogenéticas entre poblaciones estrechamente relacionadas (Moritz *et al.*, 1987). Por lo tanto, un árbol filogenético basado en ADNmt es, probablemente, más congruente a la hora de esclarecer los engranajes que se establecen en una especie, incluso cuando los acontecimientos de especiación han ocurrido dentro de períodos de tiempo muy cortos.

Para realizar estudios de diversidad genética en poblaciones de camélidos se sugiere el uso de la secuencia parcial de la región control (RC), un segmento de 515pb, presente en el ADNmt como marcador molecular pues esta región incluye la mayor parte de la variabilidad nucleotídica con 10 sitios polimórficos para llamas, alpacas, guanacos y vicuñas. La RC ha mostrado evolucionar más rápido que otras regiones del ADNmt además de mostrar alta variación en la secuencia aún entre especies relacionadas, razón por la cual se ajusta para estudios de diferenciación genética, estructura poblacional, distribución de haplotipos y filogenia (Maté *et al.*, 2004; Bruford *et al.*, 2003).

## 2.4 MEDIDAS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética en una población está constituida por los cambios en el material genético presentes en los individuos que la constituyen. Generalmente se cuantifica a partir de una muestra de estos individuos y del análisis de un número limitado de genes o posiciones nucleotídicas.

### 2.4.1 VARIABILIDAD HAPLOTÍPICA

- a. Número de Haplotipos (h) Número de haplotipos diferentes en la muestra, es decir, el número de secuencias diferentes de la muestra (Nei, 1987). Se entiende por haplotipo al material genético haploide heredado por una sola línea parental.
- b. Diversidad Haplotípica (Hd) Probabilidad de que dos individuos tomados al azar presenten secuencias diferentes (Nei, 1987). El valor de Hd varía entre 0 y 1. Si todos los haplotipos de la muestra son iguales el valor de Hd será 0 y si todos son distintos el valor de Hd será 1.

### 2.4.2 VARIABILIDAD NUCLEOTÍDICA

Número de sitios polimórficos (S): Es el número de sitios con al menos dos nucleótidos diferentes en el mismo sitio de la secuencia. Depende en gran medida el número de sitios (m) y del número de secuencias (n). Sólo es comparable entre muestras de igual tamaño y número de sitios. Esta medida de variabilidad nucleotídica es similar, pero no igual, al Número Total de Mutaciones ( $\eta$ ), ya que:  $\eta \geq S$

Debido a que en un mismo sitio, entre varias secuencias, puede haber más de un cambio nucleotídico. Es decir, que existe la posibilidad de un sitio polimórfico en la muestra con más de una mutación entre secuencias. Los sitios polimórficos, dentro de una secuencia de ADN, pueden dividirse a su vez en:

- Sitios informativos: Son los sitios en los cuales hay, por lo menos, dos nucleótidos diferentes y uno de ellos con una frecuencia muy alta.

- Sitios no informativos (singletons): Son los sitios que contienen solamente un nucleótido distinto al ser comparados con las demás secuencias en un alineamiento.

Al resto de nucleótidos que no varían entre secuencias se los denomina posiciones constantes.

- a. Número medio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ): Es el número medio de diferencias nucleotídicas entre cada par de secuencias de la muestra (Tajima, 1983). Depende en gran medida del número de posiciones y sólo es comparable en muestras de igual longitud.
- b. Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ): Probabilidad de escoger dos secuencias al azar y que difieran en una posición determinada (Nei y Li, 1979).

## **2.5 RED DE HAPLOTIPOS**

Las redes Haplotípicas consisten en un gráfico que permite visualizar patrones demográficos, flujo genético y posibles cuellos de botella en las poblaciones. Es empleado generalmente para evaluar eventos como hibridación, transferencia genética horizontal o recombinación. Además, se utiliza, para observar las relaciones de ancestralidad-descendencia entre los haplotipos, así como para discutir sobre las topologías que se presentan.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 FASE DE CAMPO

La fase de campo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agraria Santa Ana (EEASA) donde se realizó la colecta de muestras.

La EEASA se encuentra ubicada en el departamento de Junín, provincia de Huancayo, distrito El Tambo, sede Física de Hualahoyo – Saños Grande, a una latitud Sur de 12°00'50", Longitud Oeste de 75°13'11", altitud de 3,260 msnm.

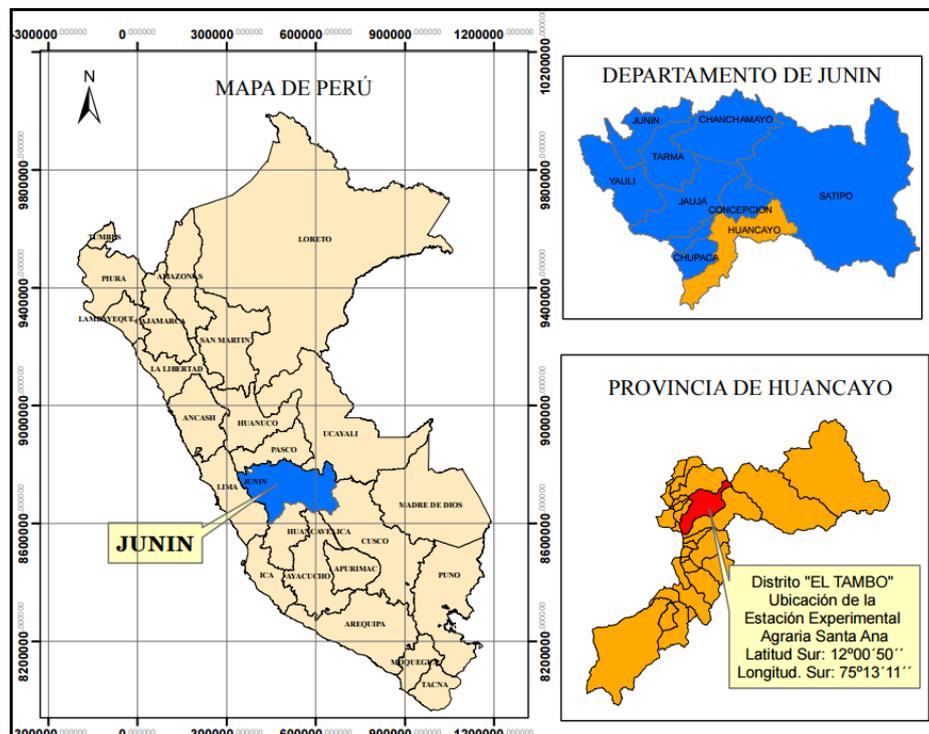


Figura 5: Ubicación de la Estación Experimental Agraria Santa Ana.

El Ing. Magno Lucio Requena Musucancha, responsable del área de producción de reproductores en vacunos y camélidos de la EEASA, indica que aproximadamente en 1988 se formó un núcleo de reproductores con animales provenientes de Puno, Huancavelica y Ayacucho. Luego, la cría de llamas en la EEASA se formó con el Programa Nacional de Investigación en Camélidos en el año 1999, en base al convenio con el Sr. Máximo Segura Carrasco de la Comunidad Campesina de Ricran, distrito Ricran, Provincia de Jauja, Región de Junín por el cual ingresan 40 llamas al predio de la Estación ubicada en Suitucancha, que también por un convenio firmado por la Comunidad Campesina de Paccha otorgan terrenos en calidad de préstamo al INIA.

En años posteriores se introducen reproductores machos de la Comunidad Campesina de Marcapomacocha - Junín, Comunidad Campesina de Diesmo Palcan - Cerro de Pasco y, Comunidad Campesina de Tanta ubicada en la sierra de Lima, incrementándose en los años siguientes hasta la actualidad a un total de 206 llamas propiedad de la EEASA. Actualmente, se necesita determinar si en la colección de individuos merece el esfuerzo conservar algún individuo puesto que por motivos de presupuesto la tendencia es disminuir los animales.

Respecto al proceso de colecta de muestras, este se realizó de la siguiente manera:

- Se seleccionó al azar el 10% de las llamas totales de la estación y de cada una se colectó dos mechones de pelo de la base de la cola. En total se obtuvieron 40 muestras de pelo (por duplicado por cada individuo)
- Se registraron los datos de cada animal elegido: Número de arete, sexo, edad y foto. (Anexo 1)
- Las muestras se mantuvieron en bolsas ziploc cerradas herméticamente.

### **3.2 FASE DE LABORATORIO**

La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA.

### 3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DEL FOLÍCULO PILOSO

La extracción del ADN genómico, a partir del folículo piloso de llamas, se llevó a cabo mediante el protocolo alcohol-isoamílico, modificado y estandarizado, a partir del protocolo de extracción fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 2001), por el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA. Para cada muestra se realizó lo siguiente:

#### DÍA 1

1. Encender el termobloque y regular a una temperatura de 55°C
2. En un tubo de microcentrífuga (2.0mL) adicionar 750 µl de TE 20:5 y 75µl de SDS
3. Adicionar 15 µl de proteinasa K (20ng/µl)
4. Adicionar 50 µl de DTT (1M)
5. Adicionar aproximadamente 40 pelos, cortando a una distancia de 5 a 10mm del folículo, homogenizar usando vortex.
6. Incubar a 55°C por 3 horas (Observar cada 30 minutos, hasta que se degraden los pelos)
7. Después de las primeras 2 horas de incubación adicionar 50 µl de DTT
8. Retirar los tubos del termobloque y enfriar durante 10 minutos aproximadamente.
9. Adicionar 500µl de acetato de potasio 3M, mezclar usando vortex aproximadamente durante 1 minuto y refrigerar durante 10 minutos a -20 °C.
10. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos, 10 °C y recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5mL
11. Enrazar con cloroformo alcohol isoamílico y homogenizar en vortex por 1 minuto.
12. Centrifugar a 14 000rpm por 10 minutos a 10 °C, y recuperar el sobrenadante en 2 tubos (es decir por duplicado para cada muestra) de 1.5mL, que contengan 800µl de isopropanol helado.
13. Homogenizar suavemente por inversión para la formación del pellet de ADN. Refrigerar durante 15' a -20°C.
14. Centrifugar a 14 000rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante.

15. Adicionar 200µl de TE 20:5, 200µl de acetato y 500µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), homogenizar con vortex por 1 minuto.
16. Centrifugar a 14 000rpm por 15 minutos y recuperar el sobrenadante de las muestras por duplicado en un solo tubo de microcentrífuga.
17. Adicionar 600µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), Vortex por 1 min.
18. Centrifugar a 14 000rpm por 10 minutos a 10 °C, trasvasar el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL
19. Adicionar aproximadamente 800 µl de etanol absoluto (enrazar a 1.5mL), invertir suavemente hasta visualizar el algodón de ADN y refrigerar a -20 °C durante 30' o hasta el siguiente día.

