

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA**

(Creada por Ley N° 25265)



**FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA  
ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**

**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE OVINOS (*Ovis aries*)  
CRIOLLOS DE HUANCAMELICA UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSATÉLITE**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

GENÉTICA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO

**DICIPLINA:**

TECNOLOGÍA MG (SEMBRADÍOS Y GANADO), CLONAMIENTO DE  
GANADO, SELECCIÓN ASISTIDA, DIAGNÓSTICO (CON CHIPS DE  
ADN, BIOSENSORES)

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

INGENIERO ZOOTECNISTA

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:**

ORDOÑEZ BENITO, Alan Gabriel

**HUANCAMELICA – PERÚ**

**2017**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 21 días del mes de diciembre del año 2017, a horas 3:00 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **M.Sc. William Herminio SALAS CONTRERAS (PRESIDENTE)**, **M.Sc. Héctor Marcelo GUILLEN DOMÍNGUEZ (SECRETARIO)**, **Ing. Paul Herber MAYHUA MENDOZA (VOCAL)**, designados con Resolución de Consejo de Facultad N° 538-2017-FCI-UNH de fecha 17 de noviembre del 2017, aprobado el proyecto de tesis con la Resolución de Consejo de Facultad N°306-2016-FCI-UNH de fecha 22 de julio del 2016 y ratificados con Resolución de Decano N° 166-2017-FCI-UNH de fecha 06 de diciembre del 2017, a fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE OVINOS (*Ovis aries*) CRIOLLOS DE HUANCAVELICA UTILIZANDO MARCADORES MICROSATÉLITE", presentado por el Bachiller **Alan Gabriel ORDOÑEZ BENITO**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**; en presencia del **M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA**, como Asesor y el **Ing. Zoot. Eudocio Amancio VELI RIVERA** como Co-Asesor del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas...4:45 p.m; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

APROBADO



POR... Unanimidad.

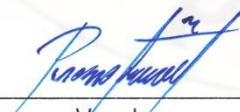
DESAPROBADO



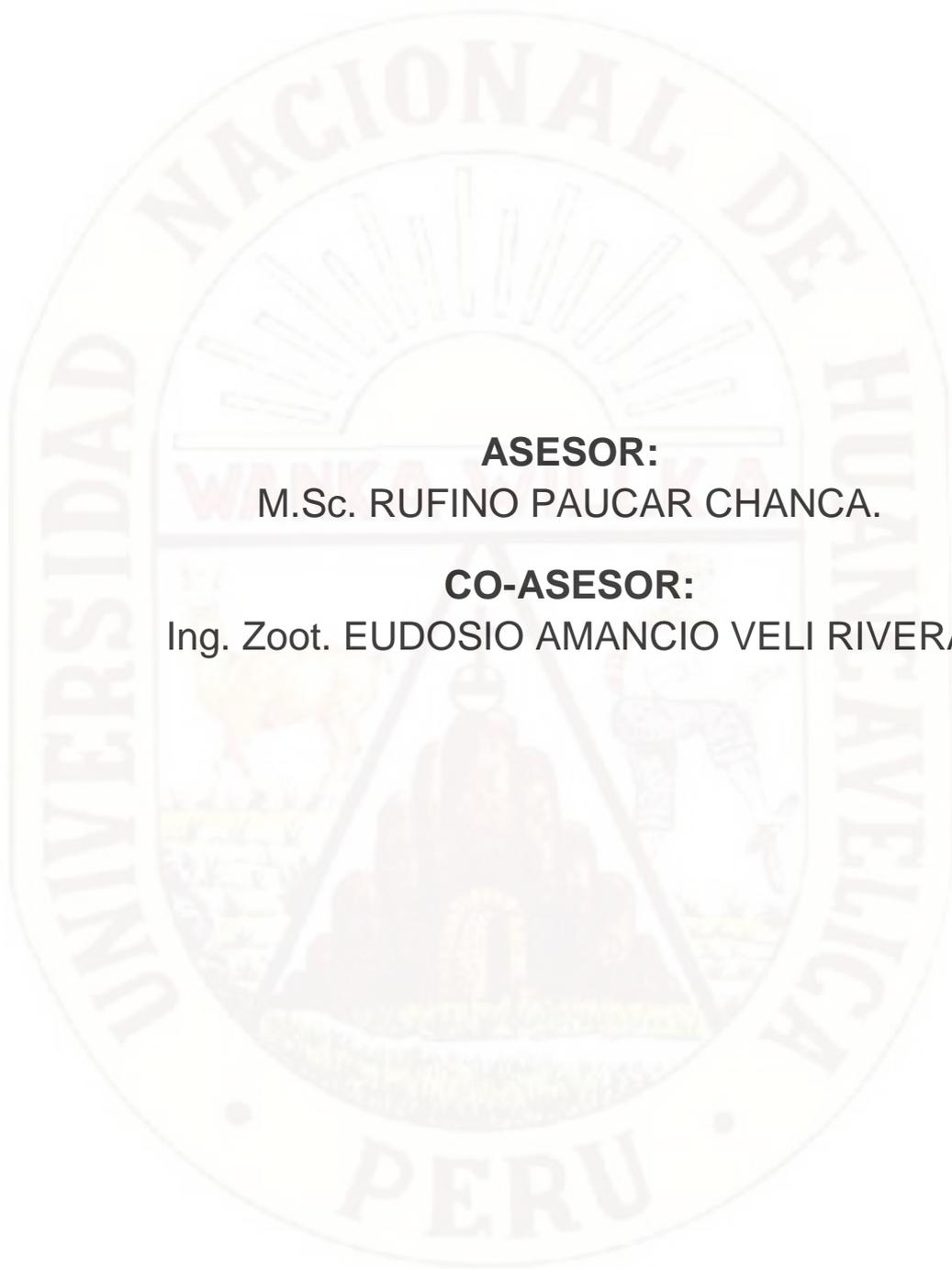
En señal de conformidad, firmamos a continuación:

  
\_\_\_\_\_  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
V° B° Decano

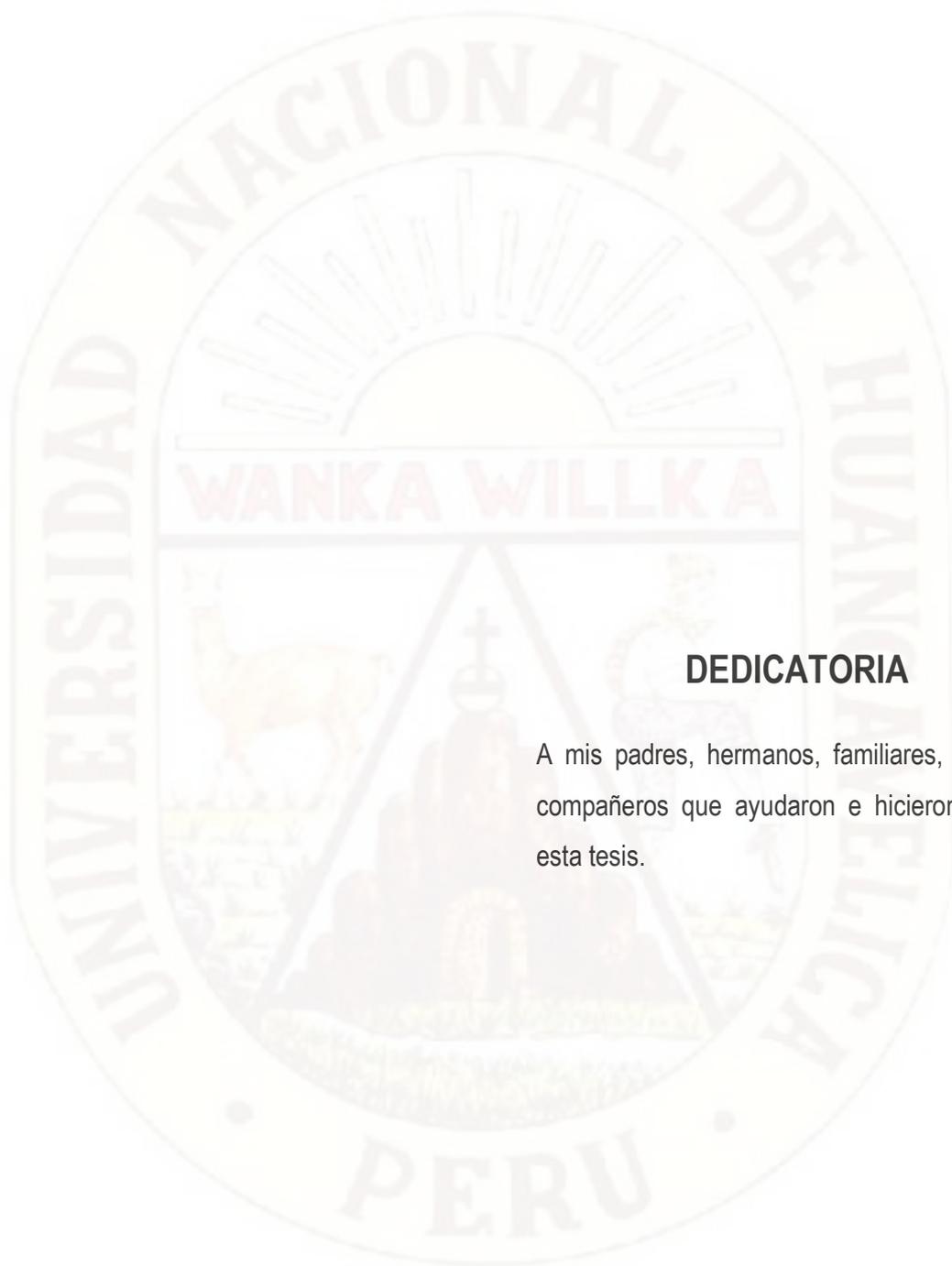


**ASESOR:**

M.Sc. RUFINO PAUCAR CHANCA.

**CO-ASESOR:**

Ing. Zoot. EUDOSIO AMANCIO VELI RIVERA



## **DEDICATORIA**

A mis padres, hermanos, familiares, amigos y compañeros que ayudaron e hicieron realidad esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

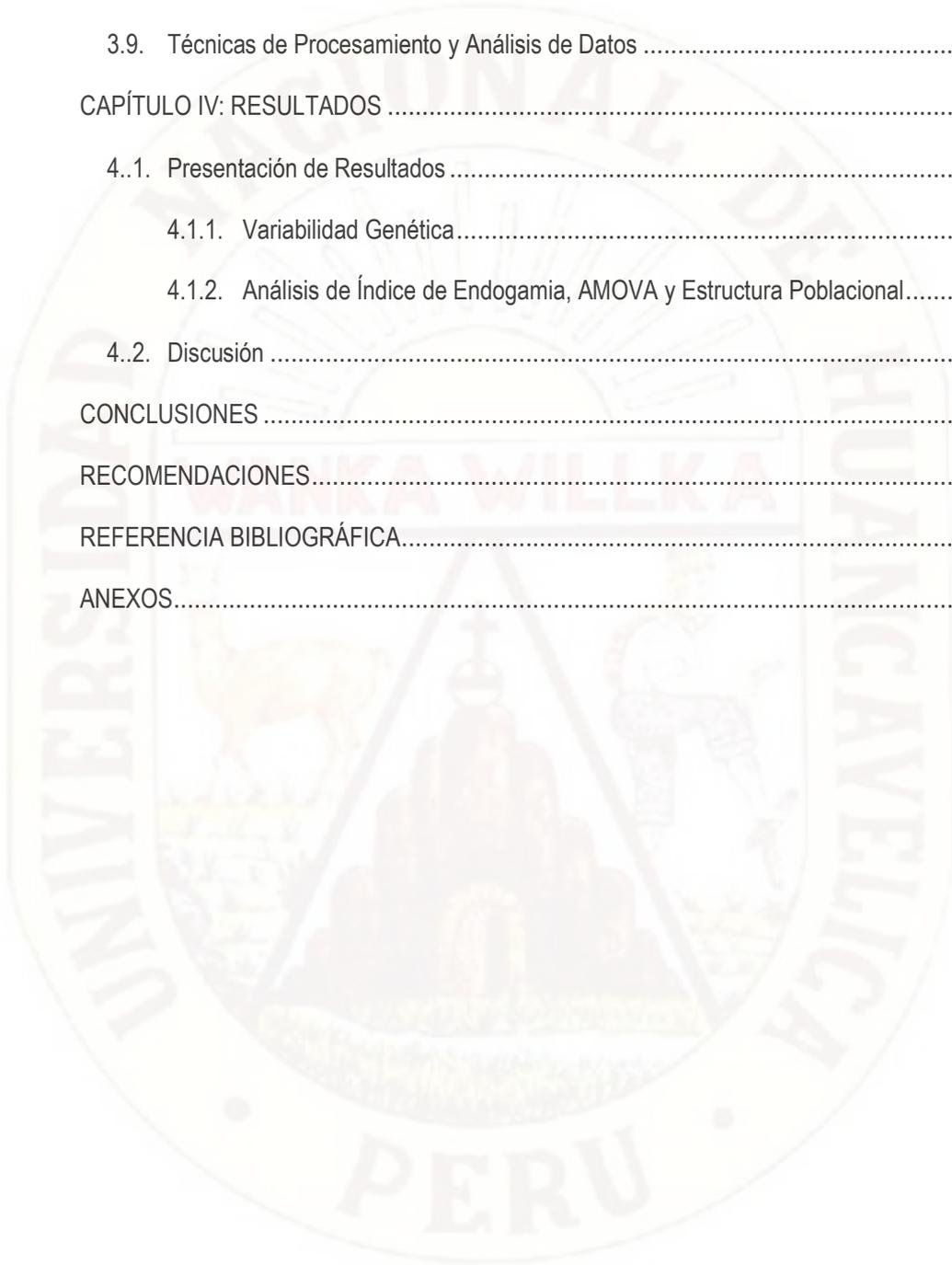
Al culminar esta tesis, me doy con la grata sorpresa de que muchas personas han contribuido al desarrollo de esta, personas que es imposible de separar de esos caminos en los que me guiaron y acompañaron durante el recorrido. A ellos, les agradezco y dedico esta tesis hecha con mucho esfuerzo:

- A mis padres que me apoyaron en todas las decisiones de mi vida, y me formaron con el convencimiento de que soy el único responsable de mis acciones; a mis hermanos por las palabras de aliento, a mis primos por acogerme en su hogar y ayudarme a continuar con mi desarrollo personal y profesional.
- Al Ing. Eudasio Veli y Bióloga. Wendy Acuña, por darme la oportunidad de realizar la presente tesis, dentro del proyecto "094\_P1: Caracterización de los recursos zoogenéticos nativos y naturalizados de importancia para la seguridad alimentaria del Perú", así como por su paciencia y orientación.
- A la Bióloga. Claudia Yalta, por orientarme y apoyarme constantemente, pero sobre todo por la paciencia que tuvo conmigo.
- Al Ing. Rufino Paucar, por su orientación y consejos como asesor de la presente tesis.
- A Shirley, por animarme a emprender este viaje dándome palabras de aliento y consuelo en muchas ocasiones.
- A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Instituto de Innovación Agraria (INIA): Henry, por esas largas charlas en las cuales me brindó parte de sus conocimientos y los incontables favores con los que me ayudó a analizar mis muestras; Cristian, por su valioso apoyo y consejo brindados; Lennin por mantener un ambiente siempre con música, aunque no era buena, pero nos mantenía activos; Carla, por esas largas charlas diarias de camino a casa, así como también su apoyo y consejos; Karla, Gabriel, Héctor, Savina, Rolando, Rosa y a todos los mencionados anteriormente por esos momentos agradables llenos de alegrías y sonrisas a lo largo del día, especialmente a la hora de almuerzo.
- A los productores de ovinos criollos de las localidades muestreadas, quienes generosamente nos permitieron extraer muestras de sus rebaños a fin de poder llevar a cabo adelante este proyecto de tesis.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	II
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I: PROBLEMA .....	2
1.1. Planteamiento del Problema .....	2
1.2. Formulación del Problema .....	3
1.3. Objetivos General y Específicos .....	3
1.3.1. Objetivo General .....	3
1.3.2. Objetivos Específicos .....	3
1.4. Justificación .....	3
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Antecedentes .....	5
2.2. Bases Teóricas .....	12
2.3. Hipótesis .....	28
2.3.1. Hipótesis Específicas .....	28
2.4. Variables de Estudio .....	29
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN .....	30
3.1. Ámbito de Estudio .....	30
3.2. Tipo de Investigación .....	31
3.3. Nivel de Investigación .....	31
3.4. Método de Investigación .....	31
3.5. Diseño de Investigación .....	31
3.6. Población, Muestra, Muestreo .....	31

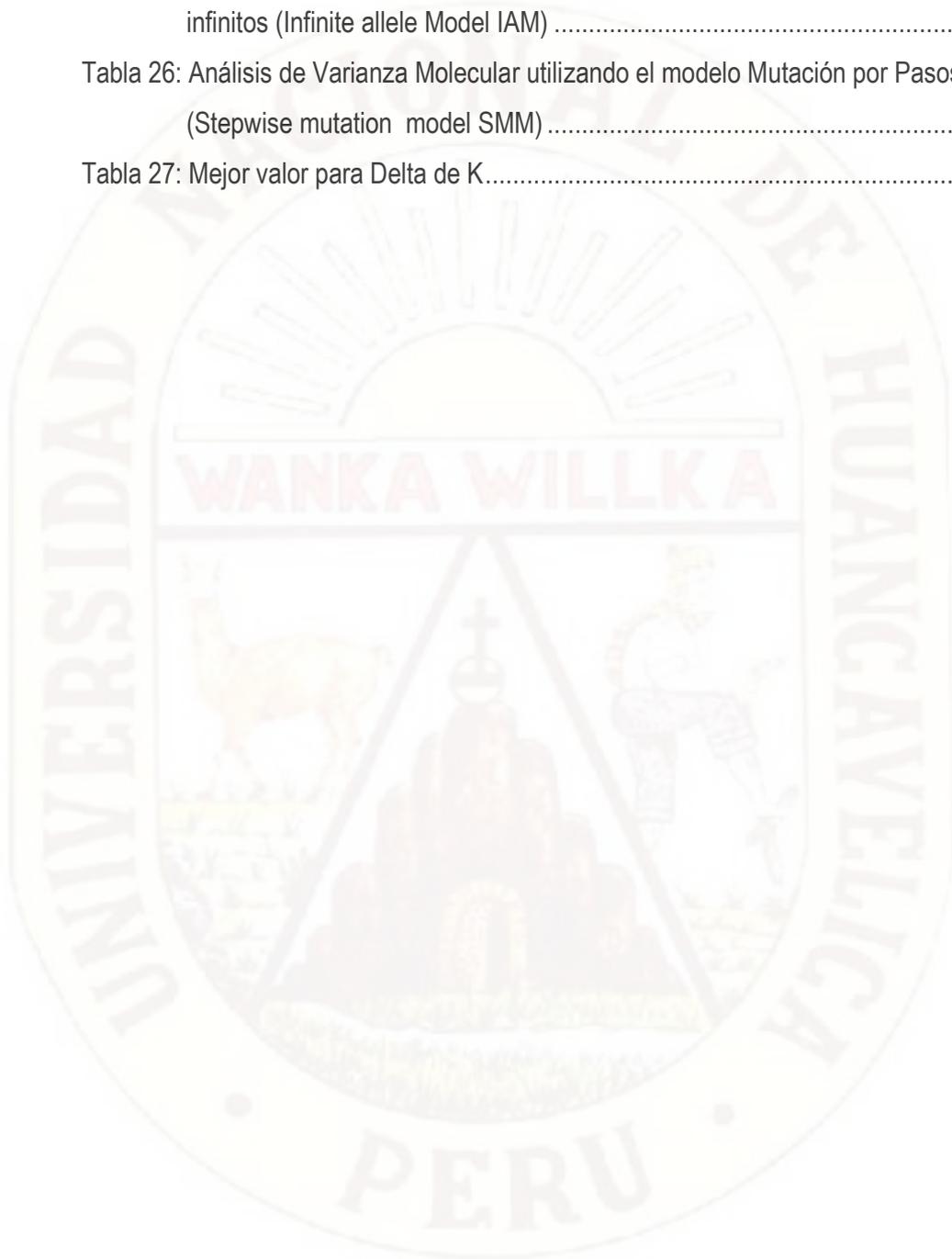
3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	32
3.8. Procedimiento de Recolección de Datos .....	33
3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos .....	37
CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....	39
4.1. Presentación de Resultados .....	39
4.1.1. Variabilidad Genética.....	39
4.1.2. Análisis de Índice de Endogamia, AMOVA y Estructura Poblacional.....	65
4.2. Discusión .....	70
CONCLUSIONES .....	80
RECOMENDACIONES.....	81
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	82
ANEXOS.....	90



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) .....	28
Tabla 2: Número de animales muestreados por Distrito en la provincia de Huancavelica, Región Huancavelica.....	31
Tabla 3: Lista de Marcadores Microsatélites empleados en el estudio .....	34
Tabla 4: Número de Alelos, Alelos Privados y Número Efectivo de Alelos por Locus.....	40
Tabla 5: Lista de los alelos privados .....	41
Tabla 6: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus BM1258 .....	42
Tabla 7: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus BM1818 .....	43
Tabla 8: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus CSRD247 ...	45
Tabla 9: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus HSC.....	46
Tabla 10: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus INRA63.....	48
Tabla 11: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus MAF65.....	49
Tabla 12: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus McM527....	51
Tabla 13: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarAE129.52	52
Tabla 14: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarCP49 ..	53
Tabla 15: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarFCB20	55
Tabla 16: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarFCB304 .....	57
Tabla 17: Número de loci amplificados .....	59
Tabla 18: Estimación de alelos nulos para el distrito de Vilca .....	59
Tabla 19: Estimación de alelos nulos para el distrito de Yauli .....	60
Tabla 20: Estimación de alelos nulos para el distrito de Acoria .....	60
Tabla 21: Estimación de alelos nulos para la población total .....	61
Tabla 22: Estimación de heterocigosidad y PIC por locus en los distritos de Vilca, Yauli, Acoria y total de la población .....	62
Tabla 23: Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) evaluado mediante la prueba exacta para cada locus en las poblaciones de ovinos de los distritos de Vilca, Yauli y Acoria. Bajo la hipótesis alterna (H1: Existe déficit de heterocigotos y exceso de heterocigotos).....	64

Tabla 24: Valores de Fis y Fit por distrito.....	66
Tabla 25: Análisis de Varianza Molecular utilizando el modelo de mutación de sitios infinitos (Infinite allele Model IAM) .....	66
Tabla 26: Análisis de Varianza Molecular utilizando el modelo Mutación por Pasos (Stepwise mutation model SMM) .....	67
Tabla 27: Mejor valor para Delta de K.....	69



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación de las localidades muestreadas en la provincia y departamento de Huancavelica (2016). Mapa elaborado por software QGIS 2.1813. ....	30
Figura 2: Frecuencia alélica para el locus BM1258 a nivel de cada subpoblación.....	42
Figura 3: Frecuencia alélica para el locus BM1258 a nivel del total de la población .....	42
Figura 4: Frecuencia alélica para el locus BM1818 a nivel de cada subpoblación.....	44
Figura 5: Frecuencia alélica para el locus BM1818 a nivel del total de la población .....	44
Figura 6: Frecuencia alélica para el locus CSRD247 a nivel de cada subpoblación .....	45
Figura 7: Frecuencia alélica para el locus CSRD247 a nivel del total de la población .....	45
Figura 8: Frecuencia alélica para el locus HSC a nivel de cada subpoblación .....	47
Figura 9: Frecuencia alélica para el locus HSC a nivel del total de la población .....	47
Figura 10: Frecuencia alélica para el locus INRA63 a nivel de cada subpoblación .....	48
Figura 11: Frecuencia alélica para el locus INRA63 a nivel del total de la población .....	49
Figura 12: Frecuencia alélica para el locus MAF65 a nivel de cada subpoblación .....	50
Figura 13: Frecuencia alélica para el locus MAF65 a nivel del total de la población.....	50
Figura 14: Frecuencia alélica para el locus McM527 a nivel de cada subpoblación .....	51
Figura 15: Frecuencia alélica para el locus McM527 a nivel del total de la población .....	51
Figura 16: Frecuencia alélica para el locus OarAE129 a nivel de cada subpoblación .....	52
Figura 17: Frecuencia alélica para el locus OarAE129 a nivel del total de la población.....	53
Figura 18: Frecuencia alélica para el locus OarCP49 a nivel de cada subpoblación .....	54
Figura 19: Frecuencia alélica para el locus OarCP49 a nivel del total de la población .....	54
Figura 20: Frecuencia alélica para el locus OarFCB20 a nivel de cada subpoblación .....	56
Figura 21: Frecuencia alélica para el locus OarFCB20 a nivel del total de la población .....	56
Figura 22: Frecuencia alélica para el locus OarFCB304 a nivel de cada subpoblación .....	57
Figura 23: Frecuencia alélica para el locus OarFCB304 a nivel del total de la población .....	58
Figura 24: Varianza molecular para el modelo de mutación simple.....	67
Figura 25: Varianza molecular para el modelo mutación por pasos .....	68
Figura 26: Curva de Delta de K.....	69
Figura 27: Estructura poblacional de los distritos de Huancavelica .....	69

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Población de ovinos en Huancavelica .....	91
ANEXO 2: Encuesta realizada a los criadores de ovinos criollos .....	93
ANEXO 3: Ficha de campo utilizada para el recojo de información .....	94
ANEXO 4: Ilustración de toma de muestras .....	95
ANEXO 5: Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de células blancas .....	96
ANEXO 6: Ilustración de extracción de ADN a partir de Sangre .....	97
ANEXO 7: Ilustración de determinación de la calidad de ADN extraído .....	98
ANEXO 8: Gel de agarosa 1%, ADN total ovinos criollos .....	98
ANEXO 9: Ilustración de PCR multiplex .....	99
ANEXO 10: Cuadro de protocolos y programas de amplificación de fragmentos mediante PCR multiplex .....	99
ANEXO 11: Gel de agarosa 2%, visualización de productos de PCR multiplex .....	101
ANEXO 12: Electroferogramas de microsatélites A) 6-FAM, B) HEX y C) NED .....	102

## RESUMEN

La crianza del ovino constituye una importante actividad económica y está muy difundida en el Perú, siendo la raza criolla la que concentra la mayor población en el país (81%) y en la provincia de Huancavelica (91%), debido a su gran capacidad de adaptación a distintos medios y ambientes de producción. Por ello, el presente estudio tiene como objetivo: Caracterizar molecularmente los ovinos criollos de Huancavelica utilizando marcadores microsatélite. Un total de 113 muestras fueron colectadas en tres subpoblaciones diferentes (Wilca, Yauli y Acoria), las cuales fueron procesadas utilizando un panel de 11 marcadores microsatélites fluoromarcados y posteriormente los amplificados fueron separados por electroforesis capilar con el secuenciador automático ABI 3130XL. La caracterización molecular se hizo midiendo la variabilidad genética, la estimación del grado de endogamia y la estructura subpoblacional, para lo cual se trabajó con los siguientes parámetros: número de alelos, número efectivo de alelos, alelos nulos, heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (HW), índice de contenido polimórfico (PIC), coeficiente de endogamia poblacional ( $F_{IT}$ ), coeficiente de fijación ( $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ ). Se encontraron los siguientes resultados: Número de alelos=137, número efectivo de alelos=63,28, los loci BM1258, HSC, INRA63 y OarAE129 manifestaron presencia de alelos nulos,  $H_o=0,718 \pm 0,059$ ,  $H_e=0,790 \pm 0,031$ , además de un desequilibrio HW para el 36% de locus analizados,  $PIC=0,762 \pm 0,036$ ,  $F_{IT}=0,111 \pm 0,056$ ,  $F_{ST}=0,016$   $R_{ST}=0,00$ . A partir de estos datos se puede inferir que existe alta variabilidad genética, así como un moderado grado de endogamia, resultado del cual se observa baja diferenciación genética entre las subpoblaciones. Igualmente, los loci utilizados resultaron ser altamente informativos, los cuales se pueden emplear en los programas de conservación y mejoramiento genético de esta especie.

**Palabra clave:** variabilidad genética, heterocigosidad, Hardy-Weinberg, endogamia.

## ABSTRACT

The breeding of sheep is a very important economic activity in Perú, the race creole sheep have 81% in Perú, at Huancavelica province 91%, the creole race have a good adaptation to different media and production environment. For this reason, the present study has the following objective: Molecular characterization of Huancavelica creole sheep using microsatellite markers. A total of 113 samples were collected in three different subpopulations (Wilca, Yauli and Acoria). They were processed using a panel of 11 fluorinated microsatellite markers and then the amplified ones were separated by capillary electrophoresis with automatic sequencer ABI 3130XL. The molecular characterization was made by measuring the genetic variability, the estimation of the degree of inbreeding and the subpopulation structure, for which we worked with the following parameters: number of alleles, effective number of alleles, null alleles, observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ), Hardy-Weinberg equilibrium test (HW), polymorphic content index (PIC), population inbreeding coefficient ( $F_{IT}$ ), coefficient fixation ( $F_{ST}$  and  $R_{ST}$ ). The following results were found: number of allele=137, effective number of allele=63,28, loci BM1258, HSC, INRA63 and OaeE129 has null allele,  $H_o=0,718 \pm 0,059$ ,  $H_e=0,790 \pm 0,031$ , disequilibrium HW test for 36% of locus,  $PIC=0,762 \pm 0,036$ ,  $F_{IT}=0,111 \pm 0,056$ ,  $F_{ST}=0,016$   $R_{ST}=0.00$ . From this data, it can be inferred that there is high genetic variability, as well a moderate degree of inbreeding, result of which low genetic differentiation between subpopulations is observed. The loci used turned out to be highly informative, which can be used in the conservation and breeding programs of this specie.

**Keyword:** genetic variability, heterozygosity, Hardy-Weinberg, inbreeding.

## INTRODUCCIÓN

La caracterización de los recursos zoogenéticos permite establecer estrategias para la conservación o el mejoramiento genético de una determinada especie, estas estrategias se basan en comprender la situación actual de estos, a través de actividades que comprende realizar la identificación, descripción cuantitativa y cualitativa, y documentación de la población de ovinos criollos, utilizando herramientas como: encuestas, seguimiento, sistemas de información y caracterización genética molecular(1).

Para realizar la caracterización genética molecular se han desarrollado herramientas que permiten el análisis de ADN, empleando en estos marcadores moleculares como los microsatélites, minisatélites, polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), polimorfismo por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP), gracias a estas herramientas es posible caracterizar genéticamente poblaciones de individuos(2), en este caso a los ovinos criollos de Huancavelica.

Los marcadores microsatélites es una herramienta que mayormente se ha empleado en el estudio de poblaciones de animales, debido al gran potencial que presentan, siendo estas altamente polimórficos y a su vez informativos, brindando resultados sobre la variabilidad genética y su estructura poblacional(1), de los ovinos criollos.

En el presente informe se caracterizó molecularmente a los ovinos criollos de Huancavelica, y a su vez se determinó la variabilidad genética, el grado de endogamia y la estructura subpoblacional, se espera que sirvan como referencia para poder diseñar e implementar programas de conservación y mejoramiento genético de los ovinos criollos de Huancavelica.

# CAPÍTULO I: PROBLEMA

## 1.1. Planteamiento del Problema

La crianza del ovino constituye una importante actividad económica y está muy difundida, existiendo una población de 1, 172 millones de cabezas en el mundo y 66 millones en América del Sur(3), en Perú la población de ovinos es de 9 523,2. La raza que concentra la mayor población es la de Criollos y representa el 81,0% del total. Le sigue en orden de importancia la raza Corriedale con el 11,4%, Hampshire Down 2,6%, Black Belly 0,9% y otras razas 4,1% respectivamente(4).

En Perú la ovinocultura es una actividad tradicional para pequeños productores, que generalmente poseen animales criollos, los cuales son ignorados por políticas públicas y la comunidad científica, que a diferencia de otros países como Chile, donde se realizó una descripción de ovino criollo de Chilote, con el fin de poder utilizar en un futuro como recurso genético animal de gran adaptación a las condiciones del Archipiélago de Chiloé al sur de Chile(5), o como en Colombia que realizaron un trabajo similar donde caracterizaron genéticamente a los ovinos colombianos con el fin de conservación de genes(6), países que han visto la necesidad de conservar estos recursos y poder utilizarlo en un futuro.

En el Perú, los ovinos criollos poseen gran capacidad de adaptación a distintos medios y ambientes de producción. Sin embargo, hasta la actualidad no se le ha dado al ovino criollo la atención que merece, más aún tampoco se le ha reconocido como raza, lo cual ha repercutido en la realización de inadecuadas prácticas de producción. Como resultado de esto, se generó en las poblaciones de ovinos criollos, una baja productividad y sufriendo cruzamientos con razas exóticas (7).

En el departamento de Huancavelica existe una población total de 640 242 ovinos de los cuales 584 031 son criollos, esto representa el 91% de la población total(4), por lo que, se considera que la población de ovinos criollos es significativamente representativa en nuestra región. Así mismo, esta cifra revela que hasta el momento no se ha trabajado en temas de caracterización y mejoramiento

genético y por ende existe desconocimiento del estado de variabilidad genética o el índice de endogamia en las poblaciones de ovinos criollos.

Por lo mencionado anteriormente, el presente informe final de investigación tiene la finalidad de caracterizar molecularmente la población de ovinos criollos de la provincia de Huancavelica. Dicha información podrá en un futuro ser aplicada en el diseño de programas de conservación y mejoramiento genético de ovinos criollos en Huancavelica.

## **1.2. Formulación del Problema**

¿Cuál será la caracterización molecular los ovinos criollos de Huancavelica utilizando marcadores microsatélite?

## **1.3. Objetivos General y Específicos**

### **1.3.1. Objetivo General**

- ✓ Caracterizar molecularmente ovinos criollos de Huancavelica utilizando marcadores microsatélite.

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Determinar la variabilidad genética de los ovinos criollos de Huancavelica.
- ✓ Estimar el grado de endogamia entre los ovinos criollos de Huancavelica.
- ✓ Estimar la diferenciación genética entre subpoblaciones de Huancavelica.

## **1.4. Justificación**

Los ovinos domésticos son especies cosmopolitas que producen lana, carne, leche, piel, cuero y estiércol que sirven como abono y combustible, útiles para el hombre.

La crianza ovina tiene importancia económica, social y ecológica. La importancia económica y social, para priorizar la crianza de ovinos, radica en la población nacional de 15 486 000 de cabezas, que ubica al Perú en el segundo país de mayor población ovina en América después de Brasil. Esta población produce 31 758 t de carne y 12 938 t de lana y 2 507 475 unidades de cuero por año generando ingresos económicos para la subsistencia de 1 030 223 familias campesinas(4). La

importancia ecológica radica en que el 96.2% de la población ovina se cría en la sierra alimentándose con pastos naturales que crecen en 14 millones de hectáreas no aptos para la agricultura.

La caracterización molecular se realiza fundamentalmente para explorar la variabilidad genética dentro de una población y entre distintas poblaciones de animales, y para determinar relaciones genéticas entre ellas. Concretamente los resultados sirven para determinar los parámetros de variabilidad, identificar localizaciones geográficas de determinadas poblaciones, proporcionar información sobre relaciones evolutivas, identificar relaciones de parentesco, apoyar la mejora genética de las poblaciones animales mediante el uso de marcadores y desarrollar depósitos de investigación y desarrollo(1).

La variabilidad genética de los individuos es fundamental para la supervivencia de la especie a largo plazo, si esta disminuye, indefectiblemente reduce su capacidad de adaptarse ante potenciales cambios ambientales. Una disminución en la variabilidad genética puede deberse a una reducción de la cantidad de individuos o bien a la presión de selección que existe. Mantener la variabilidad genética es vital para responder exitosamente a las presiones ambientales de selección, desarrollando así estrategias y programas tanto en mejoramiento genético como en la conservación de esta especie, por ello es muy importante conocer la variabilidad genética de la población ovina criolla de nuestra provincia, y estos resultados obtenidos permitirá a grupos interesados; tales como: ganaderos, gobiernos nacionales y locales tomar decisiones adecuadas y poder desarrollar estrategias y programas adecuados ya sea para la conservación o mejoramiento genético de esta especie, garantizando al propio tiempo la conservación para generaciones actuales y venideras(1).

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

La expansión actual de los criterios conservacionistas ha promovido la utilización de las modernas metodologías que brinda la genética molecular para la caracterización de las razas, aunque la caracterización genética clásica basada en marcadores bioquímicos e inmunogenéticos se ha aplicado durante muchos años sobre todo en rumiantes y equinos en pruebas de identidad y control de filiación. El estudio del polimorfismo de los microsatélites del ADN han ofrecido muy buenos resultados, aunque también se ha trabajado con éxito en la investigación del ADN mitocondrial y de fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente. En España(8, 9), y otros países del mundo(10-12), estos métodos han sido utilizados en las especies bovina, ovina, caprina, equina alpaca y llama.

La evaluación de la variabilidad genética en ganado vacuno criollo Colombiano mediante marcadores microsatélites, donde se estimó la variabilidad y las relaciones filogenéticas entre 6 razas del ganado criollo colombiano, Cebú Brahman y la española Pirenaica, mediante el uso de 12 marcadores tipo microsatélite; el cual reporta el número promedio de alelos 11,58 con los valores más altos para los marcadores HEL 13 y ETH 10, la heterocigosidad promedio de todas la razas fue de 0,7 y el coeficiente de endogamia fue de 0,097, con los valores más altos para la raza Romosinuano, los mayores valores de diversidad se presentaron en la raza Casanareño, la distancia genética entre las razas criollas colombianas y la raza española Pirenaica fue amplia (0,7-1,7) indicando posiblemente poca intervención de esta raza en el origen de las razas criollas, llegando a la conclusión de que las razas bovinas criollas colombianas inscritas en los programas de conservación, muestran un alto grado de variabilidad genética, con su mejor representante de la raza Casanareño, lo cual demuestra su gran valor como patrimonio genético de la nación(11).

Caracterización genética de poblaciones Cebuínas a través de marcadores moleculares de proteína y ADN, donde el objetivo fue conocer las frecuencias alélicas para 12 loci de tipo proteína (hemoglobina, anhidrasa carbónica, peptidasa-B, amilasa-I, albúmina y transferrina) y ADN (UWCA46, BM1824, HEL1, BM2113, INRA006 y BMS348) y verificar sus eficiencias en las pruebas de paternidad para la raza Nelore utilizando dos grupos de rebaños selección (toros seleccionados en pruebas de ganancia de peso) y control (toros que registran la misma media de peso vivo), mostrando que la prueba exacta de Fisher reveló que los rebaños selección y control difirieron ( $p < 10^{-4}$ ) en sus composiciones genóticas, la variabilidad genética fue mayor en el rebaño selección. Los alelos A1 (Tf), 145 y 147 (UWCA46) y 117 (HEL1), probablemente sean marcadores de razas Cebuínas, la probabilidad de exclusión combinada fue estimada en 99,40, indicando que el conjunto de marcadores es eficiente pudiendo ser empleado en verificaciones de parentesco en la raza Nelore. Sin embargo, la sustitución de loci de proteínas, excepto transferrina y del BMS348 por otro microsatélite podría resultar en una eficiencia mejor, disminuyendo el número de marcadores en la investigación de paternidad(13).

La Caracterización genética del bovino de la raza criollo Limonero de Venezuela utilizando marcadores de ADN microsatélites, cuyo objetivo fue estudiar la variabilidad genética de la raza criollo limonero considerada patrimonio nacional y orientada a la producción de leche, donde se estimaron los siguientes resultados; el número promedio de alelos por locus, He y PIC fueron: 8,7; 0,689 y 0,651, respectivamente. Las He variaron desde 0,355 hasta 0,787 y el PIC fluctuó de 0,302 a 0,757. El locus menos polimórfico fue el ILST5 y el más polimórfico fue el CSSM66. La PE con los 14 marcadores fue de 0,9962 y 0,9999 para uno y dos padres conocidos, respectivamente. Los resultados indicaron que este grupo de marcadores resultaron ser eficientes para realizar pruebas de paternidad en esta raza, así mismo se muestran que los niveles de heterocigosis indican la existencia de una alta diversidad molecular en la población estudiada, la cual deberá mantenerse como

estrategia para la conservación del Criollo Limonero como recurso genético bovino de Venezuela para la producción animal en la región tropical(14).

Se caracterizó molecularmente llamas (*Lama glama*) ch'aku y ccara del banco de germoplasma de alpacas de color y llamas del centro experimental illpa-inia anexo Quimsachata, usando marcadores microsatélites donde el objetivo fue analizar la diversidad genética y determinar el grado de diferenciación genética entre los dos fenotipos de llamas, mediante la aplicación y análisis de 13 loci microsatélites reportados internacionalmente en CSA usando el cebador universal M13. Se reportaron altos niveles de polimorfismo en los marcadores, determinando alta diversidad genética. Se identificaron 157 alelos diferente, un promedio de 12,08 alelos por marcador, heterocigosidad esperada promedio por marcador: 0,758 y PIC promedio por marcador: 0,723. La prueba del equilibrio Hardy-Weinberg demostró que, en general, los loci estuvieron en desequilibrio debido a un déficit de heterocigotos (Fis promedio: 0,063) y no se debió a alelos nulos. A pesar que las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara del Banco son manejadas por separado, la diferenciación genética entre ellas es muy baja ( $F_{st} = 0,01$ ), esto indica una débil estructura genética, y existe un intenso flujo genético entre ambas poblaciones. Probablemente su mismo proceso de domesticación y el intercambio frecuente de reproductores en los rebaños de donde provienen, ha envuelto cruzamientos entre ambos fenotipos, concluyendo así que la población de llamas, *Lama glama*, Ch'aku y Ccara ubicadas en el Banco de Germoplasma del INIA, simboliza patrimonio natural, económico, cultural e histórico del Perú(15).

Variabilidad genética poblacional de alpacas *Vicugna pacos* determinada por marcadores microsatélites en el centro piloto Munay Paqocha y del fundo Itita, Puno-Perú, mostrando que el total de la población presentó un alto nivel de variabilidad alélica, y alelos exclusivos entre poblaciones con frecuencias menores al 1,5%, en los loci LCA37, LCA90, LCA5, VOLP92, YWLL36, YWLL44 y YWLL08. Los valores de Fis (0,016), y  $F_{st}$  (0,003) reflejaron bajo niveles de endogamia. El rebaño del Fundo Itita presentó un mayor  $H_o$  (0,858)

respecto a la He (0,848), mientras que por el contrario el rebaño del Centro Munay Paqocha presentó un menor valor del Ho (0,815) respecto al He (0,848), con una tendencia al déficit de heterocigotos. Los 10 marcadores presentaron una probabilidad de exclusión de parentesco adecuada, con un valor superior al 99,9%, cuando se conoce el genotipo de ambos padres, y un poder de discriminación mayor a 0,90. Además, se alcanzó un valor PEC (probabilidad de exclusión combinada) de 0,999 considerando solo los marcadores YWLL08, YWLL44, LCA37, YWLL36, LCA8; siendo YWLL08 el de mayor valor (0,885). La prueba de filiación permitió detectar mayores errores de asignación de maternidad (13,04%) y paternidad (30,4%) en el rebaño del Fundo Itita, respecto al Munay Paqocha con errores de designación de maternidad de 7,69% y de paternidad de 17,95%, concluyendo que este centro posee un mejor registro de empadres(16).

Evaluación de la diversidad genética, relación genética y cuello de botella utilizando 20 microsatélites en 5 razas de cabras nativas de Turquía (Angora, Kilis, Honamli, Hair and Norduz razas de cabra), reportando los siguientes resultados: los 20 microsatélites analizados revela que el número promedio de alelos por locus (15,65 alelos/locus) y el nivel de heterocigosidad (0,5192 – 0,9400) fueron bastante altos, el valor Fis general calculado para todas la poblaciones fue  $0,03656 \pm 0,033$  el cual no fue significativo, todas la poblaciones estaban en equilibrio Hardy-Weinberg. De acuerdo a los valores de Fst se encontró para la diversidad genética entre Angora y otras razas valores de nivel medio en cuanto a diversidad genética. Entre las otras razas la diversidad fue baja el cual no fue estadísticamente significativa, todas las pruebas realizadas indicaron que la raza Angora es diferente a las otras razas de cabras, además el análisis mostro que las otras razas de cabras nativas no podían distinguirse unas de otras(17).

Caracterización genética de la población caprina Majorera de Fuerteventura-España, en la que se emplearon 22 microsatélites, de las cuales 20 resultaron polimórficas y dos monomórficos, donde se reporta 6,954 como numero promedio de alelos, la heterocigosidad media esperada fue 0,590 y la

observada 0,544, llegando a la conclusión de que los marcadores utilizados son bastante informativos y por tanto van a ser muy útiles en la medición de la variabilidad genética(18).