## DÍA 2

1. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10 °C y eliminar el sobrenadante por inversión cuidando de no echar fuera el pellet.
2. Adicionar 200 µl de TE 20:5 y mezclar. Adicionar 8 µl de NaCl 5M. Mezclar utilizando Vortex
3. Adicionar etanol helado 500 µl, mezclar invirtiendo el tubo suavemente hasta que se formen los pellets de ADN, dejar a 20 °C por 20 minutos.
4. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10 °C y eliminar el sobrenadante.
5. Adicionar 400 µl de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante por inversión.
6. Adicionar 400 µl de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante por inversión.
7. Adicionar 300 µl de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10°C, eliminar el sobrenadante por inversión.
8. Adicionar 400 µl de etanol absoluto. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10°C, eliminar el sobrenadante por inversión.
9. Adicionar 200 µl de etanol absoluto. Centrifugar por 5 minutos a 14 000rpm a 10°C, eliminar el sobrenadante por inversión.
10. Dejar secar en la estufa a 39 °C
11. Resuspender en buffer TE 10:1 (o en agua libre de nucleasas), de acuerdo al tamaño del pellet de ADN.
12. Almacenar a -20°C.

### **3.2.2 CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO EXTRAÍDO**

La calidad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, se preparó un gel de 12cmx12cm al 0.6% de agarosa disuelta en TBE 1X y bromuro de etidio (BrEt). El BrEt se intercala entre las cadenas de ADN y fluoresce al ser expuesto a una fuente de luz UV. Luego se cargaron las muestras en los respectivos pocillos tomando 2  $\mu$ l de ADN y 6  $\mu$ l de buffer de carga Sal B (7.5mg colorante azul de bromofenol, 7.5mg xilencianol, 10mg naranja G, 3g sucrosa, 250  $\mu$ l TBE 10X y 5mL agua mili Q) y la corrida electroforética tuvo como duración 20minutos a 70V, finalmente se tomó una foto.

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio del equipo Epoch mediante el cual se obtiene la concentración de ADN expresada en ng/ $\mu$ l y el estado de pureza del ADN se calculó efectuando el cociente entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280nm. Si este valor se halla entre 1.8-2.0, el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares. Valores por debajo de 1.8, indican contaminación con proteínas o fracciones de membranas. El procedimiento consistió en preparar la placa con 2  $\mu$ l de muestra de ADN, el blanco fue el buffer TE 10:1. Luego de realizar la cuantificación del ADN extraído se procedió a realizar los cálculos respectivos para alcanzar una concentración de ADN de  $\sim$ 25ng/  $\mu$ l (ANEXO 3), y se evaluó la calidad del ADN diluido en un gel de agarosa al 0.6% según las condiciones antes descritas. Finalmente, se cuantificó el ADN genómico diluido mediante el equipo Epoch.

### **3.2.3 AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO DE LA RC EN EL ADN<sub>mt</sub>**

La amplificación se realizó mediante el uso de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dicha técnica fue diseñada por Dr. Kary Mullis en 1987 y es ampliamente usada en el área de biología molecular, microbiología, genética, etc. La técnica consiste en que la molécula original de ADN o cadena molde es replicada por la enzima ADN polimerasa, duplicando así el número de moléculas de ADN. A continuación cada una de estas moléculas se replican en un segundo ciclo de la replicación, lo que resulta en cuatro veces el número de las moléculas originales, y estos ciclos se repiten sucesivamente. Se eligió un segmento parcial (513-514pb) en la región control del ADN mitocondrial, pues esta región posee una alta tasa de mutación

confiriéndole importancia al tratarse de un estudio en variabilidad genética, el protocolo de PCR se desarrolló acuerdo a las condiciones de las tablas 2, 3 y 4.

**Tabla 2: Cebadores usados para amplificar el segmento de la RC en el ADNmt.**

Cebadores	Secuencia del cebador (5' -> 3')	Tamaño del Fragmento (pb)	Temperatura de Alineamiento (°C)	Fuente
LThr ARTIO	GGT CTT GTA AGC CGA AAA AGG A	22	55.6	Marín <i>et al.</i> , 2007a
H15998	CCA GCT TCA ATT GAT TTA ACT GCG	24	56	Marin <i>et al.</i> , 2007b

**Tabla 3: Condiciones del máster mix para la PCR.**

Componentes	Volumen (µl)	Concentración Final	4 Reacciones (µl)
5X PCR Buffer, sin Mg	4	1X	16
2.5mM dNTPs mixture	1.6	0.2mM	6.4
25mM MgCl <sub>2</sub>	2.4	3mM	9.6
5uM H15998	0.75	0.1875 µM	3
5 µM LThr ARTIO	0.75	0.1875 µM	3
5U/ µl Taq	0.2	1U	0.8
30-50 ng/µl ADN	2		8
Agua	8.3		33.2
Volumen Total	20		80

**Tabla 4: Programa de amplificación.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	45 segundos	35
Alineación	64	45 segundos	
Extensión	72	1 minuto	
Extensión final	72	11 minutos	1

Posteriormente, para observar el producto amplificado se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa, se preparó un gel de 12cmx12cm al 2% de agarosa disuelta en TBE 1X y bromuro de etidio, se cargaron las muestras en los respectivos pocillos tomando 4µl de ADN y 4µl de buffer de carga Sal B, para tener una referencia del tamaño del producto amplificado se corrió un *ladder* de 50pb y la corrida electroforética tuvo como duración 30minutos a 100V. Finalmente, se tomó una foto. Estas fotos se toman en un aparato llamado fotodocumentador.

### **3.2.4 SECUENCIAMIENTO DEL SEGMENTO DE LA RC EN EL ADN<sub>mt</sub>**

Los productos de la PCR se enviaron a la empresa MACROGEN en Corea. Cada muestra se envió en un volumen de 20µl para su purificación y posterior secuenciamiento, también se enviaron los cebadores a concentración de 5 µM. Los cebadores utilizados en el secuenciamiento fueron los mismos que se utilizaron en la amplificación. La secuenciación se realizó en ambos sentidos y se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI 3730XL de marca Applied Biosystems.

### **3.3 FASE DE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

#### **3.3.1 EDICIÓN DE SECUENCIAS**

Para cada individuo se obtuvo como resultado dos electroferogramas uno de la secuencia de ADN de 5' a 3' y el otro correspondiente a la secuencia complementaria de 3' a 5'. Con la finalidad de corregir posibles errores de secuenciamiento, todas las secuencias fueron analizadas y cotejadas con su respectivo electroferograma, así como con su homólogo (formato .ab1) utilizando el programa SeqScape v2.7 de Applied Biosystem. Finalmente, para el ensamblaje de las secuencias se usó como referencia la secuencia completa de la mitocondria de llama (accesión AP003426 del GenBank) creándose una secuencia consenso y se guardó en formato FASTA.

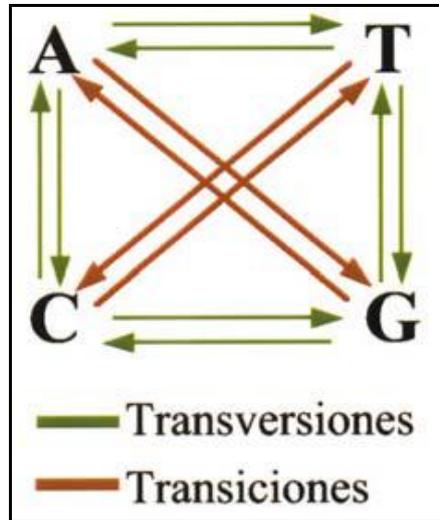
#### **3.3.2 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS**

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron sometidas a búsquedas en la base de datos genómicos del NCBI, mediante la herramienta BLASTn del NCBI que sirve para identificar similitudes entre nucleótidos basándose en secuencias nucleotídicas de genomas biológicos. Se compararon las secuencias consenso obtenidas con el objetivo de identificar posibles homologías que permitiesen verificar su similaridad con secuencias de la región control de otros camélidos almacenadas en el GenBank.

Mediante el programa Damb5, se calcularon la composición nucleotídica promedio de las 18 secuencias obtenidas, la tasa de transiciones y transversiones y la saturación de nucleótidos graficando la frecuencia de transiciones y transversiones contra los valores de distancia genética. Este análisis sirve de manera indirecta para cuantificar el nivel de saturación de las transiciones o transversiones, respectivamente.

La saturación es un fenómeno que afecta a las secuencias de ADN debido al limitado número de estados posibles de los caracteres moleculares (A, T, C, G). Esta se produce cuando una misma posición nucleotídica ha cambiado más de una vez desde que las dos secuencias se separaron de su ancestro común. Los cambios entre nucleótidos de similar naturaleza química, es decir, entre purinas (A y G) o pirimidinas (C y T) reciben el nombre de transiciones, mientras que los cambios entre nucleótidos de diferente

naturaleza química (entre purinas y pirimidinas) reciben el nombre de transversiones. Nótese en la figura 6 que el número de transversiones posibles es el doble que el número de transiciones.



**Figura 6: Tipos de transiciones y transversiones.**

Después se realizó un alineamiento múltiple de secuencias mediante el programa UGENE con el propósito de determinar los sitios conservados, sitios variables, sitios informativos y singletons y las secuencias se visualizaron con el mismo programa.

### 3.3.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

La variabilidad genética fue estimada a través del cálculo de los valores de número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), número de posiciones polimórficas (S), número medio de diferencias nucleotídicas (k) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) mediante el programa por DnaSPv5.10 (Librado y Rozas, 2009).

La diversidad haplotípica (Hd) se calcula por la siguiente ecuación:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^h p_i^2 \right)$$

Donde:

n= Número de secuencias

h= Número de haplotipos diferentes

pi= Frecuencia del haplotipo i

El número medio de diferencias nucleotídicas (k) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$k = \sum_{i=1; i < j}^n \frac{k_{ij}}{\binom{n}{2}}$$

Donde:

K<sub>ij</sub> = Número de diferencias entre la secuencia i y la secuencia j

La diversidad nucleotídica (π) se calcula por la siguiente ecuación:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i < j}^n x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde:

x<sub>i</sub> = Frecuencia de la secuencia i

x<sub>j</sub> = Frecuencia de la secuencia j

π<sub>ij</sub>= Proporción de diferencias entre i y j

### 3.3.4 RED DE HAPLOTIPOS

Para representar mediante árboles no enraizados las relaciones entre haplotipos o red de haplotipos, se utilizó el programa PopART v4.201. (Leigh *et al.*, 2015). Este programa utiliza el algoritmo *median joining* (Bandelt *et al.*, 1999) mediante el cual a partir de

datos genéticos con libre recombinación, se combinan las características del algoritmo de Kruskal (1956) para hallar el *minimum spanning tree* para un set de secuencias, el cual conecta todos los tipos de nodos sin crear algún ciclo o inferir adicionales nodos (ancestros), de tal forma que la longitud total sea la mínima.

Se utilizaron los haplotipos obtenidos en la EEASA, y también se adicionaron los haplotipos identificados en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata (CIPQ) del INIA en Puno obtenidos por Mestanza (2014) y se agregaron las secuencias de *Lama glama* de Díaz *et al.* (2014), cuyo artículo científico aún se encuentra sin publicar. Las secuencias fueron recuperadas del GenBank. En el estudio de Díaz *et al.* (2014), se secuenció la región control de 53 individuos de *Lama glama* provenientes de Perú y Ecuador; sin embargo, las accesiones no precisan las localidades. Las accesiones de estas secuencias son: KJ670317, KJ670319, KJ670323, KJ670324, KJ670326, KJ670327, KJ670336, KJ670337, KJ670338, KJ670341, KJ670343, KJ670344, KJ670345, KJ670349, KJ670354, KJ670355 y KJ670361.