Diversidad genética de la cabra criolla venezolana mediante análisis con microsatélites, cuyo principal objetivo fue caracterizar la variabilidad genética en la cabra Criolla de Venezuela a través del análisis de un conjunto de microsatélites, todo ello enmarcado como punto de inicio para la futura puesta en marcha de un programa de conservación genética de este germoplasma. El conjunto de marcadores moleculares utilizados son los propuestos por la FAO y la ISAG para estudios de biodiversidad. Los resultados muestran que existe una alta variabilidad genética, con una heterocigosidad esperada de 0,65 y número medio de alelos de 6,2. La medida de diversidad genética reveló un buen estatus de la biodiversidad en la cabra Criolla venezolana, lo cual permite concluir que, el uso sistemático de los marcadores moleculares en este tipo de estudio podría facilitar el entendimiento del manejo poblacional y constituirá una excelente estrategia para la conservación de esta especie(19).

Se ha realizado diversos estudios en caracterización genética de ovinos a nivel mundial, se realizó el trabajo titulado Caracterización genética de razas ovinas Egipcias e Italianas usando ADN mitocondrial, tendiendo por objetivo caracterización genética y biodiversidad entre razas ovinos Egipcios e Italianos usando mtADN, el cual mostró que la diversidad de haplotipos y el número promedio de diferencias por pares fueron de 0.97571 y 7.01484 respectivamente, también se observó distancias genéticas bajas entre Laticuda y Muflon Italiano seguida de distancia entre Sarda y Muflon Italiano, también se encontró distancias altas entre ovinos Barki y Sarda seguidos por Barki y Laticuda, el análisis filogenético mostro la presencia de tres Haplotipos: HapA, HapB y HapC, llegando a la conclusión de que las razas Italianas son claramente diferentes de las Egipcias(20).

Análisis de la Diversidad Genética y diferencias entre poblaciones ovinas en Jordan, En las que se muestran los siguientes resultados: el número de alelos por Locus (A) 12.67, la heterocigosidad esperada (He) 0.820, la

heterocigosidad observada ( $H_o$ ) 0.684, la distancia genética sin duda revelo el grado esperado de diferenciación entre poblaciones las poblaciones estudiadas, concluyendo que las posibles inferencias que existen se atribuyen a la locación geográfica, las mutaciones y la selección que existe(21).

El uso de los marcadores microsatélites para el estudio de la diversidad genética en ovino de Indonesia, en el cual se utilizó 18 marcadores microsatélite, reportando un número promedio de alelos de 6,10 alelos de 5 poblaciones ovinas indonesias (ovino garut de doble propósito, ovino garut de aptitud cárnica, ovino purbalingga, ovino batur y población de ovino jember). El promedio de heterocigosidad observada  $H_o$  y esperada  $H_E$  fue de 0,5749 y 0,6896 respectivamente, mientras que la diferencia genética de endogamia entre la población ( $F_{is}$ ), dentro de la población ( $F_{it}$ ) y la diferenciación genética promedio ( $F_{st}$ ) fueron 0,1006, 0,1647 y 0,0712 respectivamente, la distancia genética y el árbol filogenico muestra que la población de ovinos de Indonesia fue distinta del ovino garut, purbalingga, batur y ovino jember, concluyendo que es necesario establecer estrategias de conservación y programas de mejoramiento en cada una de las poblaciones de ovinos en Indonesia(22).

Diversidad genética de ovinos en Colombia por medio de marcadores microsatélites, tuvo por objetivo determinar la diversidad genética de 13 razas ovinas presentes en Colombia, donde reportaron un promedio de 14,27 alelos por locus, con un rango de heterocigosidad observada y esperada de 0,444 a 0,840 y 0,672 a 0,857 respectivamente y un PIC promedio de 0,741, llegando a la conclusión de que las ovejas colombianas presentaron una alta variabilidad genética lo cual es muy importante para futuros programas de selección y mejoramiento genético(6).

Desarrollo de un múltiplex de microsatélites para diagnóstico de paternidad en ovinos Corriedale de Uruguay, cuyo objetivo fue evaluar dicho multiplex de acuerdo a variabilidad genética de las frecuencias alélicas para la asignación de progenitores mediante los valores de su Probabilidad de Exclusión (PE), mostrando los siguientes resultados: Los STR presentaron una variabilidad relativamente alta de acuerdo al Índice de Heterocigosidad

promedio ( $H_o=0,661$ ), al número de alelos observados ( $N=8,6$ ) y al Contenido de Información Polimórfica ( $PIC=0,614$ ). Se observó en cuatro de los 10 STR utilizados (FCB20, TGLA53, MCM527 y MCM130) una pérdida de equilibrio Hardy-Weinberg debido a la disminución significativa de heterocigotos, con la consiguiente reducción de variabilidad genética. Como consecuencia la Probabilidad de Exclusión combinada en dicha población presentó un valor de 0,960. Concluyendo que para mejorar la certeza en el diagnóstico de paternidad se podría incluir un mayor número de STR en el multiplex, dada la baja variabilidad genética presente en los padres(10).

El trabajo de investigación: Caracterización molecular en ovinos (*Ovis aries*) assaf, blackbelly y asblack utilizando marcadores microsatélites, cuyo objetivo fue caracterizar a nivel molecular las poblaciones de ovinos Assaf, Blackbelly y Asblack; determinando su variabilidad genética (intra-poblacional e inter-poblacional) y, su estructura poblacional (inter-poblacional), utilizando marcadores microsatélites, reportando los siguientes: En estos resultados se demuestra que las poblaciones Assaf ( $H_o=0.645$ ;  $H_e=0.661$ ); Asblack ( $H_o=0.640$ ;  $H_e=0.681$ ) y Blackbelly ( $H_o=0.636$ ;  $H_e=0.672$ ) tienen una alta variabilidad; el número de alelos para el ovino Assaf ( $N_a=5.35$ ); Asblack ( $N_a=7.24$ ) y Blackbelly ( $N_a=5.47$ ); el índice de fijación ( $F=0.115$ ), lo cual indica que hay una moderada diferencia entre las poblaciones en estudio. Por otro lado, los marcadores en estudio no presentaron equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE); además en las poblaciones estudiadas no se encontraron cuellos de botella. A su vez el flujo genético que se encontró fue de 0.03, lo que indica que es un valor muy bajo, indicando una diferenciación genética menor(23).

## 2.2. Bases Teóricas

### Taxonomía del Ovino.

La clasificación de los ovinos es de la siguiente manera(24):

Reino	: <b>Animal</b>
Phylum	: <b>Cordados</b>
SubPhylum	: <b>Vertebrados</b>
Clase	: <b>Mamíferos</b>
Subclase	: <b>Ungulados</b>
Orden	: <b>Artiodáctilos</b>
Suborden	: <b>Rumiantes</b>
Familia	: <b>Bovidae</b>
Subfamilia	: <b>Ovinae</b>
Género	: <b>Ovis</b>
Especie	: <b><i>Ovis aries</i></b>

### El Ganado Ovino en el Perú

El Perú tiene una población ovina de 9 523 198 cabezas(4), las que se distribuyen en mayor porcentaje en la región Sierra, seguido de la costa y la selva. Los principales productos que se obtienen son lana y carne. La producción nacional de lana alcanza los 10 946 Tm. y la de producción de carne llega a 36 122 Tm. anuales respectivamente(25).

La disminución de los precios reales de lana y carne a nivel del productor, la insuficiente asistencia técnica, la despoblación del sector rural, el bajo nivel tecnológico y el uso inadecuado de los recursos naturales (pastos y agua), son problemas que muy a menudo se presentan, que a pesar de esto, la tendencia de la población, la producción de la lana y carne es levemente creciente(25).

La crianza de ovinos se encuentra concentrada principalmente a nivel de pequeños productores en sistemas extensivos, basados en la alimentación con pastos naturales en las zonas altoandinas, y con residuos de cosechas y malezas a nivel de los valles costeros, interandinos y de las vertientes. A nivel de la crianza familiar, predomina el ovino Criollo, con buena rusticidad pero bajos niveles

productivos de lana y carne. El sobrepastoreo es un problema muy común en estas crianzas(26).

Sin embargo, existen un grupo de empresas campesinas que han logrado un aceptable nivel tecnológico y rebaños de mayor tamaño que en las crianzas familiares, que le permiten manejar una economía de escala. Así tenemos a la SAIS Pachacutec y la SAIS Tupac Amaru en la zona centro (26).

### **Ovinos y Razas en el Perú**

La crianza ovina en el Perú tiene importancia económica, social y ecológica. La importancia ecológica radica en que el 79.9% de la población ovina se cría en la sierra alimentándose con pastos naturales que crecen en campos no aptos para la agricultura(27).

En el Perú, la ovinocultura tiene una importancia económica sino es mayor por lo menos igual que la bovinocultura. Los ovinos pueden pastorearse conjuntamente con los vacunos sin que exista competencia por el alimento, debido a la diferente forma de aprehensión del pasto, los vacunos prefieren los pastos altos, mientras que los ovinos los pastos bajos, lo que permite elevar la productividad de la tierra hasta en un 25% sin afectar la condición de las pasturas. Los ovinos aprovechan eficientemente los subproductos de la agricultura (rastros de cosecha) que en su mayoría son alimentos fibrosos que sólo los rumiantes, como los ovinos, pueden convertir en carne, lana, pieles y leche para el uso del hombre(27).

### **Ovino Criollo**

Ovino formado de la descendencia de los ovinos traídos por los españoles durante el siglo XVI, se encuentra a nivel de los valles costeros, interandinos y la vertiente oriental, así como en las zonas altoandinas a nivel de crianzas familiares. Su principal característica es ser una raza de fenotipo muy variado, alta rusticidad y mediana prolificidad.

Es de bajo nivel productivo de lana y carne. Se han reportado valores promedio de peso de vellón de 1,5 kg. peso vivo de 27 kg. para ovejas y 35 kg. para carneros. Actualmente se constituye la raza ovina de mayor población en el país(25).

### **Ovino Corriedale**

Originario en Nueva Zelanda. Aptitud de doble propósito para producción de lana y carne. Presenta una calidad de lana que varía de 24 a 31 micras de diámetro de fibra, considerada como lana de finura media, longitud de mecha de 8,8 a 15 cm, buen grado de rizamiento, brillo y color.

El vellón varía entre 4 a 6,4 kg. Además posee una buena conformación muscular, fortaleza, rusticidad y pigmentación negra a nivel de los ollares, labios y pezuñas. A edad adulta el carnero llega a pesar entre 79 y 125 kg y la oveja entre 59 y 82 kg, dependiendo del sistema de alimentación. De acuerdo a sus características reproductivas puede ser considerada de prolificidad baja y poliestrica estacional. Se encuentra muy difundida a nivel de las principales ganaderías ovinas de los departamentos de Junín, Pasco y Puno(25).

### **Ovino Junín**

Raza Peruana formada en el Departamento de Junín, a partir del año 1955. Aptitud de doble propósito, lana y carne, pero de vellón más fino que el Corriedale. Muestra gran adaptación al pastoreo en las praderas nativas altoandinas.

Además presenta una buena precocidad, conformación muscular, gran alzada, fortaleza, pecho amplio y profundo que resaltan su habilidad carnífera. Presenta una cabeza fuerte, cara limpia, extremidades largas y fuertes, pero variado grado de pigmentación en los ollares y pezuñas. El 80% de los vellones Junín varían en un rango de 23 a 25 micras de diámetro de fibra, y el peso de vellón varía entre 3 a 5,6 kg. A edad adulta los carneros alcanzan un peso vivo de 74 kg y las ovejas de 45 kg, en condiciones de alimentación con pastos naturales. Actualmente el núcleo genético de esta raza se encuentra en la SAIS Tupac Amaru del Departamento de Junín(25).

### **Ovino Hampshire Down**

Originaria de Inglaterra, perteneciente al grupo de razas de cara negra. Es una raza especializada en la producción de carne, pero las carcasas presentan un alto contenido graso.

Por ello los carneros de esta raza son utilizados para la cruce industrial con ovejas Corriedale y Junín, para la producción de corderos en sistemas de

alimentación con pasto cultivado. Son animales muy pesados, los carneros alcanzan entre 100 a 135 kg y las ovejas de 70 a 90 kg de peso corporal. Presentan un alto índice de crecimiento, pero a la vez exigen buenas condiciones de alimentación como suplementación con concentrados y alimentación con pastos cultivados para expresar su potencial carnicero. Se encuentra difundida a nivel de las zonas altoandinas de los departamentos de Junín, Cerro de Pasco, Puno y en los valles de los departamentos de Arequipa, Moquegua y Tacna(25).

### **Ovino Black Belly**

Raza de ovino de pelo originaria de la isla de Barbados en América Central. Se caracteriza por su buena prolificidad, poliestricidad anual y precocidad reproductiva.

Sin embargo carece de aptitud lechera y conformación cárnica. Los carneros presentan un peso vivo entre 50-55 kg y las ovejas entre 40 a 45 kg. Las ovejas son multíparas presentando un 20% de partos simples, 40% de partos dobles y 30% de partos triples. Se encuentra muy difundida a nivel de la Selva, Costa Norte y Centro del Perú(25).

### **Ovino Assaf**

Ovino originario de Israel, de aptitud cárnica y producción lechera. Presenta características de prolificidad media y poliestrica estacional. Fue introducida al Perú con el fin de utilizarla en la formación de la raza Assblack. Las ovejas presentan una ubre con buen desarrollo, en la cual se produce de 3,1 a 3,3 litros/día durante 120 días. La leche contiene un alto porcentaje de grasa (5,7%) y sólidos totales (17,8%), resultante en un alto rendimiento quesero. Se caracteriza por presentar una cabeza de perfil convexo, orejas largas y colgantes, vellón grueso y color variado, una cola gruesa en su base debido a que contiene una reserva de grasa. Presenta una buena conformación muscular, de cuerpo largo, ancho y profundo. Se pueden ubicar ejemplares puros de Assaf en la Universidad Nacional Agraria La Molina y en el rebaño de Rigoranch(25).

### **Ovino Asblack**

Raza sintética en proceso de formación en el Perú. El grado de sangre que se busca estabilizar es el de 1/4 BBB y 3/4 ASSAF. Esta raza pretende reunir las

características de habilidad materna, producción de leche y conformación cárnica del Assaf con las de poliestricidad y prolificidad del BBB, resultando en un ovino capaz de ser utilizado en la producción intensiva de carne de cordero(25).

### **Caracterización de Recursos Zoogenéticos**

La caracterización de los recursos zoogenéticos comprende todas las actividades asociadas con la identificación, descripción cuantitativa y cualitativa, y documentación de las poblaciones de la raza, así como su hábitat natural y los sistemas de producción a los que están o no adaptados. El objetivo es obtener un mejor conocimiento de los recursos zoogenéticos, de su uso actual y potencial futuro en la alimentación y la agricultura en entornos definidos, y su estado actual como poblaciones de razas diferenciadas(1).

### **Herramientas de Caracterización**

#### **1. Encuestas**

Se hacen encuestas para recoger de manera sistemática los datos necesarios para identificar las poblaciones de una raza y describir sus características observables, distribución geográfica, usos y crianza en general, así como los entornos productivos. Las encuestas base se realizan una vez, pero algunos elementos de la encuesta pueden repetirse si se observan cambios significativos en el sector agropecuario. En las encuestas sobre recursos zoogenéticos se estudian diez variables, que incluyen información básica y avanzada de las poblaciones de razas, usos principales de la raza, origen y desarrollo/evolución de la raza, características morfológicas típicas, niveles medios de rendimiento, caracteres especiales, y actividades de conservación en marcha(1).

#### **2. Seguimiento**

Hay que documentar regularmente los cambios en tamaño y estructura poblacional en todas las razas. Ello debe realizarse de manera anual o bienal, dado que la aplicación de las tecnologías modernas de reproducción, el comercio mundial, las exigencias del mercado, así como las políticas que favorecen a determinadas razas, pueden conducir a cambios rápidos en el tamaño y estructura de las poblaciones de estas.

El seguimiento debe realizarse al menos una vez por generación de la especie, sobre todo en las razas clasificadas como en riesgo o potencialmente en riesgo. Ello requiere encuestas a intervalos de unos ocho años para caballos y asnos, cinco años para ganado bovino, búfalos, ovejas y cabras, tres años para cerdos y dos años para especies aviarias.

### **3. Caracterización Genética Molecular**

La caracterización genética molecular explora polimorfismos en determinadas moléculas proteicas y en marcadores de ADN para medir la variación genética a nivel poblacional. Debido al bajo nivel de polimorfismo observado en las proteínas, lo cual conduce a una aplicabilidad limitada en los estudios de diversidad, son los marcadores de los polimorfismos a nivel de ADN los escogidos para la caracterización genética molecular.

La caracterización genética molecular se realiza fundamentalmente para explorar la diversidad genética dentro de una población y entre distintas poblaciones animales, y para determinar relaciones genéticas entre ellas. Más específicamente, los resultados de los estudios de laboratorio sirven para:

- Determinar los parámetros de diversidad dentro de una raza y entre razas.
- Identificar las localizaciones geográficas de determinadas poblaciones y/o mezclas entre poblaciones de orígenes genéticos distintos.
- Proporcionar información sobre relaciones evolutivas (árboles filogenéticos) y determinar centros de origen y rutas migratorias.
- Iniciar actividades de cartografía génica, incluyendo la identificación de portadores de genes conocidos.
- Identificar relaciones de parentesco y genéticas dentro de las poblaciones.
- Apoyar la mejora genética de las poblaciones de animales mediante el uso de los marcadores.
- Calcular el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ).

## **Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética**

La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable, y cada individuo de una especie, a excepción de los gemelos monocigóticos, posee una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido - SNP), inserción o delección de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN. Las variaciones del ADN se clasifican como neutras, cuando no originan cambios en los caracteres metabólicos o fenotípicos, y por consiguiente no están sometidas a selección positiva, negativa o de reequilibrio; en caso contrario, se denominan funcionales. Las mutaciones en nucleótidos clave de una secuencia codificadora pueden alterar la composición de aminoácidos de una proteína, y conducir a nuevas variantes funcionales. Dichas variantes pueden tener una mayor o menor eficiencia metabólica comparadas con el tipo nativo original, pueden perder completamente su funcionalidad, o incluso adquirir una función nueva. Las mutaciones en las regiones reguladoras pueden afectar a los niveles y las pautas de expresión génica; por ejemplo, activar o desactivar genes, o sobreexpresar o infraexpresar proteínas en tejidos concretos en distintos estadios del desarrollo o en distintos estados fisiológicos.

Las técnicas moleculares más importantes que se están utilizando y desarrollando actualmente para evaluar la diversidad genética y para estudiar la variación funcional son:

- **RFLP**

Los polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP) se identifican usando enzimas de restricción que parten el ADN únicamente en puntos o sitios de restricción precisos (p. ej., EcoRI corta en el sitio definido por la secuencia palindrómica GAATTC). Actualmente, el uso más frecuente de los RFLP es en combinación con la PCR (PCR-RFLP), para

detectar alelos que difieren en secuencia en un sitio de restricción concreto. Primero se amplifica un fragmento de gen con la PCR, y luego se expone a un enzima de restricción específico que corta solamente una de las formas alélicas. Los amplicones digeridos suelen resolverse mediante electroforesis.

- SNP

Los SNP son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN en la región. Existen SNP en todo el genoma. Son muy abundantes en el genoma humano, a razón de un SNP por cada 1000 pares de bases. La mayoría de SNP se localizan en las regiones no codificantes, y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), y pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen el potencial de detectar la variación genética funcional.

- AFLP

Los polimorfismos por ampliación de la longitud del fragmento (AFPL) son una técnica de identificación del ADN que detecta fragmentos de restricción de ADN mediante amplificación con PCR.

- Microsatélites

Actualmente, los microsatélites son marcadores más populares en los estudios de caracterización genética del ganado. Su alta tasa de mutación y naturaleza codominante permiten la estimación de la diversidad genética dentro y entre razas, así como la mezcla genética entre razas incluso si están estrechamente emparentadas.

### **Microsatélites.**

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas dos a 10 pares de bases.,(28).

Los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos(29).

Cuando se encuentran fuera de regiones codificantes, los microsatélites suelen considerarse como regiones génicas sin función alguna. Sin embargo, se ha propuesto que en ciertos genes las regiones repetidas del extremo 5' no transcrito tienen una función reguladora y actúan como regiones de unión para factores de transcripción. También se ha propuesto que los microsatélites son regiones con alta frecuencia de recombinación. El elevado polimorfismo de los microsatélites se atribuye a dos mecanismos de mutación: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (*slippage misspairing*) y el entrecruzamiento desigual (*unequal crossing over*)(30).

Los microsatélites han tomado ventaja sobre los otros marcadores genéticos, debido a que: i) tienen el más alto grado de polimorfismo; ii) segregan de manera mendeliana y son codominantes; iii) la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y iv) son selectivamente. Además, para trabajar con STR es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para contar con cebadores específicos que amplifiquen la región repetitiva (el microsatélite) responsable de la variación observada, que además es homóloga para diferentes especies o incluso géneros. Los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo(29).

### **Tipos de Microsatélites.**

De acuerdo con Alcántara(29), menciona que son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos  $(TT)_n$ , dinucleótidos  $(AT)_n$ , o tetranucleótidos  $(AAGG)_n$ ., además de su definición en función de la cantidad de nucleótidos que se repiten, también se les puede clasificar en:

- a) Microsatélites perfectos o puros: repeticiones en un número mínimo de unidades sin interrupción y sin repeticiones adyacentes (CACACACACACACACACA) ó (CA)<sub>10</sub>(31).
- b) Microsatélites compuestos: dos o más repeticiones con un número mínimo de unidades repetidas ininterrumpidas (CACACACAGAGAGAGA) ó (CA)<sub>4</sub>(GA)<sub>4</sub>(31).
- c) Microsatélites interrumpidos: repeticiones ininterrumpidas con un número mínimo de repeticiones y separadas por un máximo de cuatro pares de bases (CACACACACATTTACACACA) ó (CA)<sub>5</sub>TTT(CA)<sub>4</sub>(31).

### **Medición de la Variabilidad Genética**

Existe una gran diversidad de estadísticas para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables. Los estadísticos más empleados son: número medio de alelos por locus, la heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) y observada ( $H_O$ ), equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), índice de contenido de polimórfico (PIC), presencia de alelos nulos(32).

- **Número Medio de Alelos**

Esta estadística indica el número medio de alelos que presenta un locus en una población. Sin embargo, dicha medida depende mucho del número de individuos analizados, ya que cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios. No obstante, este estadístico es útil para estudiar la existencia de variabilidad críptica en los loci(32).