Con el nuevo conjunto de secuencias se construyó una lista de haplotipos en el programa DnaSP v5.10 (Librado y Rozas, 2009) y se realizó un diagrama de Venn con los todos haplotipos mediante la herramienta en línea alojada en [http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate\\_venn.html](http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html)

La desviación de la variabilidad esperada bajo condiciones de neutralidad y estabilidad demográfica se evaluó mediante los estadísticos D de Tajima (1989) y Fs de Fu (1997) con el uso del programa DnaSPv5.10. La prueba de Tajima (1989) está basada en la diferencia entre el número de posiciones polimórficas (S) y el número medio de diferencias nucleotídicas (k) en una secuencia genómica. La variabilidad nucleotídica esperada bajo condiciones de neutralismo viene dada por la ecuación (Nei, 1987; Tajima, 1993):

$$\theta = 4N_{\mu}$$

N= Tamaño de la población

$\mu$ = Número de mutaciones por secuencia y por generación

A su vez, la estimación del polimorfismo de acuerdo con el neutralismo viene dada por el simulador de Watterson (1975):

$$\theta_s = \frac{S}{a_1}$$

S= Número de posiciones polimórficas o segregantes

$a_1$ = Parámetro, que depende del nº de secuencias (i), se define como:

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

Si la distribución de la variación es neutra:

$$S \approx k$$

Y por tanto la hipótesis nula será:

$$\theta_s = k$$

Si la distribución de la variación se desvía de la esperada en un modelo neutro:

$$\theta_s \neq k \text{ y } k \neq \frac{S}{a_1}$$

Por lo tanto, la medida de la desviación de la neutralidad sería:

$$d = k - \frac{S}{a_1}$$

$d = 0$ , variación neutra

$d \neq 0$ , variación NO neutra

El estadístico de Tajima D, determina la significación estadística de  $d$ . Cuando el valor de D es significativo, puede deberse a dos posibilidades:

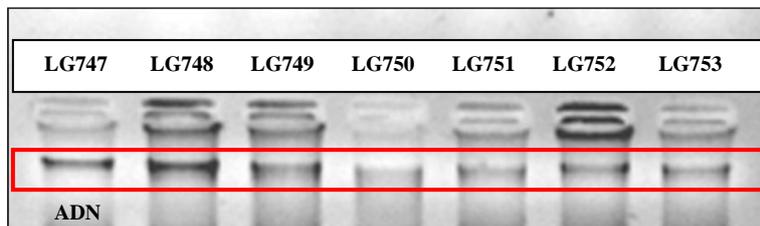
- D negativo; existe un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, es decir, los polimorfismos son únicos.
- D positivo; existe un exceso de polimorfismos a frecuencia intermedia.

La prueba  $F_s$  se basa en la distribución de la frecuencia haplotípica condicionada por el valor de  $\theta$  (Ewens, 1972), considerándosele un estadístico muy sensible al crecimiento poblacional.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO EXTRAÍDO

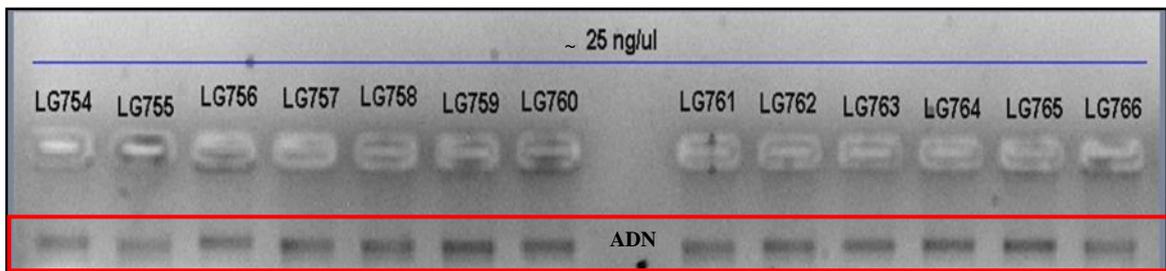
El protocolo modificado y estandarizado por el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de INIA, a partir del protocolo de extracción fenol-cloroformo de Sambrook *et al.* (2001), proporcionó resultados aceptables en cuanto a calidad y cantidad. Se tuvo éxito en extraer ADN a partir del folículo piloso de las 20 muestras. La evaluación de la calidad se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y se aprecia en la Figura 7.



**Figura 7: Electroforesis mostrando la calidad del ADN genómico extraído a partir de folículos pilosos de 7 llamas.**

En lo referente a la cuantificación del ADN extraído, en el ANEXO 2 se aprecian los valores de las concentraciones de ADN en ng/ $\mu$ l y los valores de pureza (relación A260/A280) para los 20 ejemplares de llamas de la EEASA. Los valores de concentración varían desde 167.583 hasta 778.55 ng/ $\mu$ l y la pureza varía desde 1.753 hasta 2.026. Debido a la alta concentración de ADN, se procedió a hacer diluciones como se explica en el capítulo de Materiales y Métodos hasta alcanzar una concentración de  $\sim$ 25 ng/ $\mu$ l. Del mismo modo, la calidad de las diluciones fue evaluada mediante gel de agarosa al 0.6%, la cual se aprecia en la Figura 8 y la cuantificación del

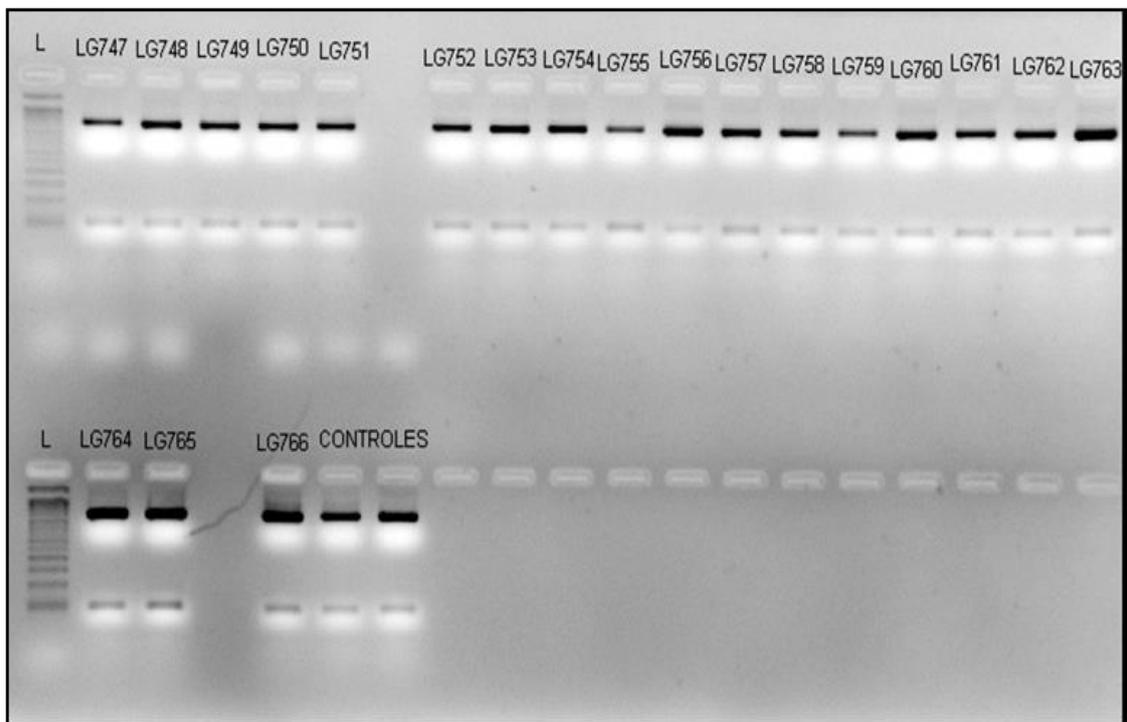
ADN genómico diluido se aprecia en el ANEXO 4, se logró obtener la concentración de ~25 ng/μl en todos los ejemplares.



**Figura 8: Electroforesis mostrando la calidad del ADN genómico diluido.**

#### 4.2 AMPLIFICACIÓN DEL SEGMENTO DE LA RC EN EL ADN<sub>mt</sub>

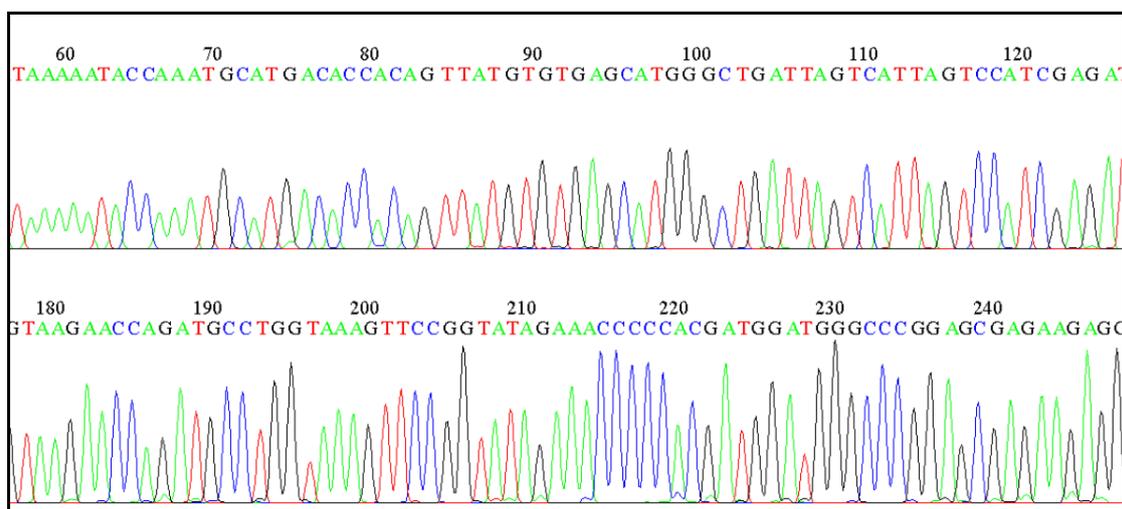
La foto de la corrida electroforética en gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR se muestra en la Figura 9. Se aprecia el ADN amplificado de los 20 ejemplares, 2 bandas de marcadores de corrida y 2 controles positivos.



**Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 2 % mostrando marcador (L), productos de la PCR de los individuos LG747-LG766 provenientes de la EEASA y dos controles positivos.**

### 4.3 SECUENCIAMIENTO DEL SEGMENTO DE LA RC EN EL ADNmt

De las 40 reacciones de secuenciación, dos por cada individuo, se logró conseguir 36 secuencias de *Lama glama* provenientes de 18 llamas de la Estación Experimental Santa Ana. Las secuencias mostraron en su mayoría una correcta lectura como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10: Segmento del electroferograma obtenido luego de la secuenciación del segmento de la RC.**

### 4.4 ANÁLISIS Y DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL SEGMENTO DE LA RC EN EL ADNmt

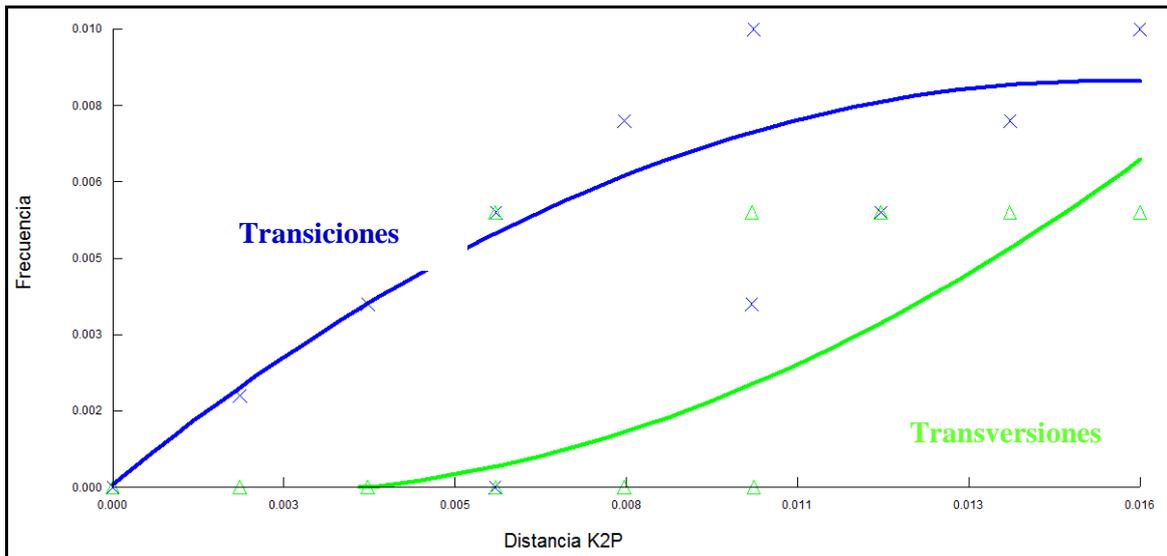
En la tabla 5, a partir del resultado del BLASTn se aprecia que las secuencias obtenidas de *Lama glama* del presente estudio fueron idénticas a especies *Vicugna pacos*, *Lama guanicoe* y *Lama glama*. Asimismo, los porcentajes de identidad varían entre 99-100%.

**Tabla 5: Resultados de comparar las secuencias de los individuos provenientes de la EEASA con todas las secuencias presentes en el Genbank, se presenta la mayor similitud nucleotídica encontrada para cada individuo.**

Individuo	Mejor acierto en BLASTn	Gen comparado	Accesión	Identidad	Autor y año de Publicación
EEASA_747	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_748	<i>Lama guanicoe huanacus</i>	Región control	AY856199.1	99%	Marin, J.C. 2008
EEASA_749	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	99%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_750	<i>Lama glama</i>	Región control	AY856136.1	99%	Marin,J.C., Spotorno,A.O. y Wheeler,J.C. 2005
EEASA_751	<i>Lama glama</i>	Región control	AY856138.1	100%	Marin,J.C., Spotorno,A.O. y Wheeler,J.C. 2005
EEASA_752	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_753	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_754	<i>Lama glama</i>	Región control	AY856138.1	99%	Marin,J.C., Spotorno,A.O. y Wheeler,J.C. 2005
EEASA_756	<i>Lama guanicoe huanacus</i>	Región control	AY856199.1	99%	Marin,J.C. 2008
EEASA_757	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_758	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.2	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2008
EEASA_759	<i>Lama glama</i>	Región control	AY856136.1	100%	Marin,J.C., Spotorno,A.O. y Wheeler,J.C. 2005
EEASA_760	<i>Lama guanicoe huanacus</i>	Región control	AY856199.1	99%	Marin,J.C. 2008
EEASA_761	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_762	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2007
EEASA_764	<i>Vicugna pacos</i>	D-loop	EU285663.1	100%	Gao,L., Zhao,Y. y Dong,C. 2008
EEASA_765	<i>Lama glama</i>	Región control	AY856136.1	100%	Marin,J.C., Spotorno,A.O. y Wheeler,J.C. 2005
EEASA_766	<i>Lama glama</i>	Región control	AY856136.1	99%	Marin,J.C., Spotorno,A.O. y Wheeler,J.C. 2005

Según el estudio de Wheeler (2012), el 40% de llamas y el 80% de alpacas que fueron analizadas resultaron ser híbridos que se habrían generado a partir del cruce de las cuatro especies de camélidos sudamericanos. Por otro lado, Barreta *et al.*, (2012) encontraron niveles significativos de hibridación en el análisis de ADNmt de camélidos sudamericanos domésticos. Por lo que los resultados obtenidos concuerdan con la extensa hibridación reportada en estudios anteriores entre las especies domésticas de CAS. Además, se sabe que cruces entre alpacas macho y llamas hembra son comúnmente conocidos como “huarizos” y han sido usados para incrementar la población de animales que producen fibra de alpaca de alto precio. Mientras que cruces entre llamas macho y alpacas hembra conocidos como “misti” han sido usados para obtener para obtener mayores pesos de vellón y así aumentar los ingresos (Stanley *et al.*, 1994; Kadwell *et al.*, 2001). No obstante, en ningún estudio previo el parentesco entre la llama y el guanaco ha sido cuestionado.

Los resultados para las secuencias obtenidas del segmento parcial de la Región Control arrojaron que tienen 513-514 nucleótidos. La composición nucleotídica promedio de las 18 secuencias analizadas fue de 28.2% (A), 26.6%(C), 17.7% (G) y 27.6% (T), siendo el porcentaje de AT ( $\approx 56\%$ ) mayor que GC ( $\approx 44\%$ ). Sbisà *et al.*, (1997) reportan como patrón general de ADNmt de la región control de mamíferos  $(A+T) > (C+G)$ , lo cual concuerda con los resultados obtenidos. Además, Marín *et al.*, (2008) reportan para la región control parcial (513pb) en guanacos un promedio de composición nucleotídica de 28.0% (A) , 26.5%(C), 17.9% (G) y 27.6% (T), lo cual es muy similar a lo encontrado para las composiciones promedio de adenina, citosina y guanina e igual para la composición promedio y timina.



**Figura 11: Gráfica de transiciones y transversiones para el segmento de la RC de los individuos de *Lama glama* comparadas contra la distancia corregida Kimura 2 parámetros (K80).**

Según se aprecia en la figura 11, el número de transiciones (s) es más frecuente que el de las transversiones (v) lo cual muestra que no hay saturación en las mutaciones. Sin embargo, se ve una tendencia en incremento de las transversiones. Además, se aprecia que las distancias entre pares de secuencias son pequeñas.

Se obtuvo una tasa de s/v de 2.68, lo que indica que por cada transversión encontramos 2.68 transiciones, dicha tasa se encuentra en el rango de lo encontrado por Di Rocco *et al.*, (2010) para guanacos (tasa s/v de 2.5-7 en la región control). Sin embargo, Marín *et al.*, (2007a) en secuencias del gen para citocromo b en el ADNmt reportan para camélidos del Nuevo Mundo la relación de s/v de 9.27 y en guanacos una relación promedio de s/v de 7.18.

## 4.5 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

El alineamiento múltiple de las secuencias de la región control parcial resultó en 514 sitios alineados. Se observó un “indel” (inserción/delección) en la posición 22 del alineamiento. Se encontraron 502 sitios conservados, 11 sitios polimórficos, 5 sitios informativos y 6 singletons.

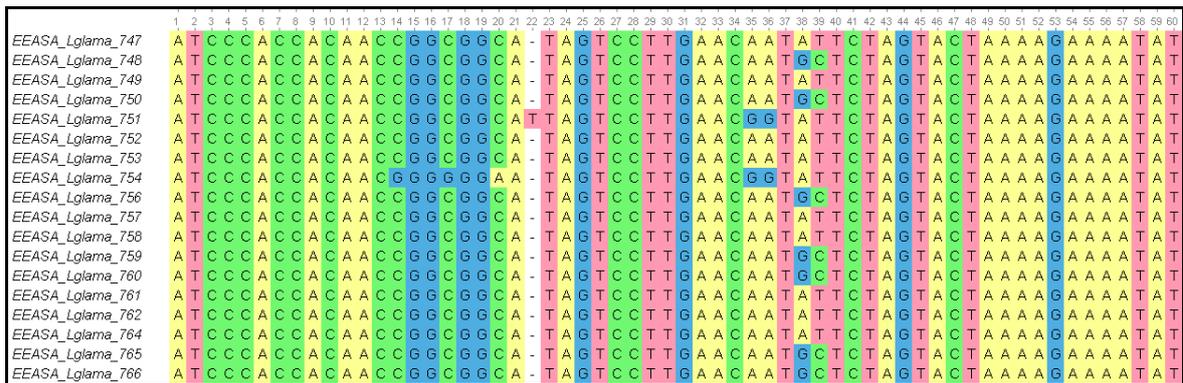


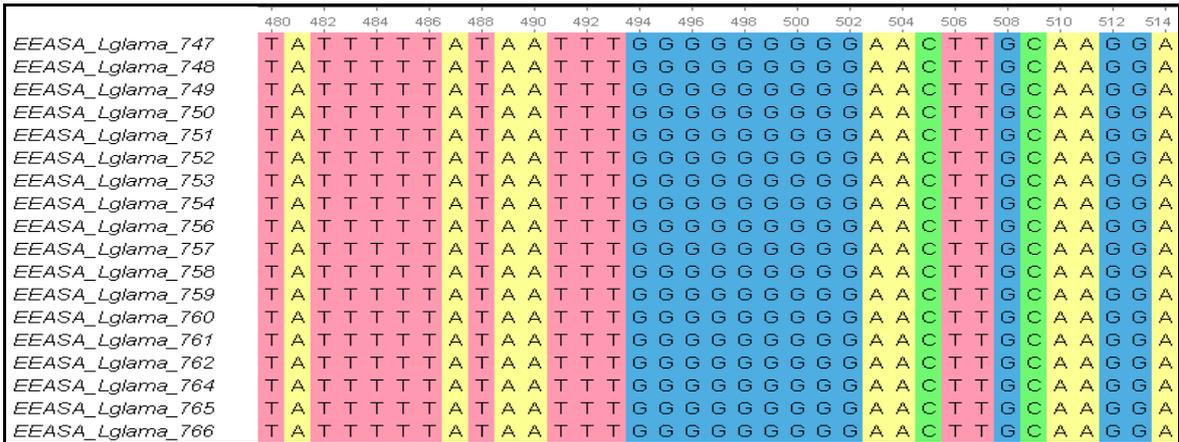
Figura 12: Alineamiento posiciones 1-60.

Se observa el indel en la posición 22 que es generado por el individuo LG 751. En la posición 35, 36, 38 y 39 se muestran los sitios informativos.









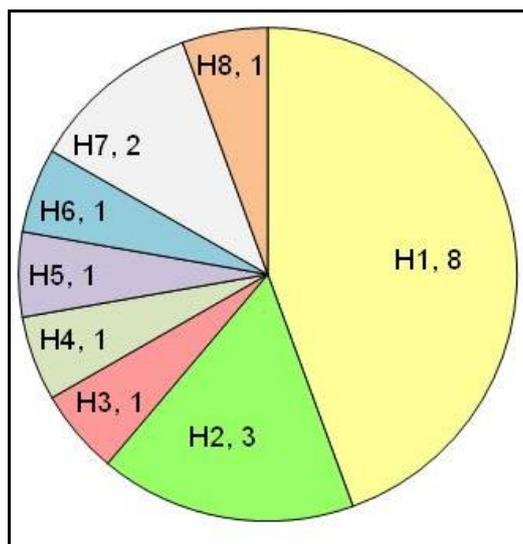
**Figura 20: Alineamiento posiciones 480-514.**

Se observan regiones conservadas.

**Tabla 6: Lista de individuos de Lama glama indicando el haplotipo encontrado y las posiciones variables en el segmento de la RC.**

Individuo	Haplotipo	Posiciones Variables										
		14	17	20	35	36	38	39	67	212	219	271
EEASA_Lglama_747	H1	C	C	C	A	A	A	T	T	C	T	T
EEASA_Lglama_748	H2	.	.	.	.	.	G	C	.	T	.	.
EEASA_Lglama_749	H3	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
EEASA_Lglama_750	H4	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	C
EEASA_Lglama_751	H5	.	.	.	G	G	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_752	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_753	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_754	H6	G	G	A	G	G	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_756	H2	.	.	.	.	.	G	C	.	T	.	.
EEASA_Lglama_757	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_758	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_759	H7	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	.
EEASA_Lglama_760	H2	.	.	.	.	.	G	C	.	T	.	.
EEASA_Lglama_761	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_762	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_764	H1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
EEASA_Lglama_765	H7	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	.
EEASA_Lglama_766	H8	.	.	.	.	.	G	C	.	.	C	.

T = timina, A = adenina, G = guanina, C = citosina, · = nucleótido similar.



**Figura 21: Número de individuos por haplotipo encontrado.**

Mestanza (2014) reporta, a partir de 282 secuencias de llamas analizadas, 38 mutaciones, 37 sitios polimórficos con 35 sitios informativos y 1 singleton. Barreta *et al.*, (2012) reportan a partir de 109 llamas bolivianas analizadas, 30 sitios polimórficos y 3 singletons. Además, en 176 guanacos se encontraron 38 sitios polimórficos de los cuales solo 8 eran sitios informativos de parsimonia, y en 261 vicuñas se encontraron un total de 28 sitios polimórficos (Marín *et al.*, 2007b; Marín *et al.*, 2008). Según lo observado, la diferencia en el número de sitios polimórficos encontrados podría deberse al número de individuos analizados, en todo caso las llamas de la EEASA tienen menor variación nucleotídica que las reportadas en estudios anteriores.

En el presente trabajo se observa la inserción de una timina en la posición 22 en la llama LG 751 (Figura 12). Al respecto cabe mencionar que Marín *et al.*, (2007a) también detectaron la inserción de una timina a 22 nucleótidos al inicio de la región control en algunos guanacos y llamas. Estos guanacos y llamas provenían del norte de Chile y sus secuencias de dominio hipervariable I de la región control fueron analizadas considerando un fragmento de 328pb. En el estudio desarrollado se planteó que dicho polimorfismo apoyaría la existencia de más de un centro de domesticación de la llama, y se proponía al norte de Chile como uno de ellos; asimismo, se resalta la importancia de estudiar un mayor número de llamas para determinar la prevalencia de la mencionada mutación en los planteles tanto de Perú, Argentina, Chile y Bolivia.

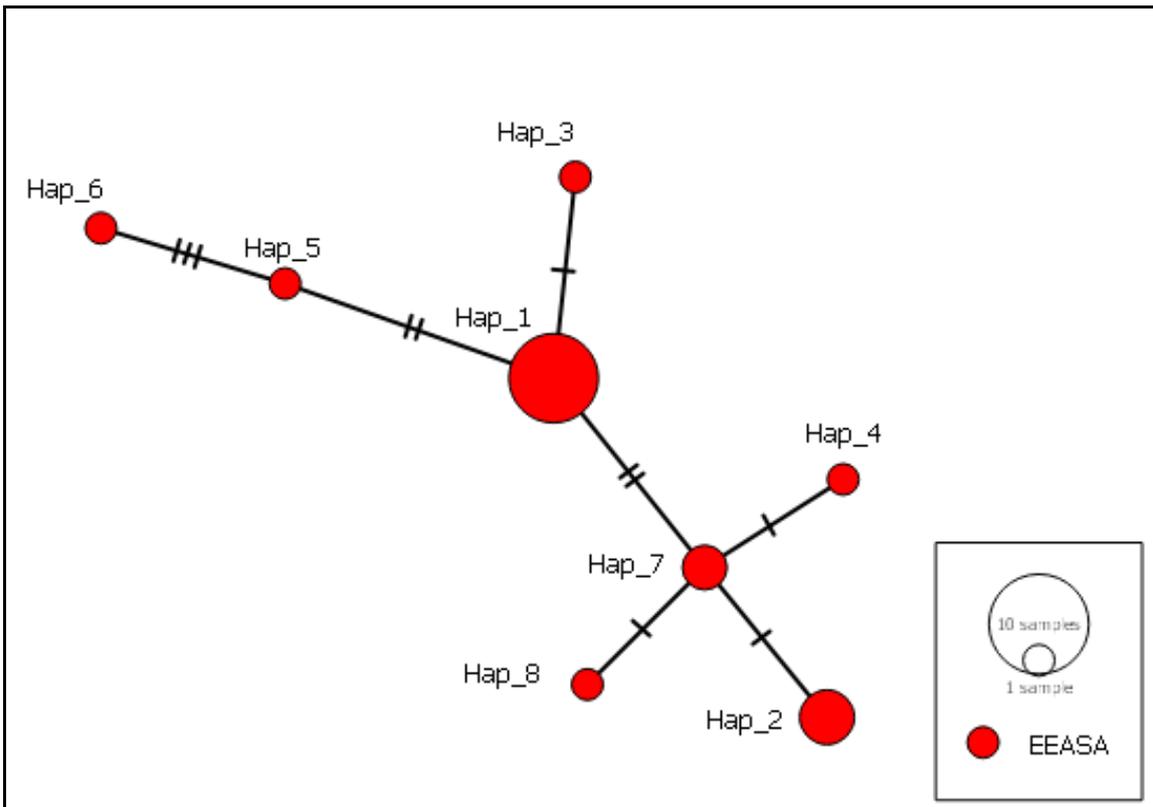
#### **4.6 MEDIDAS DE VARIABILIDAD**

Las secuencias obtenidas se agruparon en 8 haplotipos (h). La diversidad haplotípica ( $H_d$ ) es de 0,791. La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es de 0,00465 lo que indica que las diferencias entre las secuencias son muy pocas. Se obtuvo 2,38 como promedio de diferencia nucleotídica (k). El haplotipo con mayor frecuencia es el número H1 (8 individuos) seguido de H2 (3 individuos) y H7 (2 individuos); el resto solo presenta un individuo por haplotipo (Figura 21).

En el estudio de la diversidad genética en ADNmt de 109 llamas provenientes de 13 localidades diferentes de los andes bolivianos se encontraron 33 haplotipos, una diversidad haplotípica ( $H_d$ ) de 0,9380 y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,0117 (Barreta *et al.*, 2012). Marín *et al.*, (2007b) reportan 77 haplotipos, dentro de ellos 6 haplotipos pertenecientes a llamas. Mestanza (2014) reporta 29 haplotipos a partir de 282 secuencias de llamas analizadas. En el presente estudio a partir de 18 secuencias de llamas se han determinado 8 haplotipos. Por lo que estos 8 haplotipos darían indicio de una considerable diversidad.

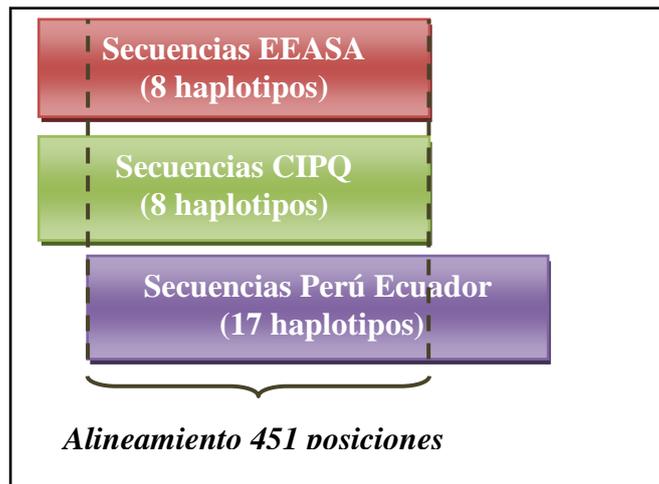
#### **4.7 RED DE HAPLOTIPOS**

Se obtuvo la red de haplotipos mostrada en la figura 22. Los números en las líneas de enlace representan las posiciones de los sitios informativos del alineamiento; no se observa una topología definida debido a los pocos sitios variables. Se podría hablar de dos haplogrupos siendo el primero constituido por H7, H8, H4 y H2, mientras que el segundo por H1, H3, H5 y H6.



**Figura 22: Red de haplotipos para *Lama glama* de la EEASA basada en el segmento de la RC.**

Luego se decidió complementar el estudio con datos de las secuencias de Mestanza (2014) y Díaz *et al.*, (2014) obteniéndose 8 y 17 haplotipos, respectivamente. El alineamiento múltiple mediante el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) implementado en UGENE (Okonechnikov, 2012) resultó en un alineamiento de 451 posiciones de las cuales 425 son sitios conservados, 24 sitios polimórficos, 7 sitios informativos y 17 singletons. El alineamiento es menor al obtenido para solamente las secuencias de EEASA ya que las 63 posiciones iniciales no tienen un símil a las secuencias de Díaz *et al.*, (2014) como se muestra en la figura 23.



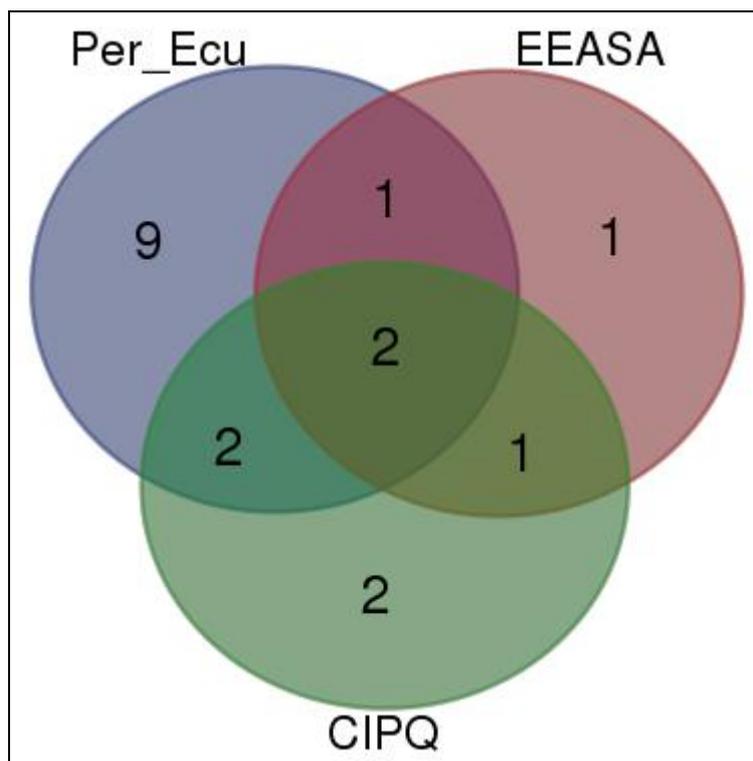
**Figura 23: Esquema alineamiento múltiple realizado con las secuencias generadas en esta investigación en la EEASA, en Mestanza (2014) del CIPQ y en Díaz (2014) de localidades de Perú y Ecuador.**