- **Frecuencia alélica**

Es la proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población.

$$P(A) = [2(AA) + (Aa)]/2x$$

Siendo “AA” número de genotipos homocigotos con ese alelo; “Aa” número de genotipos heterocigotos con ese alelo y “x” es el número total de individuos en la muestra(32).

- **Número de alelos efectivos**

Se define como la probabilidad de que dos alelos de un locus elegido al azar en la población sean idénticos por descendencia(33), es decir, es la proporción de

alelos que tienen una mayor probabilidad de transmitirse a la siguiente generación. Esta probabilidad es igual al inverso de la frecuencia esperada de individuos homocigotos en la población y se calcula mediante la expresión:

$$N_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}$$

Dónde:  $p_i$  = frecuencia del i-esimo alelo en un locus

$H_e$  = heterocigosidad esperada en un locus

- **Alelos Nulos**

Se habla de alelos nulos cuando estos no pueden ser amplificados por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador. Uno de los alelos no amplifica y por lo tanto el individuo es catalogado como homocigoto para el otro alelo(34). La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja y cuando no se dispone de información genealógica fiable. Su determinación sería posible si se presentara en homocigosis, ya que no obtendríamos producto amplificado de un determinado individuo para ese *locus*.

En los casos de verificación de paternidades, podemos sospechar la presencia de alelos nulos en un marcador cuando todos los demás marcadores apuntan a un progenitor y sin embargo, es homocigoto para ese marcador excluyente, siendo el descendiente homocigoto para ese marcador para uno de los alelos parentales. Un alelo nulo podría llevarnos a interpretaciones erróneas y excluir a estos animales como posibles progenitores en un análisis de paternidad, además de sesgar las estimaciones de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Otra manera para detectar la presencia de alelos nulos sería a partir del cálculo del déficit de heterocigotos para el equilibrio Hardy-Weinberg(35).

Para solucionar el problema de los alelos nulos se pueden diseñar cebadores alternativos fuera del punto de mutación y volver a analizar los individuos clasificados como homocigotos. Asimismo, esto se puede evitar no utilizando marcadores que han sido reportados como portadores de alelos nulos en ciertas poblaciones o razas, ya que pueden darnos problemas de esta índole(34, 36).

- **Heterocigosidad (H).**

Representa una mejor medida de la variación genética, ya que es precisa y no arbitraria. La heterocigosidad la podemos estudiar como  $H_O$  y  $H_E$ (32).

La  $H_O$  se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y se calcula por cómputo directo. Mientras que la  $H_E$ , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes(37). En una población en equilibrio H-W, la frecuencia de los heterocigotos viene dada por la ecuación  $2pq$ .

El cálculo de la  $H_E$  en la población puede realizarse a través de:  $H_E = 1 - \sum p_i^2$  siendo  $p_i^2 =$  (homocigosidad) o también su equivalente:  $H_E = \sum p_i (1 - p_i)$  siendo este término también conocido como diversidad génica de Nei(38).

La  $H_E$  es un buen estimador de la variabilidad, dado que se aplica a cualquier especie, independientemente de su estructura reproductiva o genética, pudiéndose por tanto realizar comparaciones entre ellas(39).

- **Equilibrio Hardy-Weinberg (H-W)**

La ley de Hardy-Weinberg(40, 41), representa a una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación y migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación y, además, existe una relación simple entre ambas. Así, una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio H-W.

Cuando la población se desvía de manera significativa de estas proporciones se habla de desequilibrio H-W, y se puede medir mediante el índice de fijación  $F$  de Wright(42), el cual se expresa para un *locus* cualquiera como:

$$F = (H_E - H_O) / (H_E);$$

Siendo  $H_E$  y  $H_O$  la heterocigosidad esperada y observada para ese *locus*, respectivamente. Cuando el índice de fijación  $F$  es igual a cero se indica que la población está en equilibrio; mientras que, si  $F$  es diferente de cero, ya sea en forma positiva o negativa, indicaría que existe un déficit o exceso de heterocigotos, respectivamente.

- **Índice de Contenido Polimórfico (PIC)**

El PIC es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo(43).

$n-1$

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

$i=1$   $j=i+1$

Donde  $p_i \dots p_n$  son las frecuencias de los  $n$  alelos.

**Análisis de Índice de Endogamia y la Estructura Genética Poblacional.**

Existe una serie de estadísticos para determinar el índice de endogamia y la estructura de las poblaciones que se están estudiando, como para establecer las relaciones genéticas entre las mismas. Estos estadísticos son: Estadísticos F de Wright(42) y su análogo R de Slatkin(44), el análisis de varianza molecular o AMOVA, matrices de distancia, y modelos basados en técnicas bayesianas(45).

- **Estadísticos F**

Para los estudios de la estructura de la población los análisis de la F-estadística han mostrado ser una herramienta útil para dilucidar los patrones y extraer la variación genética residente entre y dentro de las poblaciones. Según estos estadísticos, la variabilidad de una población global puede ser subdivida entre sus subpoblaciones(46).

Wright(42) definió tres F-estadísticas:  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$ , como correlaciones entre unidades gaméticas en la población a diferentes niveles. Los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  explican las correlaciones entre dos unidades gaméticas tomadas al azar de una subpoblación y del total de la población como un todo respectivamente; y nos indica el exceso o déficit de heterocigotos presentes; mientras que el  $F_{ST}$  es la correlación entre dos gametos tomados al azar de cada una de las subpoblaciones y mide el grado de diferenciación genética entre dos subpoblaciones. Estos parámetros se relacionan a través de la siguiente expresión:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) \cdot (1 - F_{ST}) \dots\dots\dots(1)$$

Pudiéndose inclusive en algunos casos extender el análisis a niveles jerárquicos adicionales dentro de la población, y en casos de análisis de variabilidad genética intraracial, subdividiendo las razas en subpoblaciones, hasta dos niveles jerárquicos, por lo que la ecuación (1) extendida sería:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) \cdot (1 - F_{SC}) \cdot (1 - F_{CT})$$

Donde  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$  miden el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones dentro de razas y dentro de las subpoblaciones, respectivamente(32).

El estadístico  $F_{IT}$  es la correlación relativa a la población total o índice de fijación de los individuos respecto al total de la población, o desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total respecto a las esperadas considerando que existe equilibrio Hardy-Weinberg. Si la población total se encuentra en panmixia (individuos con igual probabilidad de cruzarse) el valor sería 0.

El estadístico  $F_{IS}$  es la correlación entre dos alelos, relativa a la subpoblación o el exceso o déficit de heterocigotos que podría ser entre individuos de la misma subpoblación y este parámetro puede variar entre -1 a 1. Valores negativos de  $F_{IS}$  indican exceso de heterocigotos en la población respecto a las proporciones esperadas de equilibrio de Hardy Weinberg y valores positivos indican déficit de heterocigotos.

El estadístico  $F_{ST}$  es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de cada subpoblación. Ha sido interpretado como el grado de diferenciación genética o flujo genético entre las poblaciones denominándose, índice de diferenciación genética y su valor varía de 0 a 1 y a diferencia del  $F_{IS}$  y el  $F_{IT}$ , no puede ser un valor negativo(47). Un valor de cero indica que las frecuencias alélicas son iguales en las poblaciones analizadas y por el contrario, un valor de 1 demuestra que las frecuencias alélicas están fijadas y son diferentes en las poblaciones. Valores de 0,00 y 0,05 se consideran bajos, 0,05 y 0,15 indican diferenciación genética moderada y un rango de 0,15 y 0,25 señalan que la diferenciación es alta y valores superiores a 0,25 la diferenciación es muy alta(48).

Cabe destacar que la idea inicial de Wright se aplicaba al análisis de un solo locus y un par de alelos neutrales y número infinito de subpoblaciones aunque existe controversia en la forma de calcularlos, de ahí que Weir y Cockerham(49) incluyen los parámetros  $F$ ,  $\theta$  y  $f$  que corresponden con los estadísticos  $F$  de Wright:  $F = F_{IT}$ ,  $\theta = F_{ST}$  y  $f = F_{IS}$ .

Por otro lado, la diferenciación genética se ve condicionada por la tasa de migración ( $N_m$ ) de manera que cuando hay un mayor flujo genético entre dos poblaciones, menor será la diferenciación entre ellas. Existe una relación entre la  $F_{ST}$  y el  $N_m$  expresada mediante la ecuación descrita por Wright(50).

De esta manera un flujo que supera el valor de 1 sería suficiente para que no se considere como poblaciones diferentes, según Wright y valores por encima de 2 serían suficientes para contrarrestar los efectos de la deriva. Si el valor de  $N_m$  es muy bajo, predomina el efecto de la deriva y la mayoría de las poblaciones estarán fijadas. Si  $N_m$  es grande, la deriva genética será poco importante y contrarrestada por la migración; por tanto, las subpoblaciones tenderán a mantener las mismas frecuencias génicas(51).

- **Estadístico R**

$R_{ST}$  un análogo de  $F_{ST}$ , brinda un enfoque para estimar niveles de diferenciación genética con datos de microsatélites.

Debido a que lo microsatélites está basado en el SMS (*Stepwise Mutation Model*), el cual permite estimar las relaciones entre individuos y su estructura poblacional. Slatkin(44), ideó una estadística explícitamente basado en este modelo de mutación, mostró que la  $R_{ST}$  se puede definir como sigue:

$$R_{ST} = \frac{(S - S_w)}{S}$$

Donde  $S$  y  $S_w$  son los promedios al cuadrado de la diferencia de los tamaños de alelos entre los pares de alelos dentro de las poblaciones y entre los pares de poblaciones(52).

- **AMOVA**

El análisis de varianza molecular (AMOVA) fue concebido inicialmente, como una extensión del análisis de frecuencias génicas(49, 53), particularmente en sistemas haploides.

La entrada de datos en AMOVA, consiste en una matriz con pares de distancias de tipo euclidianas entre múltiples haplotipos y archivos que contienen las frecuencias de esos haplotipos entre cada población. Este mismo sistema puede ser utilizado para organismos diploides. Bajo la particular definición de distancias entre haplotipos, el AMOVA también puede ser aplicado en datos de microsatélites(54), para obtener un estadístico análogo al Rst de Slatkin(44). El AMOVA, también provee el marco general para el análisis de la estructura genética de una población, bajo el supuesto de que la evolución de un polimorfismo se encuentra dentro de la definición de una distancia Euclidiana sin afectar la estructura del análisis.

Puede existir diferenciación genética, cuando hay un fraccionamiento de una población original en subpoblaciones aisladas. La heterocigosis de éstas subpoblaciones, disminuye respecto a la población inicial y con un tamaño menor y la erosión genética empujaría hacia una fijación más rápida de alelos diferentes que las que podrían ocurrir en una población más grande. Este pudo ser el caso de las poblaciones criollas en América.

El AMOVA trata cualquier tipo de dato como un vector booleano  $\mathbf{p}_i$ , que es una matriz  $1 \times n$  de 1's y 0's, siendo 1 presencia de marcador y 0 ausencia de marcador(55). Se calculan las distancias Euclidianas entre todos los pares de vectores sustrayendo los vectores booleanos de un alelo a otro de acuerdo a la fórmula  $(\mathbf{p}_i - \mathbf{p}_k)$  y luego se construyen matrices y submatrices correspondientes a la subdivisión dentro de la población. Estas matrices presentan un arreglo tal que la submatriz de la diagonal de la matriz mayor son pares de individuos de la misma población mientras que aquellas fuera de la diagonal representan pares de individuos de poblaciones diferentes. La suma de las diagonales de las matrices y submatrices produce una suma de cuadrados de varios niveles jerárquicos de la población. Esta suma de cuadrados puede ser entonces analizada en un análisis de

varianza anidado. Un ANOVA anidado difiere del ANOVA simple en que los datos son arreglados jerárquicamente y los cuadrados medios son calculados, agrupándolos en todos los niveles de la jerarquía. Esto permite a la prueba de hipótesis, entre grupos y dentro de grupos diferenciar, los distintos niveles de las jerarquías.

En el estudio de variabilidad entre genotipos, los estadísticos F se pueden calcular según  $F_{CT}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{SC}$  de la siguiente manera:

$$F_{CT} = \sigma^2_a / \sigma^2 \text{ permutaciones dentro de grupos.}$$

$$F_{SC} = \sigma^2_b / \sigma^2_b + \sigma^2_c \text{ permutaciones entre poblaciones y dentro de grupos}$$

$$F_{ST} = \sigma^2_a + \sigma^2_b / \sigma^2 \text{ permutaciones entre poblaciones y entre grupos.}$$

**Tabla 1:** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Cuadrado Medio Esperado
Entre Grupos	P-1	SSD(AP)	SSD(AP)/(P-1)	$\sigma^2_{u'} + n' \sigma^2_a$
Entre individuos dentro de Poblaciones	2N-P	SSD(WP)	SSD(WP)/2N-P	$\sigma^2_{u'}$
Total	2N-1	SSD(T)		

g.l.=grados de libertad, P=número de grupos, N=cantidad de individuos, SSD=suma de cuadrados, AP=entre grupos, WP=entre individuos dentro de grupos y T=total.

### 2.3. Hipótesis

#### 2.3.1. Hipótesis Específicas.

- $H_{11}$  = Existe alta variabilidad genética en la población de ovinos criollos de Huancavelica.
- $H_{12}$  = Existe alto grado de endogamia en las poblaciones de ovinos criollos de Huancavelica.
- $H_{13}$ =Existe diferenciación genética entre las subpoblaciones de Huancavelica.

## 2.4. Variables de Estudio

Caracterización molecular

- Variabilidad genética
  - ✓ Número de alelos
  - ✓ Número efectivo de alelos
  - ✓ Alelos privados
  - ✓ Frecuencia de alelos
  - ✓ Alelos Nulos
  - ✓ Heterocigosidades
  - ✓ Contenido de información polimórfica (PIC)
  - ✓ Equilibrio Hardy-Weinberg
- Índice de endogamia
  - ✓ Estadístico  $F_{IT}$
- Estructura Poblacional
  - ✓ Estadísticos  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$
  - ✓ AMOVA

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

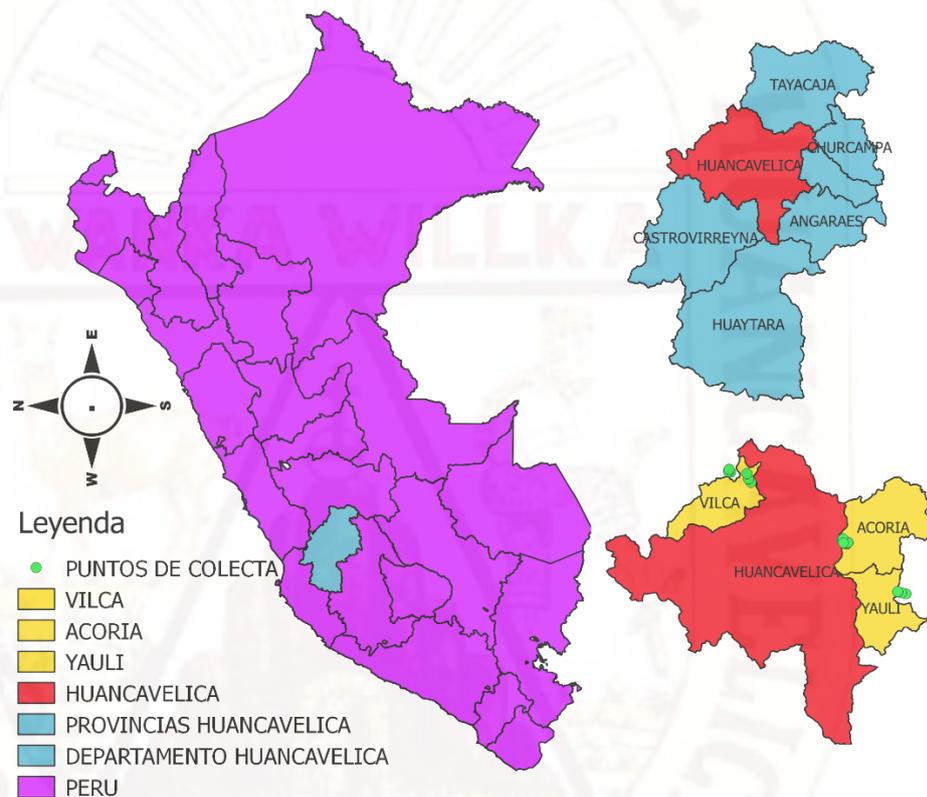
### 3.1. Ámbito de Estudio

La recolección de muestras se realizó en:

DEPARTAMENTO : Huancavelica

PROVINCIA : Huancavelica

DISTRITOS : Vilca, Yauli y Acoria



**Figura 1:** Ubicación de las localidades muestreadas en la provincia y departamento de Huancavelica (2016). Mapa elaborado por software QGIS 2.1813.

Fase de análisis y recolección de datos se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

**3.2. Tipo de Investigación:** Básico

**3.3. Nivel de Investigación:** Descriptivo

**3.4. Método de Investigación:** Inductivo

Las ciencias se inician con observaciones individuales, a partir de las cuales se plantean generalizaciones cuyo contenido rebasa el de los hechos observados en un principio. Las generalizaciones permiten hacer predicciones cuya confirmación las refuerza, y cuyo fracaso debilita tales predicciones, y puede obligar a, modificarlas o hasta rechazarlas. El método inductivo acepta la existencia de una realidad externa y postula la capacidad del ser humano para percibirla por medio de sus sentidos y entenderla por medio de su inteligencia. Usaron este método Aristóteles y sus comentaristas medievales, Francis Bacon, Galileo, Newton, Locke, Hershel, Mill, los empiristas, los positivistas lógicos, los operacionalistas y los científicos contemporáneos en general(56).

**3.5. Diseño de Investigación:** No experimental.

**M→O**

Muestra-Observación

**3.6. Población, Muestra, Muestreo**

**Población:** El departamento de Huancavelica cuenta con una población de 584 031 cabezas de ovinos criollos. La provincia de Huancavelica cuenta con un aproximado de 192 730 ovinos criollos(4). (Anexo 1).

**Muestra:** se colectaron muestras de 113 ovinos en total de 3 distritos de la provincia de Huancavelica

**Tabla 2:** Número de animales muestreados por Distrito en la provincia de Huancavelica, Región Huancavelica

DISTRITO	N° DE ANIMALES
VILCA	51
YAULI	20
ACORIA	42

Según Hale *et al*(57) y Danusevicius *et al*(58), la cantidad ideal de muestras por población para estudios genético poblacionales o para estimar los parámetros de

variabilidad y estructura genética en animales y plantas varía entre 20 y 30 por población, condición que cumplen los distritos de distritos de Vilca (n=51), Acoria (n=42) y Yauli (n=20).

**Muestreo:** El tipo de muestreo fue al azar.

### 3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

#### ➤ Fase de campo:

Técnicas en campo

- **Extracción de sangre mediante la técnica de punción yugular:**

Las venas yugulares recorren el largo del cuello de los animales a ambos lados. Es un sitio de extracción ideal para mamíferos (salvo casos excepcionales como suidos, mamíferos marinos, etc.) y también para aves grandes (patos) y medianas (perdices)(59).

**Mamíferos:** Haga presión sobre la parte inferior del cuello con el dedo pulgar de una mano y palpe la vena. Mantener el cuello del animal extendido e inmóvil facilita las maniobras. Canalice la vena con la aguja y extraiga el volumen de muestra deseado. Presione suavemente sobre la herida para evitar el sangrado y posterior hematoma(59).

Instrumentos en campo

- Tubos Falcon con anticoagulante
- Aguja hipodérmica
- Alcohol
- Tintura de yodo
- Algodón
- Registros

#### ➤ Fase de Laboratorio

Técnicas de laboratorio (Técnicas estandarizadas en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Instituto de Innovación Agraria - INIA)

- Extracción de ADN (Sambrook y Russell)
- Calidad y cuantificación del ADN (Sambrook y Russell)
- Amplificación de secuencias específicas de ADN por PCR multiplex (Mullis)
- Análisis genético mediante electroforesis por capilares.

#### Instrumentos de laboratorio

- Micropipeta
- Tubos de 1.5 y 2 mL.
- Equipo Epoch
- Cámara electroforética horizontal
- Fotodocumentador
- Termociclador
- Analizador genético ABI 3130XL

### **3.8. Procedimiento de Recolección de Datos**

Los procedimientos llevados a cabo para la recolección y análisis de datos de las poblaciones de ovinos estudiados empleando marcadores microsatélites, se dividieron en dos fases: Fase de campo y Fase de Laboratorio.

#### **3.8.1. Fase de Campo**

La toma de muestras de sangre se realizó en los distritos de Vilca, Yauli y Acoria de la provincia y departamento de Huancavelica.

El procedimiento consistió en los siguientes pasos.

- Se tomaron los datos respectivos de cada animal muestreado (Anexo 3), que comprendieron: sexo (macho o hembra), color de capa, edad (años), código del animal, propietario del animal y coordenadas de colecta.
- Se sujetó a cada individuo, se tomó una muestra de sangre periférica a nivel del cuello (vena yugular) en tubos tipo falcón de 15ml. que contenían 500µl EDTA al 2% (Anexo 4)
- Las muestras de sangre (7ml) fueron guardadas a temperatura ambiente (sin que se exponga a la luz solar directamente). A su llegada al laboratorio, fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento y su posterior extracción de ADN.

#### **3.8.2. Fase de Laboratorio**

Para el análisis de microsatélites específicos en esta especie. Se utilizaron 11 marcadores microsatélites (Tabla 3), reportados en artículos internacionales.