Con este nuevo conjunto de secuencias se obtuvo una nueva lista de haplotipos en el programa DnaSP v5.10 (Librado y Rozas, 2009). Se debe tener en cuenta que son menos los haplotipos generados para EEASA ya que se han recortado las primeras 63 posiciones del alineamiento para EEASA y CIPQ. Se encontraron 18 haplotipos como se indica:

- Hap\_1: 7 [EEASA\_H1, EEASA\_H5, EEASA\_H6, EEASA\_H7, CIPQ\_H4, CIPQ\_H8, Per\_Ecu\_H1]
- Hap\_2: 1 [EEASA\_H2]
- Hap\_3: 2 [EEASA\_H3, CIPQ\_H7]
- Hap\_4: 5 [EEASA\_H4, CIPQ\_H3, Per\_Ecu\_H3, Per\_Ecu\_H16, Per\_Ecu\_H17]
- Hap\_5: 3 [EEASA\_H8, Per\_Ecu\_H2, Per\_Ecu\_H9]
- Hap\_6: 2 [CIPQ\_H1, Per\_Ecu\_H8]
- Hap\_7: 1 [CIPQ\_H2]
- Hap\_8: 2 [CIPQ\_H5, Per\_Ecu\_H15]
- Hap\_9: 1 [CIPQ\_H6]
- Hap\_10: 1 [Per\_Ecu\_H4]
- Hap\_11: 1 [Per\_Ecu\_H5]
- Hap\_12: 1 [Per\_Ecu\_H6]
- Hap\_13: 1 [Per\_Ecu\_H7]

Hap\_14: 1 [Per\_Ecu\_H10]  
 Hap\_15: 1 [Per\_Ecu\_H11]  
 Hap\_16: 1 [Per\_Ecu\_H12]  
 Hap\_17: 1 [Per\_Ecu\_H13]  
 Hap\_18: 1 [Per\_Ecu\_H14]

A partir del diagrama de Venn y como se detalla en la tabla 7, se observó que 2 haplotipos (Hap\_1 y Hap\_4) son compartidos por ambas estaciones del INIA y las localidades de Perú y Ecuador. Para la estación EEASA se encontró un haplotipo privado (Hap\_2). Mientras que para el CIPQ se encontraron 2 haplotipos privados (Hap\_7 y Hap\_9). Para las otras localidades de Perú y Ecuador se encontraron 9 haplotipos privados (Hap\_10 Hap\_15 Hap\_12 Hap\_16 Hap\_17 Hap\_13 Hap\_18 Hap\_11 Hap\_14). Las demás interacciones se detallan en la figura 24.

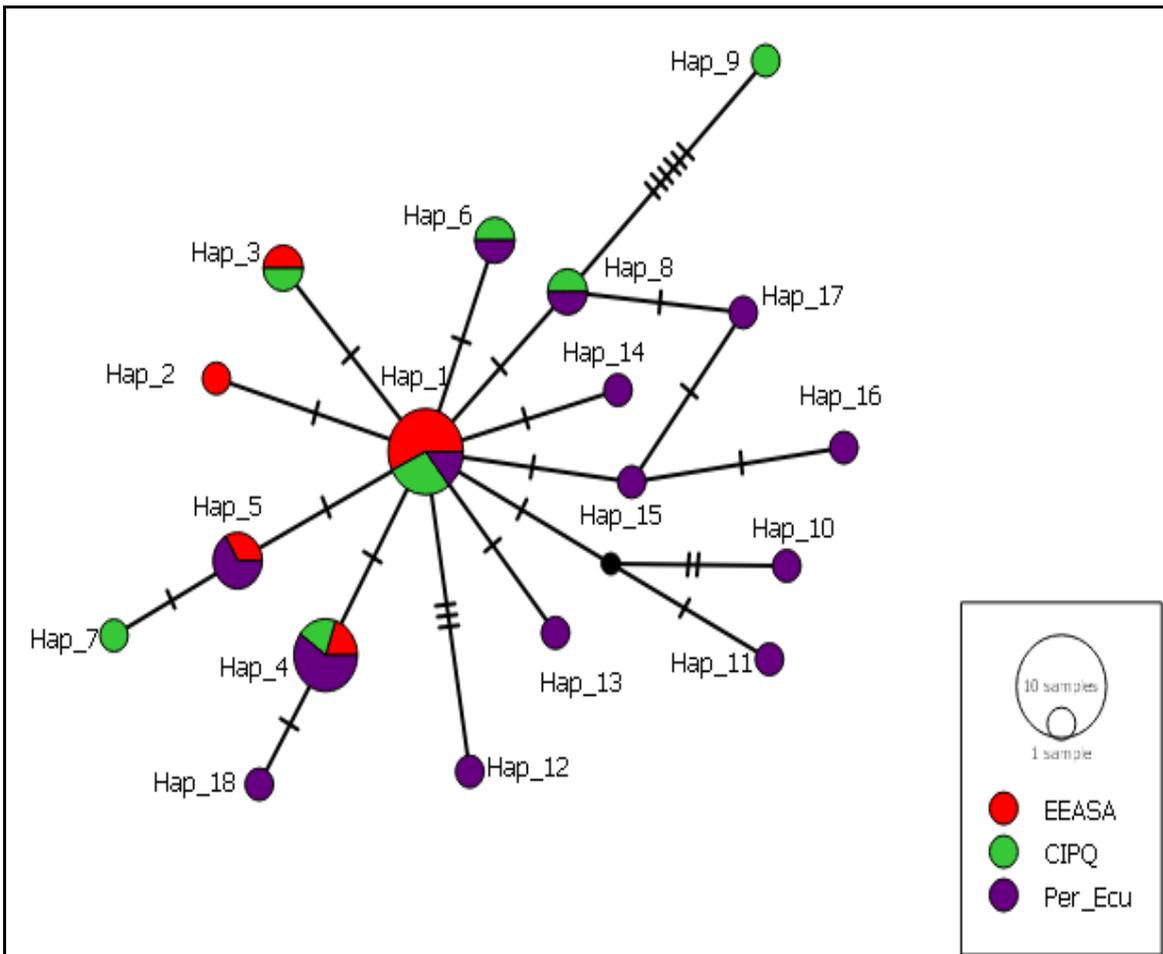


**Figura 24: Diagrama de Venn de los haplotipos presentes en EEASA, CIPQ y localidades de Perú y Ecuador.**

**Tabla 7: Lista de haplotipos para EEASA, CIPQ y localidades de Perú y Ecuador.**

<b>Interacción</b>	<b>Número de Haplotipos</b>	<b>Haplotipos</b>
CIPQ – EEASA- Per_Ecu	2	Hap_1 Hap_4
EEASA - Per_Ecu	1	Hap_5
CIPQ - Per_Ecu	2	Hap_8 Hap_6
CIPQ - EEASA	1	Hap_3
Per_Ecu	9	Hap_10 Hap_15 Hap_12 Hap_16 Hap_17 Hap_13 Hap_18 Hap_11 Hap_14
EEASA	1	Hap_2
CIPQ	2	Hap_7 Hap_9

La red de haplotipos generada muestra una topología en estrella. Siendo el Hap\_1 el central con 7 muestras. La topología presentada anteriormente es parcialmente sostenida por esta red debido al recorte de 64 sitios en donde se encontraban 6 de 11 sitios variables. Igualmente se nota que el haplotipo Hap\_2 forma un grupo único, lo cual es reforzado por el hecho de haberlo encontrado como haplotipo privado para la EEASA.



**Figura 25: Red de haplotipos para EEASA, CIPQ y localidades de Perú y Ecuador.**

Los haplotipos que no fueron delimitados en la Figura 25 tienen pocas mutaciones que los separan del Hap\_1.

El haplotipo EEASA\_H2 fue encontrado como un haplotipo privado para EEASA.

Para fines de conservación el haplotipo EEASA\_H2 tiene relevancia pues únicamente fue encontrado en la EEASA, lo que revalorará la importancia de conservación de individuos de *Lama glama* en esta estación. Así mismo los haplotipos EEASA\_H3 y CIPQ\_H7 son solamente conservados en las estaciones del INIA resaltando de igual manera la importancia el mantenimiento de un plantel genético particular que no se encuentra en otras localidades.

#### **4.8 PRUEBA D Y $F_s$**

Se obtuvo como resultado de la prueba D de Tajima el valor de -0.92734 y el  $F_s$  de Fu fue de -1.878. Estos valores no alcanzaron significancia estadística ( $p > 0.10$ ).

Sin embargo valores negativos para la prueba D indican que existe un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, es decir, los polimorfismos son únicos. Esta disminución de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) podría deberse a una selección positiva o a la causa de efectos demográficos como un cuello de botella, en donde disminuye de manera muy drástica el valor de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) e incrementa el número de polimorfismos de baja frecuencia.

## V. CONCLUSIONES

- Se determinó la variabilidad genética, encontrándose 8 haplotipos los cuales representan una diversidad haplotípica moderada mientras que el hecho de encontrar pocos sitios informativos reflejó una diversidad nucleotídica baja.
- En la Estación Experimental Agraria Santa Ana se conservan dos haplotipos que no se encuentran presentes en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata del INIA en Puno, asimismo el Haplotipo 2 solamente se encuentra en la EEASA por lo que se resalta el valor de la EEASA como reservorio genético único.
- Se pone evidencia el posible cruzamiento entre camélidos sudamericanos puesto que las secuencias analizadas de 9 individuos de *Lama glama* fueron idénticas en un 99% (1 individuo) y en 100% (8 individuos) a las secuencias de especies de *Vicugna pacos*.
- La herramienta molecular utilizada demostró ser reproducible, económica y rápida para poder apoyar la toma de decisiones en lo que refiere al ganado.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización morfológica y productiva en las llamas en estudio, para complementar los datos obtenidos (datos morfométricos de producción de fibra, carne, etc.), también un análisis de ADN nuclear (microsatélites) incrementaría la resolución de la variabilidad genética en las llamas del presente estudio.
- Con el fin de incrementar nuestro conocimiento referente a la variabilidad genética de las llamas de la sierra central y compararlas con otras poblaciones, se recomienda que las futuras investigaciones se enfoquen en poblaciones de mayor tamaño que en lo posible incluyan grupos geográficos.
- El progreso en estudios de variabilidad genética de otras poblaciones de llamas resulta necesario para identificar diferentes reservorios genéticos de los cuales extraer reproductores que puedan mejorar el estado reproductivo de otras poblaciones. Por lo que sería de gran utilidad realizar estudios de segregación familiar de marcadores de ADN microsatélite asociados a caracteres de interés económico como: calidad de fibra, color de capa, aptitud reproductiva, etc. y aplicarlos a la obtención de mapas genéticos que en el futuro permitan realizar mejoramiento genético más rápido y eficiente asistido por marcadores moleculares.
- Se sugiere estudiar un mayor número de llamas peruanas con la finalidad de determinar la prevalencia del indel en la posición 22.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; y SAUNDERS, S.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18. 489-522.
2. BALLARD, J.W. Y KREITMAN, M. (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Tree*, 10. 485-488.
3. BANDELT, H.; FORSTER, P. y RÖHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
4. BARRETA, J. (2012a). Estudio de la variabilidad genética en camélidos bolivianos. Tesis para optar el grado de médico veterinario, León, Bolivia, Universidad de León, Facultad de veterinaria. 165p
5. BARRETA, J.; GUTIERREZ-GIL, B.; IÑIGUEZ, V.; SAAVEDRA, V.; CHIRI, R.; LATORRE, E. y ARRANZ, J. (2012). Analysis of mitochondrial DNA in Bolivian llama, alpaca and vicuna populations: a contribution to the phylogeny of the South American Camelids. *Animal Genetics*. 44.158-168.
6. BARROS, V. (1997). Análisis y evaluación de la producción de llamas en la Provincia de Tayacaja-Huancavelica. Tesis para optar el grado de Ingeniero Zootecnista, Cerro de Pasco, Perú, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Facultad de Zootecnia. 80p

7. BROWN, W.M.; George, M. Jr. y Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 76.1967-1971.
8. BRUFORD, M.; BRADLEY, D. y LUIKART, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. Genet. 4. 900-910.
9. BUSTAMANTE, A.; MATE, M.; LAMAS, H.; GIOVAMBATTISTA, G.; ZAMBELLI, A. y VIDAL-RIOJA, L. (2006). Análisis de diversidad genética en tres poblaciones de llamas (*Lama glama*) del noroeste argentino. Revista Chilena de Historia Natural. 79.175-184.
10. CAMPERO, J. (2005a). Camelids in South America. Lama (*Lama pacos*) production systems in Bolivia. Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios. La Paz, Bolivia. En Current Status of Genetic Resources, Recording and Production Systems in African, Asian and American Camelids. ICAR Technical Series No. 11
11. CANO, Z.; ROSADIO, R.; MATURRANO, L.; DÀVALOS, R. Y WHEELER, J.C. (2012). Caracterización fenotípica y análisis de ADNmt de llamas de Marcapomacocha, Perú. Revista de investigaciones Veterinarias del Perú. 23(3).338-398.
12. CAVELIER, L.; JOHANNISSON, A. y GYLLENSTEN, U. (2000). Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. Experimental Cell Research, 259. 79-85.
13. CORTEZ, G.; GONZALES, V.; GUZMÁN, F. y COPA, S. (2006). Determinación de Estándares zoométricos para la evaluación genética de Llamas Q'ara en el Departamento de Oruro, Bolivia. En Resúmenes y Trabajos del IV Congreso Mundial de Camélidos.

14. CRISTOFANELLI, S.; ANTONINI, M.; TORRES, D.; POLIDORI, P. y RENIERI, C. (2005). Carcass characteristics of Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) reared in the Andean highlands. *Small Ruminant Research*. 58.219-222.
15. DI ROCCO, F.; ZAMBELLI, A.; MATÉ, L. y VIDAL-RIOJA, L. (2010). The complete mitochondrial DNA sequence of the guanaco (*Lama guanicoe*): comparative analysis with the vicuña (*Vicugna vicugna*) genome. *Genética*. 138.813-818
16. DIAZ, C.; VIVAS, D.; VALDIVIA, M. y CHIMOY, P. (2014). Genetic diversity and hybridization of two populations of llamas (*Lama glama*) in Peru and Ecuador. Secuencias recuperadas del GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
17. EDGAR, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32.1792-1797.
18. EGEY, J. y MIRAGAYA, M. (2006). Los camélidos sudamericanos. Área de teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina; 7(2): 22.
19. EWENS, W. (1972). The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology*, 3: 87-112
20. FAO (Food and Agricultural Organization). (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. 62
21. FLORES OCHOA, J.A. (1982). Causas que originaron la actual distribución espacial de las Alpacas y Lamas. In: Millones, L. y Tomoeda, H. *El hombre y su*

- ambiente en los andes centrales. Ethological Studies. National Museum of Ethnology, Osaka. 10, 63-92.
22. Fluxus-engineering. (2015). PopART, version 4.201.  
[www.fluxusengineering.com/sharenet.htm](http://www.fluxusengineering.com/sharenet.htm)
23. FRANCO, E.; PEZO, D.; GARCÍA, W. y FRANCO F. (2009). Manual de juzgamiento de alpacas y llamas. Perú, Soluciones Prácticas.70p
24. FRANKLIN, W. (1992). Biology, ecology and relationship to man of the South American Camelids. In: Mares MA y H Genoways. The Pymatuning Symposia in Ecology, University of Pittsburgh, Linesville, Pennsylvania, USA. Mammalian biology of South America: 457-489.
25. FU, Y.X. (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics* 147: 915–925
26. GONZÁLEZ-CANDELAS y MONTOLIO, A. (2000). Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (*Leguminosae*) populations. *Journal of Heredity*. 91:134p
27. HONEY, J.G.; HARRISON J. A.; PROTHERO, D.R. Y STEVENS, M.S. (1998) in JANIS, C.M. Y SCOTT, K.M., Evolution of Tertiary Mammals of North America: Volume 1, Terrestrial Carnivores, Ungulates, and Ungulate Like Mammals Camelidae; Jacobs (eds.), Cambridge Unviversity Press, New York. 439-462.
28. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática, PE). (2012). IV Censo Nacional Agropecuario 2012.

29. IÑIGUEZ, L.; ALEM, R.; WAUER A. Y MUELLER J. (1998). Fleece types, fiber characteristics and production system of an outstanding llama population from southern Bolivia. *Small Ruminant Research*. 30:57-65.
30. IÑIGUEZ, L.C.; ALEM, R. (1996). Role of camelids as means of transportation and exchange in the Andean region of Bolivia. *World Anim Rev* 86. 12-21.
31. JOHNSON, A.A. Y JOHNSON, K.A. (2001b). Fidelity of nucleotide incorporation by human mitochondrial DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 276:38090-38096.
32. JOHNSON, A.A. Y JOHNSON, K.A.(2001a). Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 38097-38107.
33. KADWELL, M.; FERNÁNDEZ, M.; STANLEY, H.F.; BALDI, R.; WHEELER, J.C.; ROSADIO, R. y BRUFORD, M.W.(2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceeding of Royal Society of London*. 26: 2575-2584
34. KRUSKAL, J. (1956). On the shortest spanning subtree of the graph and the traveling salesman problem. *Proc. Amer. Math. Soc.* 7:48-57
35. LANSMAN, RA Y CLAYTON, DA. (1975). Selective nicking of mammalian mitochondrial DNA in vivo: photosensitization by incorporation of 5-bromodeoxyuridine. *Journal of Molecular Biology*, 99:761-776.
36. LEIGH, J. W.; BRYANT D. (2015), POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110–1116. doi: 10.1111/2041-210X.12410

37. LIBRADO, P. Y ROZAS, J. (2009). DnaSP V5.10 : A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
38. MAMANI-LINARES, W. y GALLO, C. (2011). Composición química y calidad instrumental de carne de bovino, llama (lama glama) y caballo bajo un sistema de crianza extensiva. *Rev. Inv. Vet. Perú*, vol.22, n.4
39. MAMANI-LINARES, W. y CAYO, F. (2011). Características físico-químicas del charqui de llama. *Rev. Inv. Vet. Perú*. vol.22, n.4, 290-300.
40. MAQUERA, F. (1991). Caracterización y persistencia fenotípica en llamas Karas y Lanudas del Centro experimental La Raya – Puno. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina, Escuela de postgrado especialidad de Producción Animal. 104p
41. MARÍN, J.; SPOTORNO, A.; GONZÁLEZ, B.; BONACIC, C.; WHEELER, J.; CASEY, C.; BRUFORD, M.; PALMA, E. y POULIN, E. (2008). Mitochondrial DNA variation and systematics of the guanaco (*Lama guanicoe*, Artiodactyla: Camelidae). *Journal of Mammalogy*. 89(2): 269-281.
42. MARÍN, J.; ZAPATA, B.; GONZÁLEZ, B.; BONACIC, C.; WHEELER, J.; CASEY, C.; BRUFORD, M.; PALMA, E.; POULIN, E.; ALLIENDE, A. y SPOTORNO, A. (2007). Sistemática y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural*. 80:121-140.
43. MARÍN, J.C.; CASEY, C.S.; KADWELL, M.; YAYA, K.; HOCES, D.; OLAZABAL, J.; ROSARIO, R.; RODRIGUEZ, J.; SPOTORNO, A.; BRUFORD, M.W. Y WHEELER, J.C. (2007a). Mitochondrial phylogeography and demographic history of the vicuña: Implications for conservation. *Heredity*, 99:70-80.

44. MARÍN, J.C.; ZAPATA, B.; GONZALEZ, B.A.; BONACIC, C.; WHEELER, J.C.; CASEY, C.; BRUFORD, M.W.; PALMA, R.E.; POULIN, E.; ALLIENDE, M.A.; y SPORTONO, A. (2007b). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: Nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural*. 80. 121-140.
45. MATÉ, M.; DI ROCCO, F.; ZAMBELLI, A. y VIDAL-RIOJA, L.(2004). Mitochondrial DNA structure and organization of the control region of South American Camelids. *Molecular Ecology Notes*. 4:765-767.
46. MCCOY, L.; RUTTEN, L.; FRAMPTON, D.; ANDERSON, I.; GRANGER, L.; BASHFORD-ROGERS, R.; DEKKERS, G.; STROKAPPE, N.; SEAMAN, M.; KOH, W.; GRIPPO, V.; KLICHE, A.; VERRIPS, T.; KELLAM, P.; FASSATI, A.; WEISS, R. (2014). Molecular Evolution of Broadly Neutralizing Llama Antibodies to the CD4-Binding Site of HIV-1. *PLoS Pathog* 10(12): DOI: 10.1371/journal.ppat.1004552
47. MESTANZA, O. (2014). Análisis genético poblacional en llamas, *lama glama* (Linnaeus, 1758) de la región Puno utilizando la región control del ADN mitocondrial. Tesis para optar al Título profesional de Biólogo con Mención en Zoología. UNMSM. Perú.
48. MORITZ, C.; DOWLING, T.E. Y BROWN, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DAN: Relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18:269-292.
49. MURRA, J.; WACHTEL, N. y J. REVEL. (1986). *Anthropological History of Andean Politics*. Cambridge: Cambridge University Press.
50. NEI M. Y LI W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 76. 5269-5273.

51. NEI M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
52. NOVOA, C. y WHEELER, J. (1984). Llama y alpaca. Mason IL (Ed) *Evolution of domesticated animals*. Longman, London, United Kingdom. 16-128.
53. OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. (2012). The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091
54. OYAGUE, J.; SALVA, B.; RAMOS, D.; CANALES, I.; GUTIERREZ, B. y GONZALES, A. (2010). Características de la carne de alpaca y procesamiento de charqui en los departamentos de Puno y Cusco (Perú).
55. PALMA, R. E.; MARÍN, J. C.; SPOTORNO, A. E. Y GALAZ, J. L. (2001). Phylogenetic relationships among South American subspecies of camelids based on sequences of mitochondrial genes. In *Progress in South American camelid research*, M. Gerken and C. Renieri (eds.), pp. 44–52. Proceedings of the III Symposium on South American Camelids, University of Goettingen. Germany: Wageningen Press.
56. PÉREZ, P., MAINO, M., GUZMÁN, R., VAQUERO, A., KOEBRICH, C. y POKNIAK, J. (1999). Carcass characteristics of llamas (*Lama glama*) reared in Central Chile. *Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile*.
57. PINTO, C.; MARTÍN, C. y CID, M. (2010). Camélidos sudamericanos: Clasificación, Origen, Características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(1): 23–36.