**Tabla 3:** Lista de Marcadores Microsatélites empleados en el estudio

PRIMER	CROMOSOMA	TIPO DE REPETICIÓN	SECUENCIA	TAMAÑO	FLUOROFORO	FUENTE
BM1258	20	di	Forward: GTATGTATTTTTCCCACCCTGC Reverse: GAGTCAGACATGACTGAGCCTG	98-130	NED	Di Stacio, L.(60)
BM1818	20	di	Forward: AGCTGGGAATATAACCAAAGG Reverse: AGTGCTTTCAAGTCCATGC	258-284	HEX	Di Stacio, L.(60)
CSR247	14	di	Forward: GGAAGTCCAGAACTCTGCAAT Reverse: CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG	205-261	HEX	Alfonso <i>et al</i> (61)
HSC	20	di	Forward: CTGCCAATGCAGAGACACAAGA Reverse: GTCTGTCTCCTGTCTTGTGCATC	263-301	FAM	Alfonso <i>et al</i> (61)
INRA63	14	di	Forward: ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC Reverse: AAACCACAGAAATGCTTGAAG	167-217	FAM	De Gortari(62)
MAF65	15	di	Forward: AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG Reverse: CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	123-145	FAM	Alfonso <i>et al</i> (61)
McM527	5	di	Forward: GTCCATTGCCTCAAATCAATTC Reverse: AAACCACTTGACTACTCCCAA	158-160	NED	Di Stacio, L.(60)
OarAE129	5	di	Forward: AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG Reverse: GTAGATCAAGATATAGAATATTTTTCAACACC	135-161	NED	Di Stacio, L.(60)
OarCP49	17	di	Forward: CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC Reverse: GTGGGGATGAATATTCCTCATAAGG	74-140	HEX	Alfonso <i>et al</i> (61)
OarFCB20	2	di	Forward: GGAAAACCCCATATATACCTATAC Reverse: AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG	87-119	FAM	Alfonso <i>et al</i> (61)
OarFCB304	19	di	Forward: CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG Reverse: CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	146-192	HEX	Buchanan, F.C.(63)

di= di nucleótido

**i. Procesamiento de las muestras**

La extracción de ADN de las 113 muestras sanguíneas se realizó a partir de glóbulos blancos utilizando el protocolo de Sambrook y Rusell(64); modificado por el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica – INIA, como se detalla a continuación:

**Obtención de linfocitos:**

Día 1: Partiendo de sangre se realizaron seis o siete lavados sucesivos con la solución tampón salino TE 20:5 (Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM, pH=8 y completar con agua Mili Q), hasta obtener células blancas.

**Extracción de ADN:**

Una vez obtenido las células blancas se adiciona tampón salino TE 20:5 500 µL, 75 µL de detergente (SDS 10%) y 15 µL de Proteinasa K.

Posteriormente, se procedió a la incubación durante 3 horas a 56°C 1000 rpm. al finalizar se agregó 500 µL de Acetato de K 3M (vortex), se refrigeró por 10 min a -20°C para luego ser centrifugado por 15 minutos, 14000 rpm y 10°C, se separa el sobrenadante en dos tubos de 2 ml, agregar 500 µL de una mezcla de solventes orgánicos (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1) que sirvieron para separar el ADN de las proteínas y otros solventes orgánicos, la mezcla se agitó y centrifugó durante 15 min, 14000 rpm y 10°C. De este modo, se formaron tres fases, la primera fase contenida de ADN resuspendido, la cual se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y se le agregó isopropanol hasta 1.5 ml e invirtió suavemente hasta visualizar pellet, almacenar 30 minutos a -20°C, centrifugar 5 min, 14000 rpm y 10°C y se eliminó el sobrenadante por inversión, se agregó 300 µL de TE 20:5 y se almacenó a 4°C hasta el día siguiente.

Día 2: Se añadió 200 µL de acetato de potasio 3M (vortex), cloroformo isoamílico 24:1 500 µL, mezcló y centrifugó 15 min, 14000 rpm a 10°C, se separó el sobrenadante en dos tubos de 1.5 ml, luego se adicionó 800 µL de etanol absoluto, e invirtió suavemente hasta visualizar pellets y refrigerar 20 min a -20°C, luego se centrifugó por 5 min a 14000 rpm y 10°C, y se eliminó el sobrenadante por inversión, para luego adicionar 200 µL de TE 20:5, se disolvió el pellet y se adicionó 8 µL de NaCl (cloruro de sodio) 5M, se mezcló suavemente y se adicionó 420 µL

de etanol absoluto helado y se invirtió hasta visualizar pellets, se centrifugó 5 min a 14000 rpm y 10°C, y se eliminó el sobrenadante por inversión y adicionamos 400 µL de etanol al 70% helado, *finger vortex* hasta desprender el pellets y se centrifugó 5 min, 14000 rpm a 10°C, se eliminó el sobrenadante por inversión y adicionamos nuevamente 400 µL de etanol al 70% helado, repetimos el paso anterior hasta eliminar el sobrenadante por inversión, añadimos 400 µL etanol absoluto, *finger vortex*, y se asignó TE 10:1 según el tamaño de los pellets, se centrifugó y eliminanó el sobrenadante por inversión, luego se dejó secar a temperatura ambiente o en el concentrador de ADN durante 7 min a 60°C, se verificó que el tubo esté seco y se suspendió el ADN en TE 10:1 asignado previamente, y se almacenó a -20°C (Anexo 5 y Anexo 6).

## ii. **Cuantificación y Calidad de ADN**

Después de la extracción del ADN a partir de muestras de sangre, se procedió a cuantificarlo por medio de un espectrofotómetro de multiplacas (Epoch); el cual proporciona la lectura de absorbancia a 260nm y 280nm; también determina la relación 260/280 (calidad del ADN) y la concentración de ADN (ng/µl), para lo cual se agregó 2 µl del ADN extraído y se coloca en una placa cuya capacidad es de 16 muestras, en la cual se empleó el uso del tampón salino TE 10:1 como factor de corrección con el fin de no sesgar el resultado final.

Luego de cuantificar el ADN, se procedió a visualizar la calidad del ADN, mediante electroforesis horizontal. Para lo cual se preparó un gel de agarosa al 1% (0.5 gr de agarosa, 50 ml de *buffer* TE 1X (Tris base, Ácido bórico, EDTA 0.5M pH 8.0, Agua mili Q)). 2 µl de ADN fueron mezcladas con 6 µl de *buffer* de corrida Sal B 2X (Naranja G, Azul de Bromofenol, Xilencianol, Sucrosa y Gelred 2X), y fueron cargados en el gel y dejados correr a 120 V. por 20 min (Anexo 7 y Anexo 8).

## iii. **Amplificación de Microsatélites por PCR Multiplex**

La técnica en Cadena de Reacción de la Polimerasa (PCR) fue utilizada para la obtención de fragmentos deseados(65).

Los cebadores fueron estandarizados y agrupados en el laboratorio de biología molecular y genómica del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), con la finalidad de ser empleados en la técnica de PCR Multiplex, (multiplex 1: CSRD247,

HSC, OarAE129, MAF65, OarCP0049, OarFCB304; multiplex 2: BM1818, INRA63, BM1258, OarFCB20, McM527), estas se agruparon de acuerdo a su tamaño de pares de bases y a su temperatura de anillamiento. Cada uno de los cebadores fueron marcados con fluoróforos: azul (FAM), verde (HEX) y amarillo (NED). (Anexo 9, Anexo 10 y Anexo 11).

**iv. Análisis genético**

Los productos generados por la PCR fueron separados mediante electroforesis capilar utilizando el secuenciador ABI 3130XL. Para la identificación de alelos se empleó el marcador interno estándar de tamaño ROX y el programa GeneMapper. Cada una de las muestras analizadas contenía 9,75  $\mu$ L de Formamida, 0,25  $\mu$ L de y 1  $\mu$ L de productos de PCR, posteriormente esta mezcla fue sometido a un proceso de denaturación a 95°C alrededor de tres minutos e inmediatamente se produjo un choque termino a -20°C por alrededor de tres minutos, después fue llevado al analizador genético. (Anexo 12).

**3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos**

Los fragmentos fueron analizados con el programa GeneMapper v 4.0, para la asignación del tamaño de alelos. El programa permitió la visualización de los fragmentos en forma de picos las cuales se miden en URF (unidades de fluorescencia), cada uno de los picos representa el tamaño de alelos expresado en pares de bases (pb), los cuales son comparados con los picos de fluorescencia generados por el estándar de tamaño ROX. La matriz generada fue exportada a uno hoja de cálculo para los siguientes análisis.

**Variabilidad Genética**

La evaluación de la variabilidad genética a nivel molecular, es una herramienta para la conservación o mejoramiento genético de razas en distintas especies silvestres o domésticos.

Para evaluar la variabilidad genética de las subpoblaciones y la población total, se estimó el número de alelos, considerada como la cantidad de alelos diferentes expresados en un locus, el número de alelos depende mucho del tamaño poblacional, asegurando encontrar mayor probabilidad de alelos raros y muy raros en poblaciones grandes, este estadístico es útil para estudios de variabilidad en los

loci(32). Los siguientes indicadores a evaluar fueron: el número efectivo de alelos, quien representa la proporción de alelos que tienen una mayor probabilidad de transmitirse a una siguiente generación, alelos privados, alelos que se encuentran solo en algunas poblaciones y las frecuencias alélicas que fueron graficadas en barras, todos estos estadísticos arriba mencionados fueron estimados utilizando el software GenAEx 6.5(66). La presencia de alelos nulos, producto de la mutación de heterocigotos a homocigotos, fue estimada mediante el programa MICRO-CHECKER(67), el cual utilizó el método de simulación de Cadena de Monte Carlo Markov y cuatro algoritmos diferentes para identificación de frecuencias alélicas (Oosterhout, Chakraborty, Brookfield1 y Brookfield2), donde las frecuencias superiores a 0,1 indicaron la presencia de alelos nulos. La Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y Heterocigosidad esperada ( $H_E$ ), fue estimada mediante el software GenAEx 6.5(66). El índice de contenido polimórfico (PIC), fue estimada mediante el uso del software CERVUS 3.0.7(68), Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) calculada a partir del déficit y exceso de heterocigotos, con un P-valor $>0,05$  y realizando la prueba de corrección Bonferroni para los 11 loci, se consideró como hipótesis alterna al déficit y exceso de los heterocigotos para cada locus. para estimarla se empleó el software GENEPOP 4.6(69).

#### **Estadísticos F para índice de endogamia y estructura Genética**

Los estadísticos F de Wright se calcularon para medir el grado de endogamia utilizando los programas GenAEX 6(66), así como también con el software GENEPOP 4.6(69), y para estimar el estadístico  $F_{st}$  y  $R_{st}$  se empleó el uso del programa GenAEX 6(66) con una permutación de 9 999, al mismo tiempo se determinó el AMOVA para la población total. Se evaluó la estructura genética poblacional mediante el empleo del software STRUCTURE 2.3 (70), al cual se le asignó parámetros de longitud de *burn-in* (10 000), número de MCMC repeticiones antes de *burn-in* (100 000), se trabajó con una asignación de agrupamientos entre  $K=1$  y  $K=8$  con tres interacciones, los resultados generados fueron exportados al software en línea *Structure Harvester* 0.6(71) el cual mediante el método de Delta K, se obtuvo el mejor valor de K, el que finalmente representará la estructura de la población.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Presentación de Resultados

#### 4.1.1. Variabilidad Genética

- **Número de Alelos, Alelos Privados y Alelos Efectivos**

El número de alelos encontrados y el número de alelos efectivos ( $N_e$ ) es como sigue: Vilca, el locus que mayor variabilidad alélica presentó fue OarCP49 = 19 alelos y con un  $N_e = 10,55$ , seguido del BM1818 = 14 alelos y  $N_e = 8,74$ , el locus que menor cantidad de alelos presentó fue el OarAE129 = 2 alelos con un  $N_e = 2,73$ , en promedio el distrito de Vilca presentó  $10,73 \pm 1,27$  alelos por locus, y  $5,72 \pm 0,76$  número de alelos efectivos por locus, para el distrito de Yauli, el locus que mayor variabilidad alélica presentó fue el BM1818 = 12 alelos con un  $N_e = 7,48$ , seguido del OarCP49 = 11 y  $N_e = 6,11$ , el locus que menor variabilidad alélica presentó fue el OarAE129 = 2 con un  $N_e = 1,47$ , en promedio el distrito de Yauli presentó  $7,73 \pm 0,84$  alelos por locus, y un  $4,53 \pm 0,54$  alelos efectivos por locus, para el distrito de Acoria el locus que mayor variabilidad alélica presentó fue el locus OarCP49 = 15 alelos con un  $N_e = 8,54$ , seguido del locus BM1818 = 14 alelos con un  $N_e = 8,65$ , el locus que menor variabilidad alélica presentó fue el OarAE129 = 5 con un  $N_e = 2,11$ , juntamente con el locus BM1258 = 5 alelos con un  $N_e = 2,68$ , el promedio el distrito de Acoria presentó  $9,73 \pm 1,10$  alelos por locus con un  $N_e = 5,41 \pm 0,73$ , para toda la población en total el locus que mayor variabilidad alélica presentó fue el OarCP49 = 19 con un  $N_e = 9,91$ , seguido por el locus OarFCB304 = 16 alelos con un  $N_e = 3,91$ , el locus que menor cantidad de variabilidad alélica presentó fue el OarAE129 = 6 alelos con un  $N_e = 2,27$ , en promedio, el total de la población presenta  $12,45 \pm 1,25$  alelos por locus con un  $N_e = 5,75 \pm 0,76$  alelos efectivos. También se reporta la presencia de alelos privados en los tres distritos, para Vilca el locus que mayor cantidad de alelos privados presentó fue el OarFCB304 = 4, el locus que no presentó alelos privados fue McM527 = 0 alelos, en Yauli solo el locus BM1258 = 2 presentó alelos privados, en Acoria el locus que mayor cantidad de alelos privados presentó fue el OarFCB304 = 4, los loci que no presentaron ningún alelo privado fueron: Bm1258,

CSR247, McM527, OarCP49 y OarFCB20, todos estos datos se pueden observar en la tabla 4, también se presenta la lista de alelos privados los cuales se muestran en la tabla 5.

**Tabla 4:** Número de Alelos, Alelos Privados y Número Efectivo de Alelos por Locus

Locus	VILCA			YAULI			ACORIA			TOTAL	
	Na	NaP	Ne	Na	NaP	Ne	Na	NaP	Ne	Na	Ne
BM1258	7	1	3,26	7	2	3,28	5	0	2,68	9	3,26
BM1818	14	1	8,74	12	0	7,48	14	1	8,65	15	9,24
CSR247	12	3	4,55	8	0	4,91	7	0	3,76	12	4,59
HSC	11	1	7,95	10	0	6,56	13	3	7,20	15	7,85
INRA63	13	3	6,14	8	0	3,17	11	2	6,62	15	5,93
MAF65	7	1	3,80	6	0	3,43	7	2	3,61	9	3,84
McM527	7	0	4,87	6	0	5,48	7	0	4,70	7	5,20
OarAE129	4	1	2,73	2	0	1,47	5	2	2,11	6	2,27
OarCP49	19	3	10,55	11	0	6,11	15	0	8,54	19	9,91
OarFCB20	13	2	6,80	9	0	4,47	11	0	7,79	14	7,28
OarFCB304	11	4	3,56	6	0	3,42	12	4	3,85	16	3,91
<b>Total</b>	118	20	62,96	85	2	49,78	107	14	59,51	137	63,28
<b>Media</b>	10,73	1,82	5,72	7,73	0,18	4,53	9,73	1,27	5,41	12,45	5,75
<b>ES</b>	1,27	0,38	0,76	0,84	0,18	0,54	1,10	0,43	0,73	1,25	0,76

Na=Número de alelos, NaP=Número de alelos Privados Ne=Número de alelos Efectivos ES=Error Estandar

**Tabla 5:** Lista de los alelos privados

Subp	Locus	Alelo (pb)
<b>Vilca</b>	BM1258	125
	BM1818	284
	CSR247	211, 219, 243
	HSC	293
	INRA63	178, 182, 186
	MAF65	133
	OarAE129	151
	OarCP49	75, 107, 131
	OarFCB20	115, 117
	OarFCB304	151, 167, 169, 183
<b>Yauli</b>	BM1258	109, 133
<b>Acoria</b>	BM1818	254
	HSC	279, 289, 295
	INRA63	184, 192
	MAF65	119, 123
	OarAE129	165, 167
	OarFCB304	149, 161, 171, 179

Subp=Sub población, pb=pares de base

- **Frecuencia Alélica**

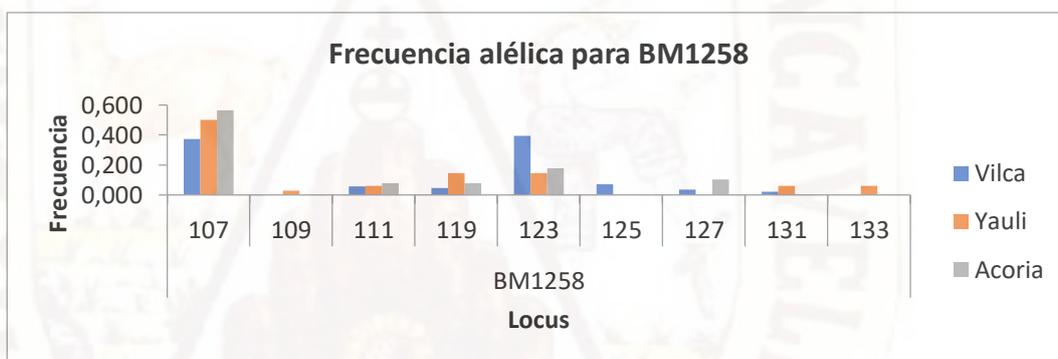
**Locus BM1258**

De los 9 alelos presentes, los más frecuentes en la población total fueron los de 107 pb y 123 pb, y los menos frecuentes fueron los alelos de 111 pb y 119 pb, el alelo de 127 pb solo lo comparten los distritos de Vilca y Acoria, mientras el alelo de 131 pb solo es compartido entre los distritos de Vilca y Yauli, también se reportan alelos presentes en un solo distrito como el caso del alelos de 125 pb presentes en Vilca y el alelo de 109 pb y 133 pb presentes únicamente en el distrito de Yauli, para Huancavelica los alelos de 107 pb y 123 pb son los que mayor frecuencia presentan, y los alelos de 109 pb y 133 pb son los que menor frecuencia presentan en toda la población, las frecuencias de todos los alelos se puede observar en la tabla 6 y figura 2 para alelos por distrito, y en la tabla 6 y figura 3 para los alelos a nivel de toda la población de Huancavelica.

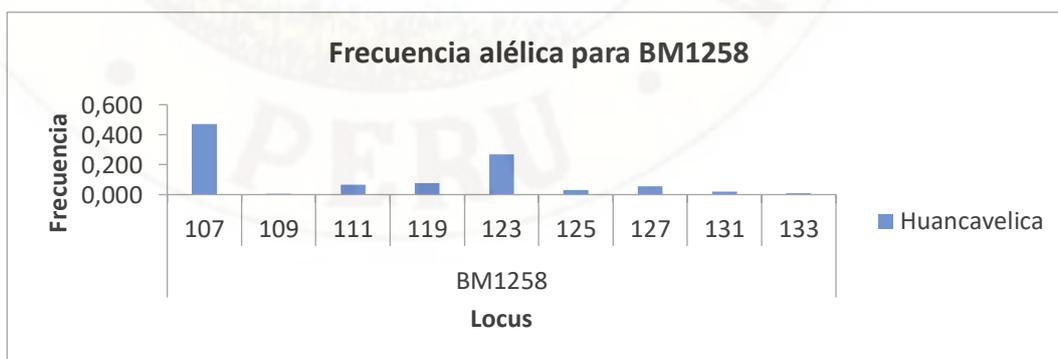
**Tabla 6:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus BM1258

BM1258				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	43	17	39	99
107	0,372	0,500	0,564	0,470
109	0,000	0,029	0,000	0,005
111	0,058	0,059	0,077	0,066
119	0,047	0,147	0,077	0,076
123	0,395	0,147	0,179	0,268
125	0,070	0,000	0,000	0,030
127	0,035	0,000	0,103	0,056
131	0,023	0,059	0,000	0,020
133	0,000	0,059	0,000	0,010

pb=pares de base, N=número de individuos



**Figura 2:** Frecuencia alélica para el locus BM1258 a nivel de cada subpoblación



**Figura 3:** Frecuencia alélica para el locus BM1258 a nivel del total de la población

### Locus BM1818

De los 15 alelos presentes, los alelos de 256 pb y 266 pb son los de mayor frecuencia, y los alelos de 262 pb y 276 pb son los de menor frecuencia en los tres distritos, por otro lado el alelo de 260 pb solo está presente en los distritos de Vilca y Acoria, también se reportan la presencia de alelos únicos para cada distrito, como el alelo de 254 pb que únicamente se presenta en Acoria, y el alelo de 284 que solo se manifiesta en Vilca, en la tabla 7 se puede observar las frecuencias de todos los alelos presentes en los tres distritos, así como también se puede observar en la figura 4, para la población de Huancavelica podemos ver que los alelos de 256 pb y 266 pb son los que mayor frecuencia y los alelos de 254 pb y 284 pb son los que en menor frecuencia se presentan, en la tabla 7, se pueden observar las frecuencias de todos los alelos presentes en Huancavelica, así como también en la figura 5.

**Tabla 7:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus BM1818

BM1818				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Huancavelica
<b>N</b>	51	20	42	113
<b>254</b>	0,000	0,000	0,012	0,004
<b>256</b>	0,186	0,250	0,226	0,212
<b>258</b>	0,010	0,050	0,048	0,031
<b>260</b>	0,147	0,000	0,119	0,111
<b>262</b>	0,010	0,025	0,060	0,031
<b>264</b>	0,108	0,025	0,071	0,080
<b>266</b>	0,147	0,175	0,119	0,142
<b>268</b>	0,049	0,025	0,095	0,062
<b>272</b>	0,049	0,050	0,024	0,040
<b>274</b>	0,069	0,075	0,036	0,058
<b>276</b>	0,020	0,100	0,012	0,031
<b>278</b>	0,098	0,050	0,012	0,058
<b>280</b>	0,039	0,075	0,083	0,062
<b>282</b>	0,059	0,100	0,083	0,075
<b>284</b>	0,010	0,000	0,000	0,004

pb=pares de base, N=número de individuos

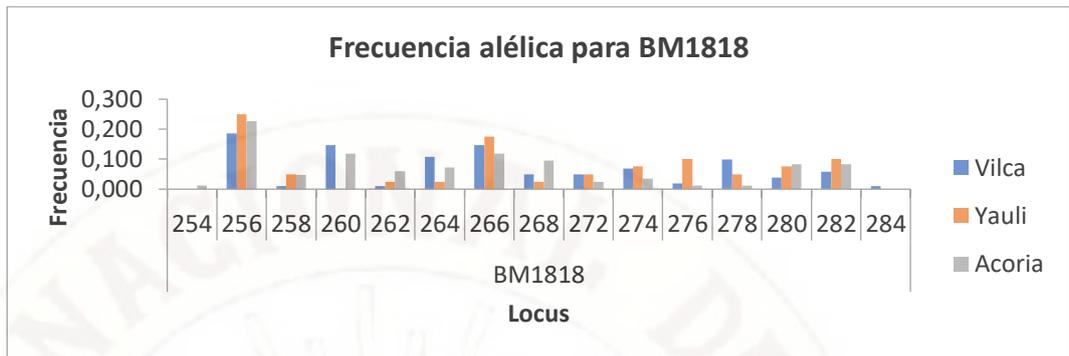


Figura 4: Frecuencia alélica para el locus BM1818 a nivel de cada subpoblación

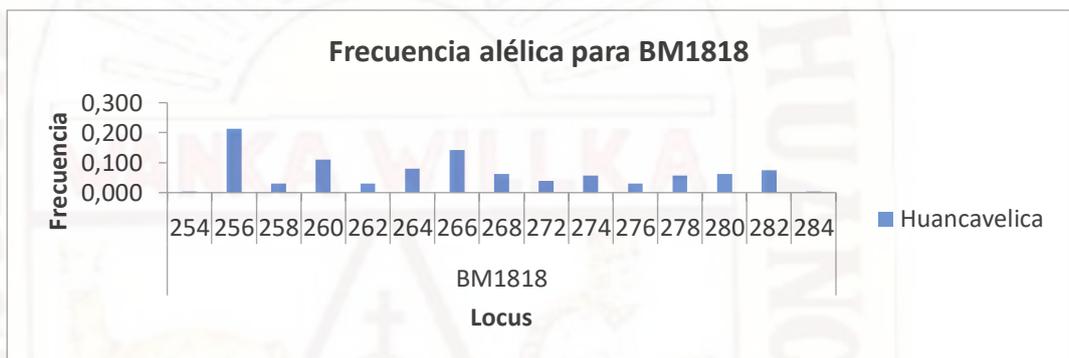


Figura 5: Frecuencia alélica para el locus BM1818 a nivel del total de la población

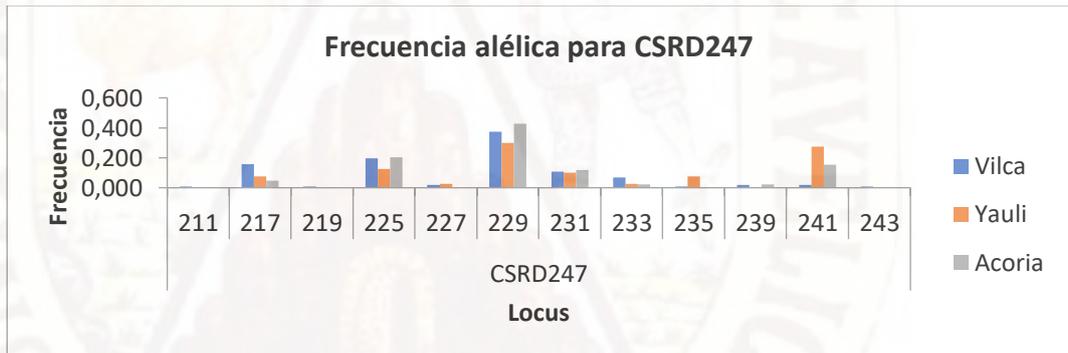
### Locus CSR247

De los 12 alelos presentes, los alelos de 225 pb y 229 pb, son los de mayor frecuencia, y los alelos de 217pb y 231 pb son los que menor frecuencia presentan en los tres distritos, también se reporta que los alelos de 227 pb y 235 pb están presentes en los distritos de Vilca y Yauli, y el alelo de 239 pb está presente en los distritos de Vilca y Acoria, y los alelos de 211 pb, 219 pb y 243 pb únicamente se encuentran en el distrito de Vilca, en la tabla 8, se puede observar las frecuencia de cada uno de los alelos presentes en cada uno de los distritos, así como también en la figura 6, en Huancavelica el alelo de 229 pb y 225 pb son los que mayor frecuencia presentan, los alelos de 211 pb, 243 pb y 219 pb son los que menor frecuencia presentan, en la tabla 8 se muestra las frecuencias de todos los alelos presentes en Huancavelica, así como también en la figura 7.

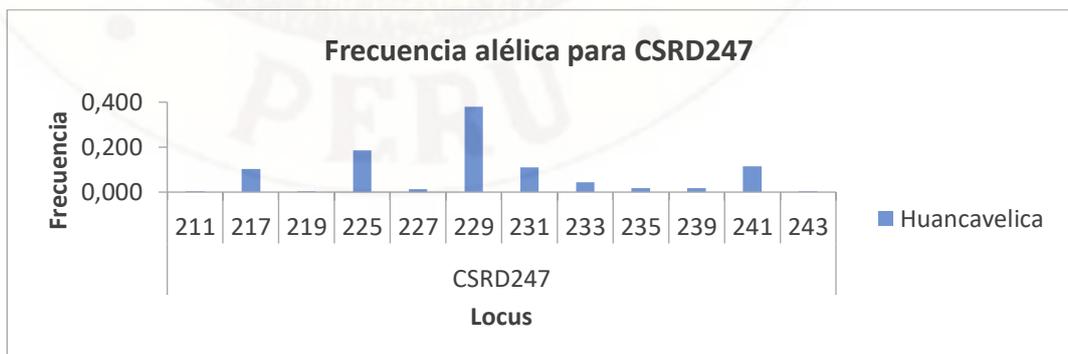
**Tabla 8:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus CSR247

CSR247				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	51	20	42	113
211	0,010	0,000	0,000	0,004
217	0,157	0,075	0,048	0,102
219	0,010	0,000	0,000	0,004
225	0,196	0,125	0,202	0,186
227	0,020	0,025	0,000	0,013
229	0,373	0,300	0,429	0,381
231	0,108	0,100	0,119	0,111
233	0,069	0,025	0,024	0,044
235	0,010	0,075	0,000	0,018
239	0,020	0,000	0,024	0,018
241	0,020	0,275	0,155	0,115
243	0,010	0,000	0,000	0,004

pb=pares de base, N=número de individuos



**Figura 6:** Frecuencia alélica para el locus CSR247 a nivel de cada subpoblación



**Figura 7:** Frecuencia alélica para el locus CSR247 a nivel del total de la población

### Locus HSC

Se encontraron 15 alelos, de ellos, los alelos de 269 pb y 273 pb son los que mayor frecuencia alélica presentan, y los alelos de 263 pb y 285 pb, son los que menor frecuencia presentan en los tres distritos, el alelo de 267 pb está presente en los distritos de Vilca y Yauli, y el alelo de 281 pb en Vilca y Acoria, el alelo de 293 pb únicamente se encuentra en Vilca y los alelos de 279 pb, 289 pb y 295 pb se encuentran en el distrito de Acoria, en la tabla 9 y la figura 8 se puede observar las frecuencias de los alelos presentes en los distritos de Vilca, Yauli y Acoria, para la población de Huancavelica los alelos de 269 pb y 273 pb son los que mayor frecuencia presentan y los alelos de 279 pb, 289 pb y 295 pb, son los que menor frecuencia presentan, en la tabla 9 y la figura 9 se puede observar las frecuencias de todos los alelos presentes en la población de Huancavelica.

**Tabla 9:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus HSC

HSC				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
<b>N</b>	51	20	42	113
<b>263</b>	0,039	0,075	0,071	0,058
<b>267</b>	0,020	0,025	0,000	0,013
<b>269</b>	0,137	0,225	0,179	0,168
<b>271</b>	0,167	0,075	0,179	0,155
<b>273</b>	0,137	0,225	0,179	0,168
<b>275</b>	0,147	0,075	0,119	0,124
<b>277</b>	0,088	0,150	0,024	0,075
<b>279</b>	0,000	0,000	0,012	0,004
<b>281</b>	0,010	0,000	0,012	0,009
<b>283</b>	0,137	0,100	0,143	0,133
<b>285</b>	0,098	0,025	0,048	0,066
<b>289</b>	0,000	0,000	0,012	0,004
<b>291</b>	0,000	0,025	0,012	0,009
<b>293</b>	0,020	0,000	0,000	0,009
<b>295</b>	0,000	0,000	0,012	0,004

pb=pares de base, N=número de individuos

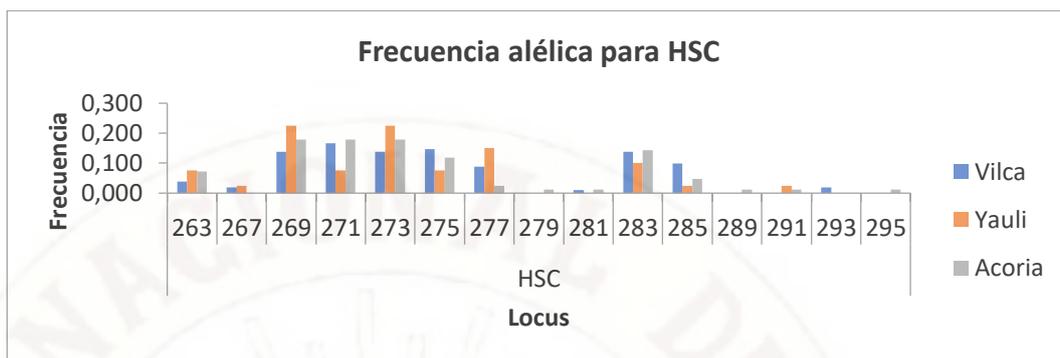


Figura 8: Frecuencia alélica para el locus HSC a nivel de cada subpoblación

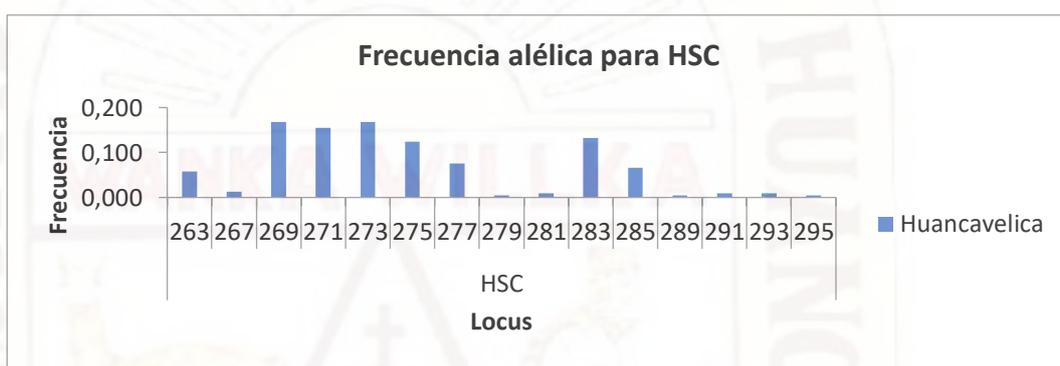


Figura 9: Frecuencia alélica para el locus HSC a nivel del total de la población

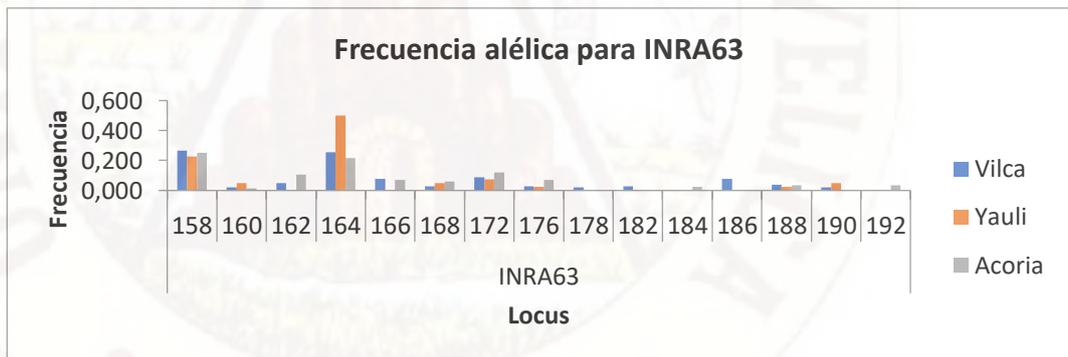
### Locus INRA63

Se encontraron 15 alelos, los alelos de 158 pb y 164 pb son los de mayor frecuencia alélica, y los alelos de 168 pb, 175 pb y 188 pb, son los de menor frecuencia alélica en los tres distritos, los distritos de Vilca y Acoria comparten los alelos de 162 pb y 166 pb, también se reportan alelos únicos en Vilca de 178 pb, 182 pb y 186 pb y Acoria de 184 pb y 192 pb, en la tabla 10 y la figura 10 se muestran las frecuencias de todos los alelos presentes en los tres distritos, para la población de Huancavelica, los alelos de 158 pb y 164 pb son los que mayor frecuencia presentan y los alelos de 178 pb y 184 pb son los que menor frecuencia presentan, en la tabla 10 y la figura 11 se puede observar las frecuencias de los alelos presentes en la población de Huancavelica.

**Tabla 10:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus INRA63

INRA63				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	51	20	42	113
158	0,265	0,225	0,250	0,252
160	0,020	0,050	0,012	0,022
162	0,049	0,000	0,107	0,062
164	0,255	0,500	0,214	0,283
166	0,078	0,000	0,071	0,062
168	0,029	0,050	0,060	0,044
172	0,088	0,075	0,119	0,097
176	0,029	0,025	0,071	0,044
178	0,020	0,000	0,000	0,009
182	0,029	0,000	0,000	0,013
184	0,000	0,000	0,024	0,009
186	0,078	0,000	0,000	0,035
188	0,039	0,025	0,036	0,035
190	0,020	0,050	0,000	0,018
192	0,000	0,000	0,036	0,013

pb=pares de base, N=número de individuos



**Figura 10:** Frecuencia alélica para el locus INRA63 a nivel de cada subpoblación

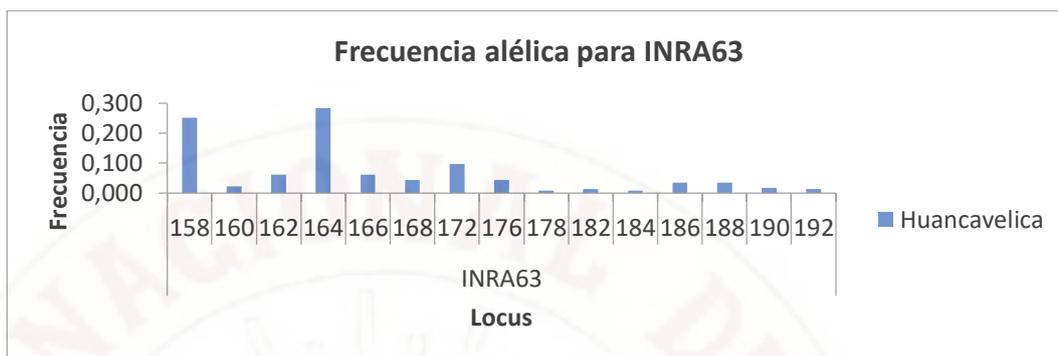


Figura 11: Frecuencia alélica para el locus INRA63 a nivel del total de la población

### Locus MAF65

Presentó 9 alelos, de los cuales los alelos de 125 pb y 129 pb son los de mayor frecuencia alélica, y los alelos de 131 pb y 135 pb son lo de menor frecuencia alélica en los tres distritos, el alelo de 139 pb tiene presencia en los distritos de Vilca y Yauli, el alelo de 133 pb únicamente está presente en el distrito de Vilca, y los alelos de 119 pb y 123 pb se encuentran únicamente en el distrito de Acoria, en la tabla 11 y la figura 12 se puede observar las frecuencia de todos los alelos presentes en los tres distritos, para la población de Huancavelica, los alelos de 125 pb y 127 pb son los que se presentan en mayor frecuencia, y los alelos de 123 pb y 133 pb, son los que se presentan en menor frecuencia, en la tabla 11 y la figura 13 se puede observar las frecuencia de todos los alelos presentes en la población de Huancavelica.

Tabla 11: Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus MAF65

MAF65				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	51	20	42	113
119	0,000	0,000	0,036	0,013
123	0,000	0,000	0,012	0,004
125	0,206	0,100	0,345	0,239
127	0,431	0,475	0,369	0,416
129	0,118	0,150	0,107	0,119
131	0,039	0,025	0,060	0,044
133	0,010	0,000	0,000	0,004
135	0,108	0,150	0,071	0,102
139	0,088	0,100	0,000	0,058

pb=pares de base, N=número de individuos

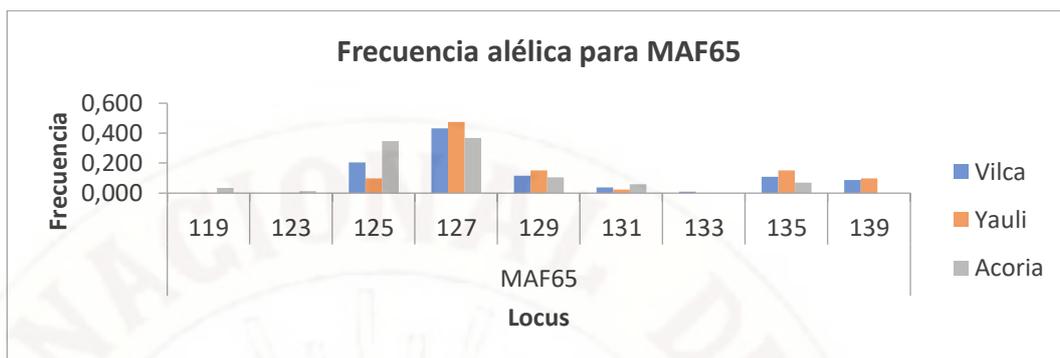


Figura 12: Frecuencia alélica para el locus MAF65 a nivel de cada subpoblación



Figura 13: Frecuencia alélica para el locus MAF65 a nivel del total de la población

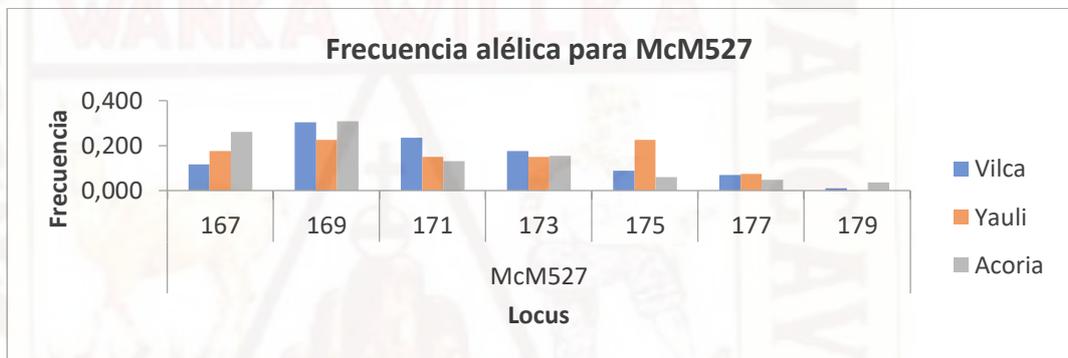
### Locus McM527

Presentó 7 alelos, alelos de 167 pb, 169 pb y 171 pb, son los de mayor frecuencia alélica, y los alelos de 175 pb y 177 pb son los que menor frecuencia presentan en los tres distritos, también se reporta que el alelo de 179 pb se encuentra en los distritos de Vilca y Acoria, no existen alelos únicos por distrito, en la tabla 12 y la figura 14 se muestran las frecuencia de los alelos presentes en los distritos de Vilca, Yauli y Acoria, para la población de Huancavelica los alelos de 167 pb, 169 pb y 171 pb, son los que mayor frecuencia de alelos presentan, y los alelos de 177 y 179 son los que menor frecuencia de alelos presentan para la población de Huancavelica, en la tabla 12 y la figura 15 se puede observar las frecuencias de cada uno de los alelos presentes en esta población.

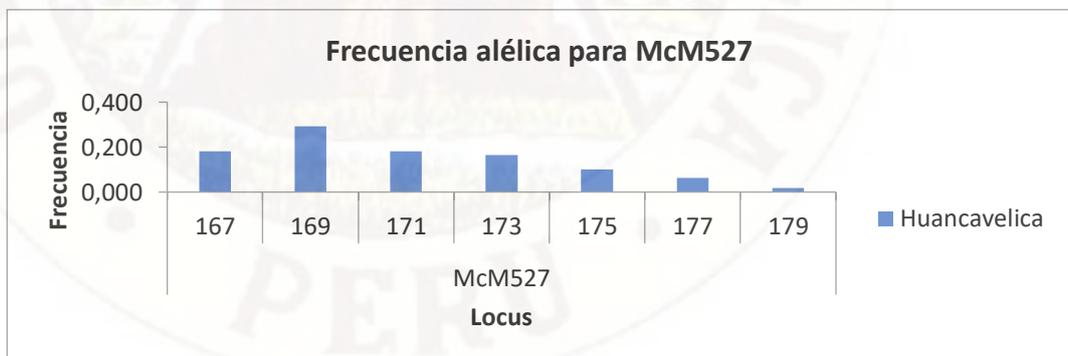
**Tabla 12:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus McM527

McM527				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
<b>N</b>	51	20	42	113
<b>167</b>	0,118	0,175	0,262	0,181
<b>169</b>	0,304	0,225	0,310	0,292
<b>171</b>	0,235	0,150	0,131	0,181
<b>173</b>	0,176	0,150	0,155	0,164
<b>175</b>	0,088	0,225	0,060	0,102
<b>177</b>	0,069	0,075	0,048	0,062
<b>179</b>	0,010	0,000	0,036	0,018

pb=pares de base, N=número de individuos



**Figura 14:** Frecuencia alélica para el locus McM527 a nivel de cada subpoblación



**Figura 15:** Frecuencia alélica para el locus McM527 a nivel del total de la población

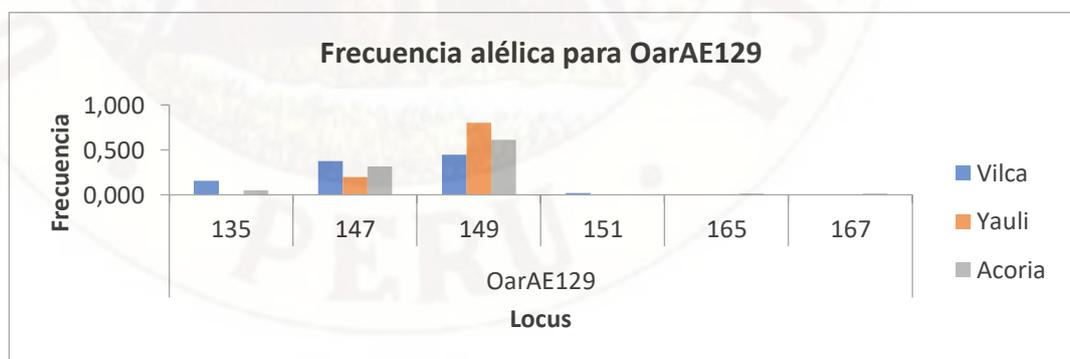
### Locus OarAE129

Presentó 6 alelos, el alelo de 149 pb es el que presenta mayor frecuencia y el alelos de 147 pb es menos frecuente en los tres distritos, el alelos de 135 pb está presente en los distritos de Vilca y Acoria, el alelo de 151 pb se encuentra únicamente en el distrito de Vilca, y los alelos de 165 pb y 167 pb están presentes en el distrito de Acoria, en la tabla 13 y figura 16 se puede observar las frecuencia de los alelos presentes en los distritos de Vilca, Yauli y Acoria, para la población de Huancavelica, los alelos de 147 pb y 149 pb son los más frecuentes y los alelos de 165 pb y 167 pb, son los menos frecuentes, en la tabla 13 y figura 17 se puede observar las frecuencia de cada uno de los alelos presentes en la población de Huancavelica.