58. QUISPE, C.; RODRIGUEZ, R.; IÑIGUEZ, L.; y J. MUELLER. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*. 45:1-14.
59. REIGADAS, M. (2007). El espacio productivo en las economías pastoriles: Expectativas arqueológicas. Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales. Universidad Nacional de Jujuy. No. 32. 187-209.
60. SAMBROOK, J.; y RUSSELL, W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. SARNO, R.; FRANKLIN, W.; O'BRIEN, S. y JOHNSON, W. (2001). Patterns of mtDNA and microsatellite variation in an island and mainland populations of guanacos in southern Chile. *Animal Conservation*. 4:93-101
62. SBISÀ, E.; TANZARIELLO, F.; REYES, A.; PESOLE, G.; SACCONI, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*. 1997 Dec 31; 205(1-2):125-40.
63. SHIMADA M. y SHIMADA I. (1985). Prehistoric Llama Breeding and Herding on the North Coast of Peru. *Society for American Archaeology*. 50:3-26
64. STANLEY, H.F.; KADWELL, M. y WHEELER, J.C. (1994). Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 256: 1-6.
65. TAJIMA, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437-460.
66. TAJIMA, F. (1989). Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

67. TORRES, H. (1995). Criterios de la UICN para el manejo sustentable de especies silvestres. Pp. 51-53 en: S Puig (ed.). Técnicas para el manejo del guanaco. UICN y CSE.
68. VALLEJO, A. (2008). Impacto de diferentes sistemas de manejo en la estructura genético poblacional de *Vicugna vicugna*. Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias. UNALM. Perú.
69. VAWTER, L. Y BROWN, W. M. (1986). Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234.194-196.
70. VIDAL-RIOJA, L.; ZAMBELLI, A. y SEMORILE, L. (1994) An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparisons. *Hereditas* 121. 283-290.
71. WATTERSON, G. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*: 256-276.
72. WHEELER, J. (1984). On the origin and early development of camelid pastoralism in the Andes. In: Clutton-Brock J y C Grigson (eds) *Animals and archaeology. Volume 3: Early herders and their flocks*: 395-410. *British Archaeological Reports, BAR International Series 202*, Oxford, United Kingdom.
73. WHEELER, J. (1986). De la chasse a l'Élevage. *Telarmachay chasseurs et pasteurs préhistoriques des Andes. Vol. I* pp 61-79.
74. WHEELER, J. (1995). Evolution and present situation of the South-American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 52. 271-295.

75. WHEELER, J. (2005). El debate sobre el origen de la alpaca. *Revista de la Academia Peruana de Ciencias Veterinarias* 5-6. 40-43.
76. WHEELER, J. (2012). South American Camelids-past, present and future. *Journal of Camelid Science*; isocard: 1-24
77. WHEELER, J. , CHIKHI, L. y BRUFORD, M. (2006). Case study in genetics of animal domestication: South American camelids. In: Zeder MA, DG Bradley, E Emshwiller y BG Smith (eds) *Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms*: 329-341. University of California Press, Berkeley, California, USA.
78. WHEELER, J.; LOUNES, C. y BRUFORD, M. (2004). Genetic Analysis of the Origin of Domestic South American Camelids. Chapter 23.
79. WHEELER, J.; PIRES-FERREIRA, E. y KAULICKE, P. (1976). Preceramic animal utilization in the central Peruvian Andes. *Science* 194. 483-490.
80. WHEELER, J.; RUSSEL, A. y REDDEN, R. (1995). Llamas and alpacas: pre-conquest breeds and post-conquest hybrids. *J. Archaeological Sci.* 22: 833-840.
81. WHEELER, J.; RUSSEL, A. Y STANLEY, H. (1992). A measure of loss: Prehispanic llama and alpaca breeds. *Archivos de Zootecnia (Córdoba)* 41. 467–475.
82. WILSON, D. y REEDER, D. (2005). *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3<sup>rd</sup> Edition.
83. WING, E. (1977). Animal domestication in the Andes. En: Reed CA (ed) *Origins of agriculture*: 387-859. Mouton Publishers, The Hague, The Netherlands.

84. WING, E. (1986). Domestication of Andean mammals. En: Vuilleumier F y M Monasterio (eds) High altitude biogeography: 246-264. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
85. XIA, X. (2013). DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30:1720-1728.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1

#### DATOS DE COLECTA DE CADA LLAMA SELECCIONADA DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGRARIA SANTA ANA.

CÓDIGO DE LABORATORIO	Número de arete	SEXO	EDAD
LG 747	1	Macho	2 Dientes



LG 748

2

Macho

Diente de Leche



LG 749

3

Macho

Diente de Leche



LG 750

4

Macho

2 Dientes



LG 751

5

Macho

2 Dientes



LG 752

6

Macho

2 Dientes



LG 753

7

Macho

2 Dientes



LG 754

8

Macho

2 Dientes



LG 756

99

Hembra

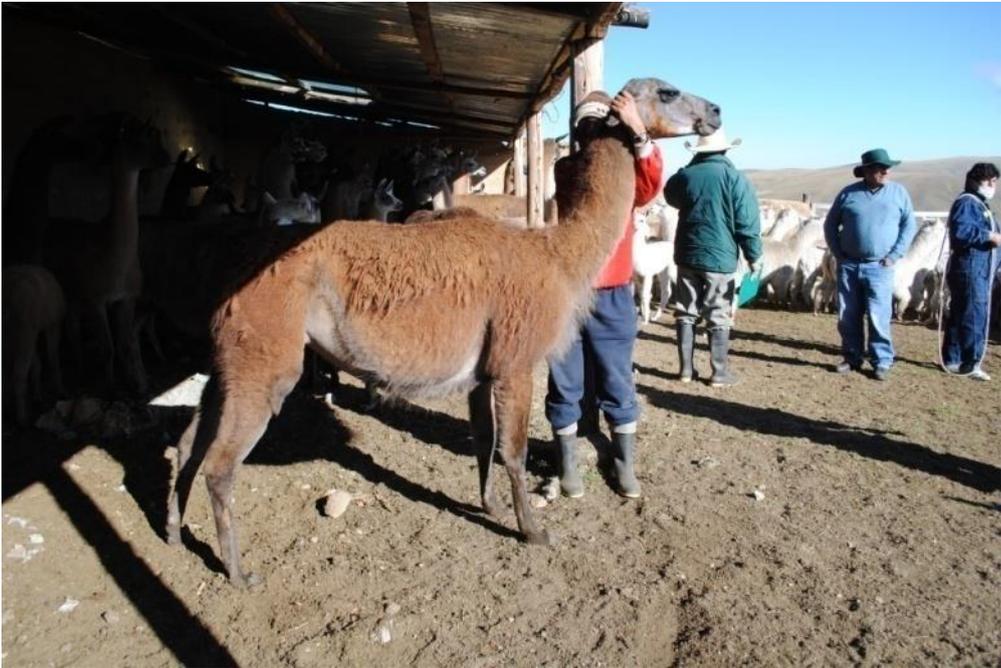
Boca Llena



LG 757	105	Hembra	4 Dientes
--------	-----	--------	-----------



LG 758	109	Hembra	Boca Llena
--------	-----	--------	------------



LG 759	111	Hembra	4 Dientes
--------	-----	--------	-----------



LG 760	143	Hembra	4 Dientes
--------	-----	--------	-----------



LG 761	161	Hembra	Boca Llena
--------	-----	--------	------------



LG 762	191	Hembra	4 Dientes
--------	-----	--------	-----------



LG 764

233

Hembra

2 Dientes



LG 765

273

Hembra

2 Dientes





**ANEXO 2**  
**CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO A PARTIR DE FOLÍCULOS**  
**PILOSOS DE LLAMAS.**

<b>Muestra</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/μl</b>
LG747	0.181	0.094	1.935	181.410
LG748	0.266	0.131	2.026	265.889
LG749	0.356	0.183	1.944	355.848
LG750	0.459	0.240	1.912	459.387
LG751	0.168	0.087	1.934	167.583
LG752	0.311	0.163	1.903	310.972
LG753	0.519	0.271	1.918	519.289
LG754	0.426	0.217	1.963	425.808
LG755	0.181	0.103	1.753	180.683
LG756	0.388	0.192	2.024	388.182
LG757	0.290	0.151	1.923	290.145
LG758	0.208	0.110	1.891	208.256
LG759	0.298	0.155	1.922	297.957
LG760	0.260	0.129	2.014	259.504
LG761	0.413	0.221	1.867	413.462
LG762	0.394	0.202	1.952	394.094
LG763	0.779	0.397	1.959	778.55
LG764	0.333	0.170	1.958	333.265
LG765	0.313	0.161	1.951	313.162
LG766	0.262	0.130	2.017	262.081

**ANEXO 3**  
**CÁLCULOS DE DILUCIÓN DEL ADN GENÓMICO.**

<b>Muestra</b>	<b>Con. Inicial (ng/μl)</b>	<b>Vol. Inicial (μl)</b>	<b>Con. final (ng/μl)</b>	<b>Vol. Final (μl)</b>
LG747	181.410	13.78	25	100
LG748	265.889	9.40	25	100
LG749	355.848	7.03	25	100
LG750	459.387	5.44	25	100
LG751	167.583	14.92	25	100
LG752	310.972	8.04	25	100
LG753	519.289	4.81	25	100
LG754	425.808	5.87	25	100
LG755	180.683	13.84	25	100
LG756	388.182	6.44	25	100
LG757	290.145	8.62	25	100
LG758	208.256	12.00	25	100
LG759	297.957	8.39	25	100
LG760	259.504	9.63	25	100
LG761	413.462	6.05	25	100
LG762	394.094	6.34	25	100
LG763	778.55	3.21	25	100
LG764	333.265	7.50	25	100
LG765	313.162	7.98	25	100
LG766	262.081	9.54	25	100

**ANEXO 4**  
**CUANTIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO DILUIDO.**

<b>Muestra</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/μl</b>
LG747	0.027	0.012	2.218	27.239
LG748	0.028	0.013	2.192	27.914
LG749	0.027	0.013	2.153	27.452
LG750	0.027	0.013	2.163	27.082
LG751	0.027	0.012	2.235	27.327
LG752	0.028	0.013	2.173	28.02
LG753	0.027	0.012	2.207	27.323
LG754	0.026	0.011	2.381	25.794
LG755	0.027	0.012	2.156	26.793
LG756	0.025	0.01	2.526	25.19
LG757	0.025	0.011	2.33	25.148
LG758	0.026	0.011	2.371	25.58
LG759	0.026	0.011	2.339	25.888
LG760	0.025	0.01	2.495	24.765
LG761	0.025	0.011	2.284	25.289
LG762	0.026	0.011	2.413	25.749
LG763	0.026	0.011	2.427	25.505
LG764	0.025	0.01	2.475	25.41
LG765	0.026	0.011	2.241	25.638
LG766	0.025	0.01	2.559	24.995