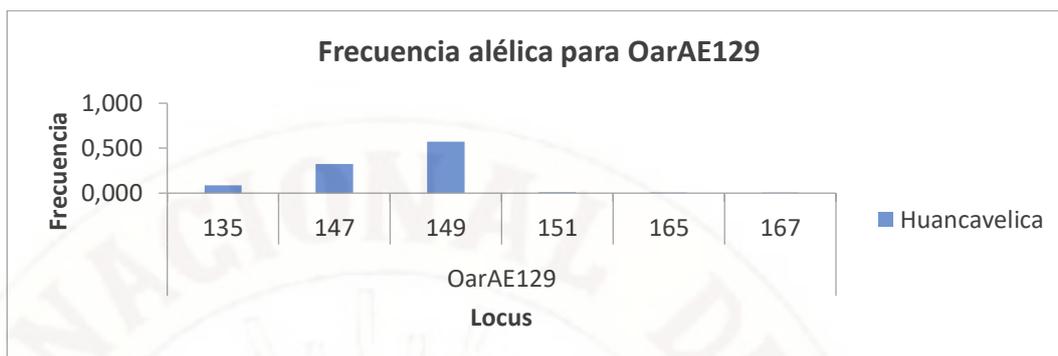
**Tabla 13:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarAE129

OarAE129				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	48	20	41	109
135	0,156	0,000	0,049	0,087
147	0,375	0,200	0,317	0,321
149	0,448	0,800	0,610	0,573
151	0,021	0,000	0,000	0,009
165	0,000	0,000	0,012	0,005
167	0,000	0,000	0,012	0,005

pb=pares de base, N=número de individuos



**Figura 16:** Frecuencia alélica para el locus OarAE129 a nivel de cada subpoblación



**Figura 17:** Frecuencia alélica para el locus OarAE129 a nivel del total de la población

### Locus OarCP49

Presento 19 alelos en toda la población, la frecuencia alélica para el distrito de Vilca oscila entre 0,01 para los alelos de 105 pb, 129 pb y 131 pb y 0,176 para los alelos de 81 pb y 91 pb, Yauli entre 0,025 para los alelos de 79 pb, 85 pb, 87 pb y 109 pb, y 0,275 para el alelo de 101 pb, Acoria entre 0,012 para los alelos de 79 pb, 105 pb y 119 pb, y 0,190 para los alelos de 81 y 91 pb, en la tabla 14 y la figura 18 se muestra las frecuencias de cada uno de los alelos presentes en cada distrito, en total para Huancavelica el alelo que mayor frecuencia presentó fue de 81 pb con una frecuencia de 0,186, y alelo que menor frecuencia presentó fue el de 131 pb, con una frecuencia de 0,004, en la tabla 14 y la figura 19 se muestra las frecuencias de todos los alelos presentes en Huancavelica.

**Tabla 14:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarCP49

OarCP49				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
<b>N</b>	51	20	42	113
<b>75</b>	0,039	0,000	0,000	0,018
<b>79</b>	0,029	0,025	0,060	0,040
<b>81</b>	0,176	0,200	0,190	0,186
<b>83</b>	0,059	0,050	0,107	0,075
<b>85</b>	0,039	0,025	0,024	0,031
<b>87</b>	0,029	0,025	0,119	0,062
<b>89</b>	0,049	0,000	0,012	0,027
<b>91</b>	0,176	0,150	0,190	0,177

93	0,039	0,000	0,036	0,031
97	0,088	0,125	0,036	0,075
99	0,049	0,050	0,083	0,062
101	0,059	0,275	0,036	0,089
105	0,010	0,000	0,012	0,009
107	0,020	0,000	0,000	0,009
109	0,069	0,025	0,036	0,049
119	0,029	0,000	0,012	0,018
127	0,020	0,000	0,048	0,027
129	0,010	0,050	0,000	0,013
131	0,010	0,000	0,000	0,004

pb=pares de base, N=número de individuos

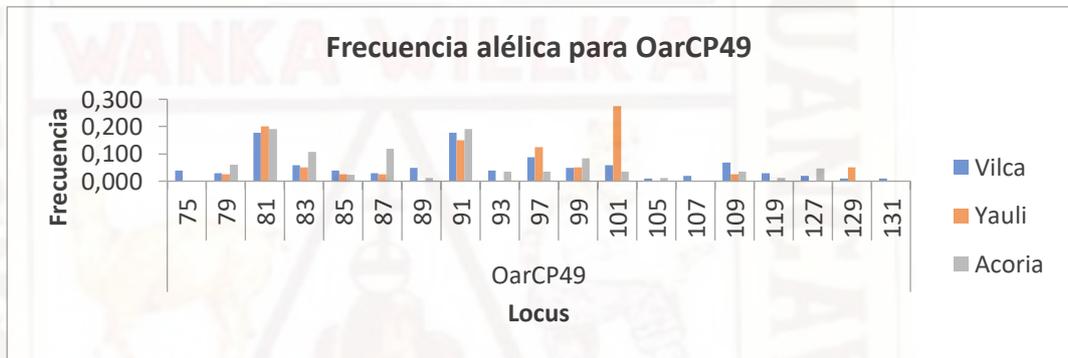


Figura 18: Frecuencia alélica para el locus OarCP49 a nivel de cada subpoblación

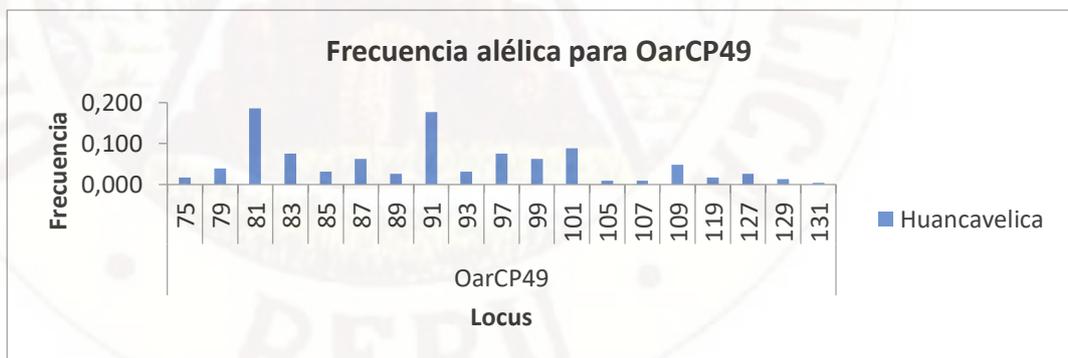


Figura 19: Frecuencia alélica para el locus OarCP49 a nivel del total de la población

### Locus OarFCB20

Presentó 14 alelos en toda la población, la frecuencia alélica para el distrito de Vilca oscila entre 0,010 para el alelo de 121 pb y 0,275 para el alelo de 91 pb, Yauli entre 0,025 para los alelos de 109 pb, 121pb y 123 pb, y 0,375 para alelo de 91 pb, Acoria entre 0,024 para los alelos de 109 pb y 123 pb, y 0,179 para los alelos de 91pb, 93 pb y 95 pb, en la tabla 15 y la figura 20 se muestra la frecuencia de todos los alelos presentes en este locus en cada distrito, para Huancavelica el alelo que mayor frecuencia presentó fue el de 91 pb (0,275), y el alelo de 121 pb (0,009) fue el que menor frecuencia presentó, en la tabla 15 y la figura 21 se muestra la frecuencia de todos los alelos presentes en Huancavelica.

**Tabla 15:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarFCB20

OarFCB20				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	51	20	42	113
89	0,049	0,000	0,071	0,049
91	0,275	0,375	0,179	0,257
93	0,078	0,050	0,179	0,111
95	0,176	0,175	0,179	0,177
97	0,039	0,000	0,071	0,044
101	0,049	0,200	0,107	0,097
103	0,118	0,075	0,071	0,093
105	0,029	0,000	0,060	0,035
109	0,020	0,025	0,024	0,022
115	0,029	0,000	0,000	0,013
117	0,108	0,000	0,000	0,049
119	0,020	0,050	0,036	0,031
121	0,010	0,025	0,000	0,009
123	0,000	0,025	0,024	0,013

pb=pares de base, N=número de individuos

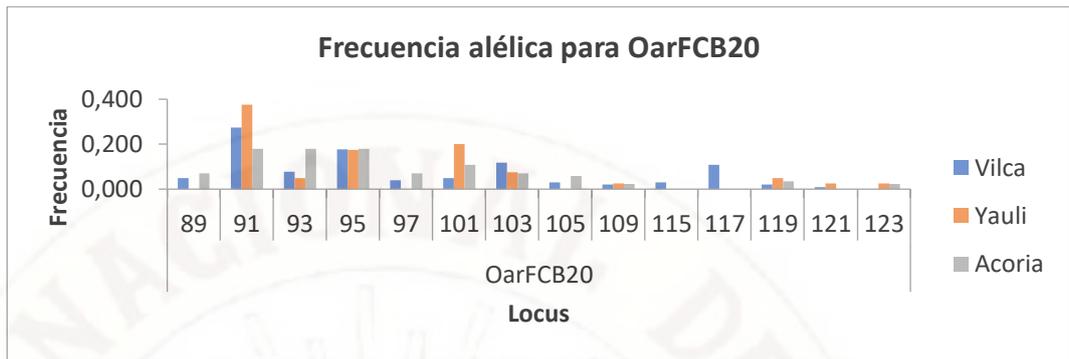


Figura 20: Frecuencia alélica para el locus OarFCB20 a nivel de cada subpoblación

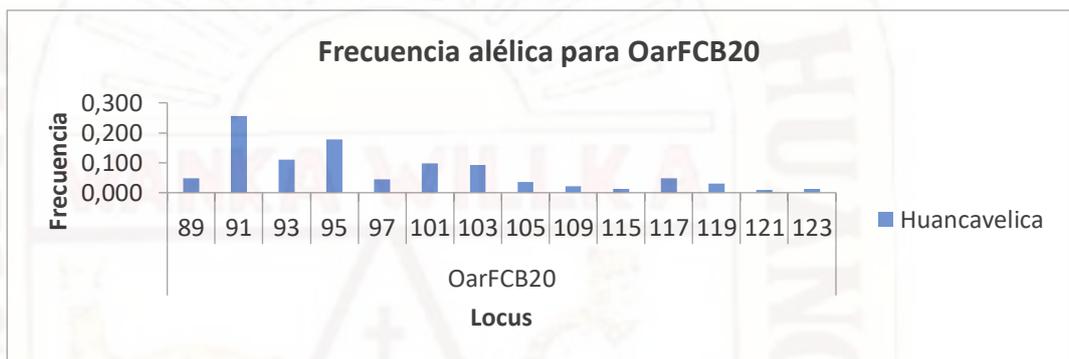


Figura 21: Frecuencia alélica para el locus OarFCB20 a nivel del total de la población

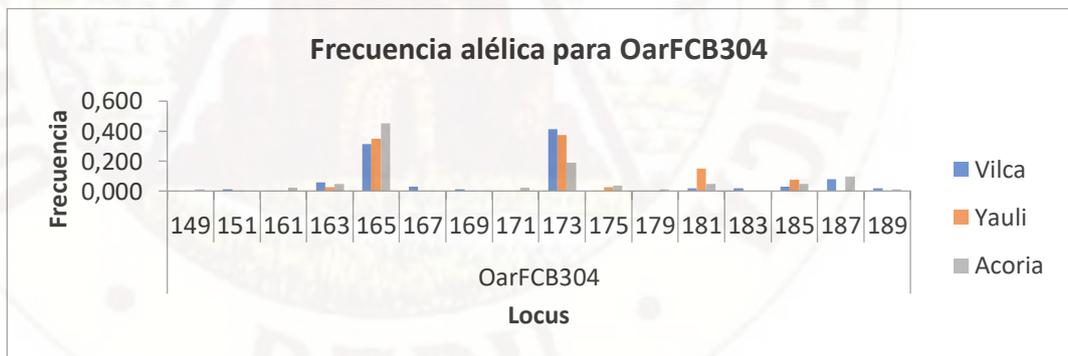
### Locus OarFCB304

Presentó 16 alelos a nivel poblacional, la frecuencia alélica para el distrito de Vilca oscila entre 0,010 para los alelos de 151 pb y 169 pb, y 0,412 para el alelo de 173 pb, Yauli entre 0,025 para los alelos de 163 pb y 175 pb, y 0,375 para el alelo de 173 pb, Acoria entre 0,012 para los alelos de 149 pb, 179 pb y 189 pb, y 0,452 para el alelo de 165 pb, en la tabla 16 y la figura 22 se muestra la frecuencia alélica de cada alelo presente para este locus por distrito, para Huancavelica el alelo de 165 pb fue el que mayor frecuencia alélica presentó 0,372 y los alelos de 149 pb, 151 pb, 169 pb y 179 pb son los que menor frecuencia presentaron 0,004, en la tabla 16 y la figura 23 se muestra las frecuencias alélicas encontradas para este locus en Huancavelica.

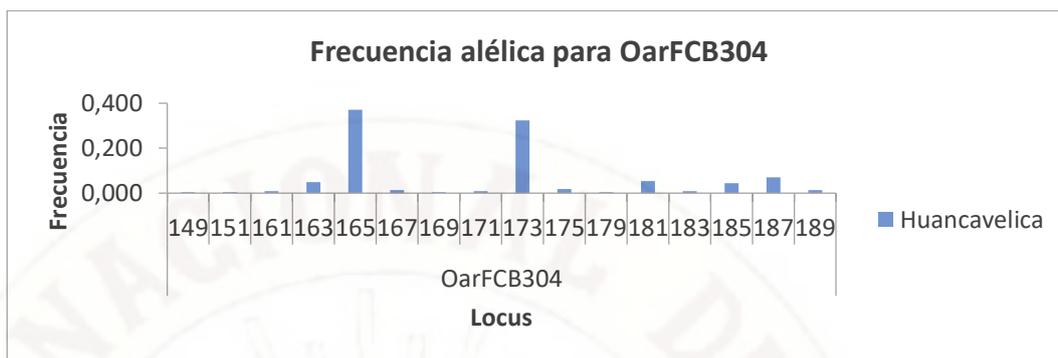
**Tabla 16:** Frecuencia alélica por subpoblación y población total para el locus OarFCB304

OarFCB304				
Alelo (pb)	Vilca	Yauli	Acoria	Total
N	51	20	42	113
149	0,000	0,000	0,012	0,004
151	0,010	0,000	0,000	0,004
161	0,000	0,000	0,024	0,009
163	0,059	0,025	0,048	0,049
165	0,314	0,350	0,452	0,372
167	0,029	0,000	0,000	0,013
169	0,010	0,000	0,000	0,004
171	0,000	0,000	0,024	0,009
173	0,412	0,375	0,190	0,323
175	0,000	0,025	0,036	0,018
179	0,000	0,000	0,012	0,004
181	0,020	0,150	0,048	0,053
183	0,020	0,000	0,000	0,009
185	0,029	0,075	0,048	0,044
187	0,078	0,000	0,095	0,071
189	0,020	0,000	0,012	0,013

pb=pares de base, N=número de individuos



**Figura 22:** Frecuencia alélica para el locus OarFCB304 a nivel de cada subpoblación



**Figura 23:** Frecuencia alélica para el locus OarFCB304 a nivel del total de la población

- **Alelos Nulos**

Del total de cebadores amplificados solo 9 de los 11 loci utilizados lograron amplificar para todas las muestras en los tres distritos, el locus BM1258 amplificó en Vilca 43 de 51 muestras, el cual representa un 84,3% de muestras amplificadas para este locus en el distrito mencionado, Yauli 17 de 20 muestras, representando el 85% de muestras amplificadas para este locus en el distrito mencionado, Acoria 39 de 42 muestras, representando el 92,9% de muestras amplificadas para este locus en el distrito mencionado, en la población total logró amplificar 99 de 113 muestras en total, el cual representa el 87,6% de muestras amplificadas para el locus BM1258 en toda la población. Otro locus que no llegó a amplificar para todas las muestras fue el OarAE129, el cual amplificó para Vilca 48 de 51 muestras, el cual representa un 94,1% de muestras amplificadas para este locus en el distrito mencionado, Yauli amplificó 20 de 20 muestras, el cual representa el 100% de muestras amplificadas para este locus en el distrito mencionado, Acoria 41 de 42 muestras, el cual representa un 97,6% de muestras amplificadas para este locus en el distrito mencionado, para la población en total este locus amplificó 109 de 113 muestras, representando un 96,5% de muestras amplificadas en la población total para el locus OarAE129 (tabla 17).

**Tabla 17:** Número de loci amplificados

Locus	VILCA		YAULI		ACORIA		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>BM1258</b>	43	84,30%	17	85%	39	92,90%	99	87,60%
<b>BM1818</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>CSR247</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>HSC</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>INRA63</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>MAF65</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>McM527</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>OarAE129</b>	48	94,10%	20	100%	41	97,60%	109	96,50%
<b>OarCP49</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>OarFCB20</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%
<b>OarFCB304</b>	51	100%	20	100%	42	100%	113	100%

Se determinó la presencia de alelos nulos mediante cuatro métodos, para el cual se consideró que existe presencia de alelos nulos si los datos arrojados superaban el valor de 0,1.

En la tabla 18 se muestra que los loci BM1258, INRA63 y OarAE129 manifiestan presencia de alelos nulos en el distrito de Vilca.

**Tabla 18:** Estimación de alelos nulos para el distrito de Vilca

Locus	Presencia	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
BM1258	Si	0,2965	0,4608	0,2583	0,4662
BM1818	No	0,0259	0,0246	0,0225	0,0225
CSR247	No	-0,0259	-0,027	-0,0243	0
HSC	No	0,0402	0,0419	0,0375	0,0375
INRA63	Si	0,0677	0,0715	0,0608	0,0608
MAF65	No	0,0165	0,0213	0,0177	0,0177
McM527	No	-0,0047	-0,0058	-0,0051	0
OarAE129	Si	0,1449	0,1833	0,1202	0,2419
OarCP49	No	-0,0075	-0,0089	-0,0086	0
OarFCB20	No	0,0334	0,0296	0,0265	0,0265
OarFCB304	No	-0,0644	-0,0555	-0,0492	0

En la tabla 19 se muestra que el locus BM1258 es el único locus que manifiesta presencia de alelos nulos en el distrito de Yauli.

**Tabla 19:** Estimación de alelos nulos para el distrito de Yauli

Locus	Presencia	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
BM1258	Si	0,3372	0,5952	0,3061	0,4934
BM1818	No	0,005	0,0095	0,0087	0,0087
CSR247	No	0,0699	0,0643	0,0536	0,0536
HSC	No	0,0547	0,061	0,0528	0,0528
INRA63	No	0,0236	0,0262	0,0208	0,0208
MAF65	No	-0,0154	-0,0283	-0,0241	0
McM527	No	-0,0518	-0,048	-0,0454	0
OarAE129	No	0,0298	0,0323	0,0152	0,0152
OarCP49	No	0,026	0,0222	0,0197	0,0197
OarFCB20	No	0,0571	0,0517	0,0429	0,0429
OarFCB304	No	0,0022	0,0053	0,0044	0,0044

En la tabla 20 se muestra que el locus BM1258 y OarAE129 son los únicos que manifiestan presencia de alelos nulos en el distrito de Acoria.

**Tabla 20:** Estimación de alelos nulos para el distrito de Acoria

Locus	Presencia	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
BM1258	Si	0,1529	0,2091	0,1333	0,2721
BM1818	No	-0,0112	-0,0114	-0,0108	0
CSR247	No	-0,0964	-0,0775	-0,0711	0
HSC	No	0,0152	0,0164	0,0149	0,0149
INRA63	No	0,0406	0,0387	0,0342	0,0342
MAF65	No	0,0113	0,0061	0,0051	0,0051
McM527	No	0,0037	0,0011	0,001	0,001
OarAE129	Si	0,1646	0,2118	0,1203	0,1858
OarCP49	No	-0,04	-0,0378	-0,0369	0
OarFCB20	No	-0,0212	-0,0187	-0,0177	0
OarFCB304	No	0,06	0,0524	0,0423	0,0423

En la tabla 21 se muestra que los loci, BM1258, HSC, INRA63 y OarAE129 son los que manifiestan presencia de alelos nulos en la población total.

**Tabla 21:** Estimación de alelos nulos para la población total

Locus	Presencia	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
BM1258	Si	0,2595	0,3916	0,2304	0,4092
BM1818	No	0,0138	0,014	0,013	0,013
CSR247	No	-0,0225	-0,0201	-0,018	0
HSC	Si	0,0378	0,0401	0,036	0,036
INRA63	Si	0,0607	0,0618	0,0529	0,0529
MAF65	No	0,0204	0,0158	0,0132	0,0132
McM527	No	-0,0044	-0,0041	-0,0036	0
OarAE129	Si	0,1538	0,1967	0,1181	0,2055
OarCP49	No	-0,0067	-0,0069	-0,0066	0
OarFCB20	No	0,0252	0,0235	0,0213	0,0213
OarFCB304	No	0,0066	0,0067	0,0057	0,0057

- **Heterocigosidad y PIC**

El cálculo de las frecuencias alélicas permitió determinar, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) total y de cada distrito.

Para la población del distrito de Vilca la  $H_o$  oscila entre 0,256 a 0,922, siendo el locus BM1258 el extremo menor y el OarCP49 el extremo mayor, la  $H_e$  osciló entre 0,634 a 0,905 teniendo como extremo menor al OarAE129 y OarCP49 como el extremo mayor, en promedio la población del distrito del Vilca presentó un  $H_o = 0,721 \pm 0,06$  y  $H_e = 0,792 \pm 0,027$ , siendo así la  $H_e$  ligeramente mayor a la  $H_o$ , (tabla 22).

La población del distrito de Yauli presentó un  $H_o$  que oscila entre 0,176 a 0,9, teniendo como extremo menor al locus BM1258 y mayor el locus McM527, la  $H_e$  osciló entre 0,320 a 8,66, teniendo al locus OarAE129 como extremo menor y al BM1818 como extremo mayor, en promedio esta población presentó un  $H_o = 0,661 \pm 0,067$  y  $H_e = 0,732 \pm 0,046$  (tabla 22).

En la población de Acoria la  $H_o$  osciló entre 0,341 a 0,952, siendo el locus OarAE129 en extremo menor y el OarCP49 el extremo superior, la  $H_e$  osciló entre 0,525 a 0,884,

siendo el OarAE129 el extremo menor y el BM1818 el extremo superior, en promedio esta población presentó un  $H_o = 0,741 \pm 0,060$  y  $H_E = 0,771 \pm 0,035$ , (tabla 22)

La población en total presentó un  $H_o$  que osciló entre 0,303 a 0,912, siendo el locus BM1258 el extremo menor y el OarCP49 el extremo mayor, la  $H_E$  osciló entre 0,560 a 0,899, siendo el locus OarAE129 en extremo menor y el OarCP49 el extremo mayor, en total la población presentó un promedio para  $H_o = 0,718 \pm 0,059$  y  $H_E = 0,790 \pm 0,031$ , (tabla 22).

El contenido de información polimórfica encontrado muestra que el locus OarAE129 es el que presenta menor contenido polimórfico con un  $PIC = 0,486$  y el locus OarCP49 el locus que mayor contenido polimórfico reporta con un  $PIC = 0,891$ , en promedio la población presentó un  $PIC = 0,7625 \pm 0,036$  (tabla 22).

**Tabla 22:** Estimación de heterocigosidad y PIC por locus en los distritos de Vilca, Yauli, Acoria y total de la población

Locus	Vilca		Yauli		Acoria		Total		PIC
	$H_o$	$H_E$	$H_o$	$H_E$	$H_o$	$H_E$	$H_o$	$H_E$	
<b>BM1258</b>	0,256	0,693	0,176	0,696	0,410	0,627	0,303	0,693	0,653
<b>BM1818</b>	0,843	0,886	0,850	0,866	0,905	0,884	0,867	0,892	0,883
<b>CSR247</b>	0,824	0,780	0,700	0,796	0,857	0,734	0,814	0,782	0,757
<b>HSC</b>	0,804	0,874	0,750	0,848	0,833	0,861	0,805	0,873	0,859
<b>INRA63</b>	0,725	0,837	0,650	0,685	0,786	0,849	0,735	0,831	0,813
<b>MAF65</b>	0,706	0,737	0,750	0,709	0,714	0,723	0,717	0,740	0,706
<b>McM527</b>	0,804	0,795	0,900	0,818	0,786	0,787	0,814	0,808	0,781
<b>OarAE129</b>	0,438	0,634	0,300	0,320	0,341	0,525	0,376	0,560	0,486
<b>OarCP49</b>	0,922	0,905	0,800	0,836	0,952	0,883	0,912	0,899	0,891
<b>OarFCB20</b>	0,804	0,853	0,700	0,776	0,905	0,872	0,823	0,863	0,849
<b>OarFCB304</b>	0,804	0,719	0,700	0,708	0,667	0,740	0,735	0,744	0,709
<b>Media</b>	0,721	0,792	0,661	0,732	0,741	0,771	0,718	0,790	0,7625
<b>SE</b>	0,060	0,027	0,067	0,046	0,060	0,035	0,059	0,031	0,036

$H_o$ =Heterocigosidad observada,  $H_E$ =Heterocigosidad esperada,  $PIC$ =Contenido de información polimórfica  $SE$ =Error Estándar

- **Equilibrio Hardy – Weinberg**

El test de Equilibrio Hardy-Weinberg, en Vilca los loci BM1258, INRA63 y OarAE129 demostraron que no están en equilibrio H-W por que presentan un déficit de heterocigotos, de igual manera el locus OarFCB304 muestra que no está en equilibrio H-W por presentar un exceso de heterocigotos, para el distrito de Yauli los loci BM1258 y HSC de encuentran en desequilibrio H-W al presentar un déficit de heterocigotos, en el distrito de Acoria los loci BM1258 y OarAE129 se encuentran en desequilibrio H-W por presentar un déficit de heterocigotos, para la población en total los loci BM1258, HSC, INRA63 y OarAE129 se encuentran en desequilibrio H-W por presentar un déficit de heterocigotos, los demás loci se encuentran en equilibrio HW al no ser estadísticamente significativa y aceptarse la hipótesis nula, el cual considera que la población se encuentra en equilibrio H-W, en la tabla 23 se muestra la significancia para cada locus por distrito y total de la población.

**Tabla 23:** Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) evaluado mediante la prueba exacta para cada locus en las poblaciones de ovinos de los distritos de Vilca, Yauli y Acoria. Bajo la hipótesis alterna (H1: Existe déficit de heterocigotos y exceso de heterocigotos).

locus	VILCA				YAULI				ACORIA				TOTAL			
	Déficit de Heterocigotos		Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos		Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos		Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos		Exceso de Heterocigotos	
	P-val	ES	P-val	ES												
<b>BM1258</b>	<b>0***</b>	0	1	0												
<b>BM1818</b>	0,3436	0,0299	0,6862	0,03	0,105	0,0229	0,8793	0,0221	0,6573	0,0351	0,3679	0,028	0,3599	0,0416	0,6361	0,0383
<b>CSR247</b>	0,784	0,0437	0,1551	0,0268	0,2587	0,0171	0,7539	0,0112	0,953	0,0068	0,0509	0,007	0,9316	0,0131	0,0767	0,0163
<b>HSC</b>	0,0648	0,011	0,9316	0,0108	<b>0,0341*</b>	0,0074	0,9583	0,008	0,1035	0,0259	0,9515	0,0104	<b>0,0095**</b>	0,0037	0,9953	0,0022
<b>INRA63</b>	<b>0,0149*</b>	0,0068	0,9905	0,0045	0,277	0,022	0,7642	0,0247	0,1834	0,0213	0,8051	0,0168	<b>0,0235*</b>	0,0073	0,9834	0,0066
<b>MAF65</b>	0,2203	0,0158	0,7704	0,0116	0,8058	0,0105	0,2725	0,0137	0,6487	0,0192	0,3388	0,0236	0,5552	0,0215	0,4847	0,0201
<b>McM527</b>	0,6076	0,0147	0,3917	0,014	0,789	0,0066	0,2588	0,0078	0,582	0,0133	0,424	0,0162	0,7767	0,0133	0,224	0,0101
<b>OarAE129</b>	<b>0***</b>	0	1	0	0,5805	0,002	0,8686	0,0023	<b>0,0016**</b>	0,0007	0,9997	0,0002	<b>0***</b>	0	1	0
<b>OarCP49</b>	0,7286	0,0386	0,2943	0,0517	0,3943	0,0343	0,6961	0,0319	0,9315	0,0159	0,0724	0,015	0,913	0,02	0,0875	0,0199
<b>OarFCB20</b>	0,3131	0,0302	0,6892	0,029	0,2496	0,0162	0,8239	0,0197	0,4914	0,0217	0,4907	0,0231	0,2856	0,0244	0,6916	0,0334
<b>OarFCB304</b>	0,9338	0,0247	<b>0,0431*</b>	0,0158	0,3321	0,0174	0,7405	0,0103	0,2379	0,0292	0,7658	0,032	0,5607	0,0338	0,3746	0,029

P-val=Valor de Significancia, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, SE=Error Estándar

#### 4.1.2. Análisis de Índice de Endogamia, AMOVA y Estructura Poblacional

- **Índice de Endogamia**

En el distrito de Vilca, los loci BM1258 y OarAE129 presentaron valores de 0,6379 y 0,3193 para el estadístico  $F_{IS}$ , los cuales indican que existe un déficit de heterocigotos, y el locus OarFCB304 mostro un  $F_{IS}=-0,1078$ , lo cual indica que hay un exceso de heterocigotos, en promedio el distrito de Vilca mostró un  $F_{IS}=0,1095\pm 0,063$ , el cual indica que el grado de endogamia en esta población es baja.

Para el distrito de Yauli, el locus BM1258 mostro un  $F_{IS}=0,7594$ , el cual indica que existe déficit de heterocigotos, y el locus McM527 fue el que presento el menor valor de  $F_{IS}=-0,0755$ , indicando que existe exceso de heterocigotos para este locus, en promedio Yauli mostro un  $F_{IS}=0,125\pm 0,067$ , indicando un grado de endogamia moderado.

De igual manera para el distrito de Acoria el locus que mayor  $F_{IS}$  presentó fue el BM1258 con un valor de 0,3573 y el locus que menor valor presento fue el CSRD247 mostrando un valor de -0,156, en promedio el distrito de Acoria presentó un  $F_{IS}=0,067\pm 0,049$  mostrando un bajo grado de endogamia.

Para la población en general se reportó valores de  $F_{IT}$ , siendo el locus BM1258 el de mayor  $F_{IT}$ , con un valor de 0,597 y el locus que menor  $F_{IT}$  mostró fue el CSRD247=-0,006, el promedio para la población de encontró un  $F_{IT}=0,111\pm 0,056$ , indicando que existe moderado grado de endogamia en el total de la población (tabla 24).

**Tabla 24:** Valores de Fis y Fit por distrito y total

	F <sub>IS</sub>			F <sub>IT</sub>
	VILCA	YAULI	ACORIA	TOTAL
<b>Locus</b>				
<b>BM1258</b>	0,6379	0,7594	0,3573	0,597
<b>BM1818</b>	0,0578	0,0444	-0,011	0,028
<b>CSR247</b>	-0,0456	0,1461	-0,1563	-0,006
<b>HSC</b>	0,0903	0,1403	0,0443	0,087
<b>INRA63</b>	0,1431	0,0766	0,0864	0,114
<b>MAF65</b>	0,0516	-0,0326	0,0242	0,021
<b>McM527</b>	-0,0017	-0,0755	0,0142	-0,021
<b>OarAE129</b>	0,3193	0,088	0,3604	0,313
<b>OarCP49</b>	-0,0082	0,0689	-0,0667	0,003
<b>OarFCB20</b>	0,0673	0,1236	-0,026	0,059
<b>OarFCB304</b>	-0,1078	0,0362	0,1115	0,024
<b>MEDIA</b>	0,1095	0,125	0,067	0,111
<b>ES</b>	0,063	0,067	0,049	0,056

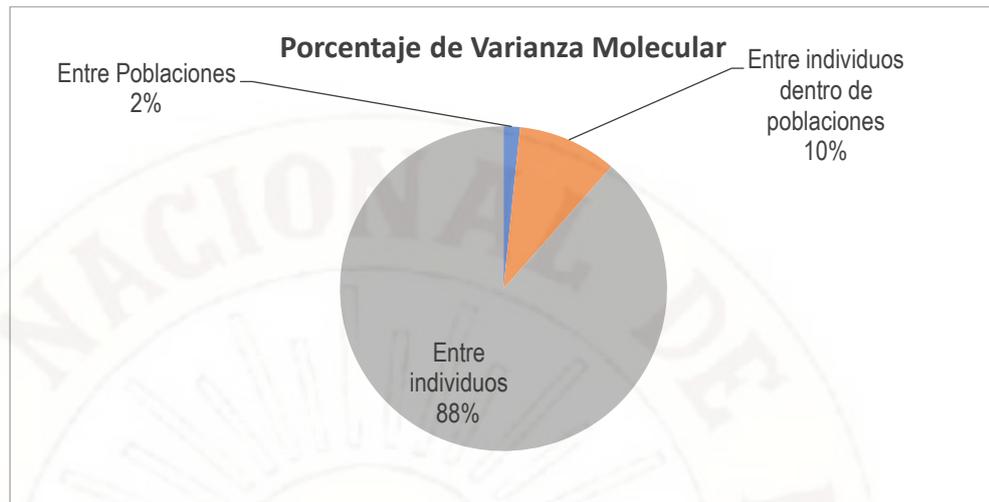
ES=Error Estandar

- **AMOVA**

En la prueba de AMOVA utilizando el modelo de mutación de alelos infinitos (IAM) se obtuvo el valor de  $F_{ST}=0,016$ , lo cual indica que existe variación molecular entre subpoblaciones cerca del 2%, entre individuos dentro de poblaciones = 10% y la variación molecular entre individuos = 88% (tabla 25 y figura 24).

**Tabla 25:** Análisis de Varianza Molecular utilizando el modelo de mutación de sitios infinitos (*Infinite allele Model IAM*)

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Comp. de Varianza	% vari.	F <sub>ST</sub>
Entre Poblaciones	2	19,783	9,891	0,072	2%	0,016
Entre individuos dentro de Poblaciones	110	527,735	4,798	0,436	10%	
Entre individuos	113	443,500	3,925	3,925	88%	
<b>Total</b>	<b>225</b>	<b>991,018</b>		<b>4,433</b>	<b>100%</b>	

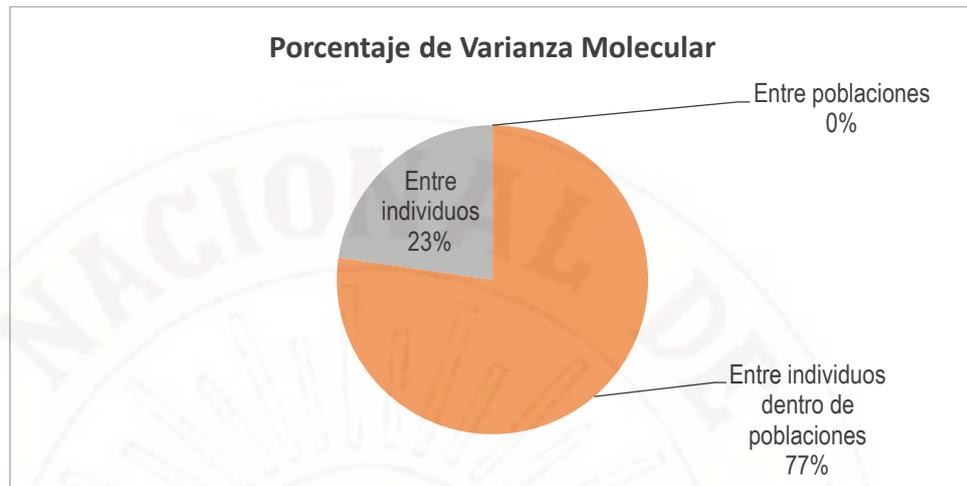


**Figura 24:** Varianza molecular para el modelo de mutación simple

En la prueba de AMOVA utilizando el modelo de mutación gradual o por pasos (*stepwise mutation model*) se obtuvo el estadístico  $R_{ST} = 0,00$ , el cual indica que la variación molecular entre subpoblaciones es 0%, indicando que las subpoblaciones presentan la misma composición a nivel molecular, la variación entre individuos dentro de poblaciones = 77% y la variación genética entre individuos = 23% (tabla 26 y figura 25).

**Tabla 26:** Análisis de Varianza Molecular utilizando el modelo Mutación por Pasos (*Stepwise mutation model SMM*)

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Comp. de Varianza	% vari.	$R_{ST}$
Entre Poblaciones	2	8959,620	4479,810	0,000	0%	0,000
Entre individuos dentro de Poblaciones	110	551922,451	5017,477	2187,579	77%	
Entre individuos	113	72582,000	642,319	642,319	23%	
<b>Total</b>	<b>225</b>	<b>633464,071</b>		<b>2829,898</b>	<b>100%</b>	



**Figura 25:** Varianza molecular para el modelo mutación por pasos

- **Estructura Poblacional**

En el análisis con el programa STRUCTURE, el número de poblaciones asumidas (K) varió entre 1 y 8 con tres interacciones, para encontrar el verdadero valor de K, se utilizó el programa en línea STRUCTURE HARVESTER, el cual indicó que el valor de K ideal es tres Tabla 27, Figura 26, en la figura 27 se observa la composición molecular de cada uno de los distritos, en el distrito de Vilca se puede observar que la mayor cantidad de individuos comparten los mismos alelos, el cual es muy diferente del distrito de Acoria, por otro lado el distrito de Yauli indica que sus individuos comparten alelos idénticos con las poblaciones del distrito de Vilca y Acoria.

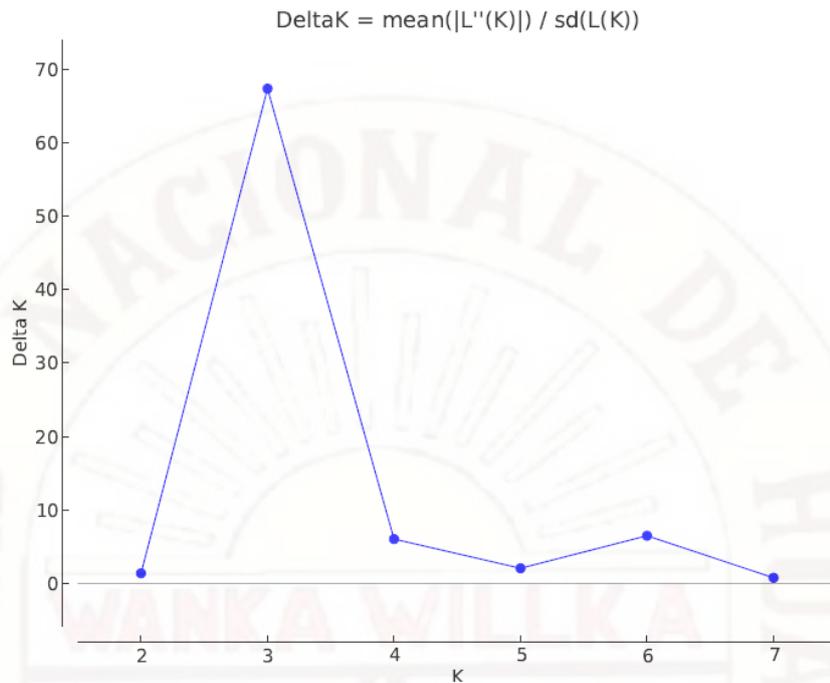


Figura 26: Curva de Delta de K

Tabla 27: Mejor valor para Delta de K

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	3	-4.788,50000	0,20000	-	-	-
2	3	-4.773,23333	11,12400	15,26667	15,43333	1,38739
3	3	-4.773,40000	4,80000	-0,16667	323,20000	67,33333
4	3	-5.096,76667	53,59052	-323,36667	323,83333	6,04274
5	3	-5.096,30000	109,99359	0,46667	227,86667	2,07164
6	3	-5.323,70000	52,43825	-227,40000	340,70000	6,49717
7	3	-5.210,40000	282,76971	113,30000	218,86667	0,77401
8	3	-5.315,96667	534,91854	-105,56667	-	-

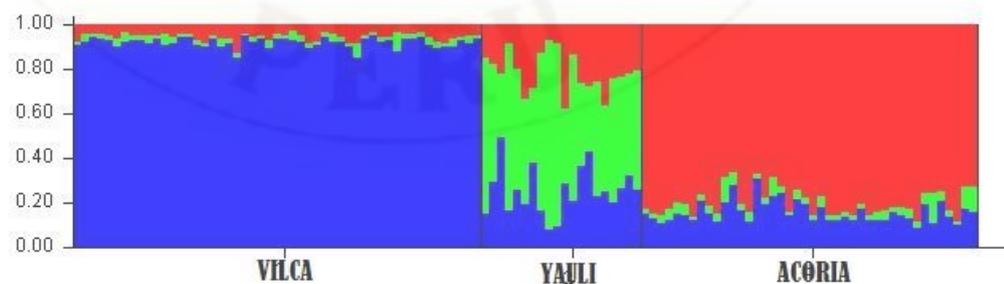


Figura 27: Estructura poblacional de los distritos de Huancavelica

## 4.2. Discusión

### Parámetros de Variabilidad Genética

- **Número de alelos**

Para las subpoblaciones de Vilca, Yauli y Acoria el locus OarCP49 fue el que mayor variabilidad alélica presentó con valores de 19, 11 y 15 alelos respectivamente seguido por el locus OarFCB304, 11, 6 y 12 alelos respectivamente, y el locus OarAE129 fue el que menor cantidad de alelos presentó, 4, 2 y 5 alelos respectivamente, se observan ligeras diferencias entre las subpoblaciones, debido muy probablemente al número de animales empleados en el estudio, se observa mayor número de alelos para subpoblaciones con mayor tamaño muestral, Vilca (n=51), Yauli (n=20) y Acoria (n=42), sin embargo los loci BM1258, BM1818, MAF65 y McM527 reportaron valores similares en todas las subpoblaciones y el locus HSC reportó mayor número de alelos para la subpoblación de Acoria, indicando que el tamaño muestral probablemente no tenga efecto sobre el número de alelos, y que en el caso del locus OarAE129 presenta los valores mínimos muy probable debido a la fijación de estos alelos en las subpoblaciones, la fijación de alelos se da debido a la deriva genética produciendo pérdida de alelos de una generación a otra, en consecuencia la fijación de otros.

En la población total, los loci OarCP49, OarFCB304 y BM1818 presentaron 19, 16 y 15 alelos respectivamente, demostrando que estos loci presentan alta variabilidad alélica, Flores y Sovero(72) reportan a estos mismos loci como los más polimórficos con valores de 24,16 y 17 respectivamente, valores que son ligeramente diferente a los nuestros, considerando la diferencia que existe del tamaño muestral (n=600) para poblaciones de ovinos criollos de la región Pasco, de la misma manera en poblaciones de ovinos de raza Assaf, Asblack y Blackbelly, Morón(23), reporta estos mismos loci con 14, 10 y 17 alelos respectivamente, existe diferencias en el número de alelos debido muy probablemente a que estas son poblaciones de razas y no criollas, ya que el tamaño muestral (n=103) de esta población es similar al nuestro (n=113), en poblaciones donde se ha empleado el locus OarCP49, ha demostrado tener alta

variabilidad alélica, tal como demuestra los reportes para poblaciones de ovinos de la raza Aranesa en España(73), ovinos pantaneños(74) y ovinos de razas sicilianas(75), al igual que el locus BM1818 para poblaciones de ovinos de raza Corriedale en Uruguay(10), ovinos del Norte de España (Castellana, Churra, Black-faced Latxa, Blonde-faced Latxa, Rubia del Molar y Xalda)(76), y el locus OarFCB304 de igual manera para poblaciones de ovinos de Indonesia(22) y ovinos Pantaneños(74), valores que aunque no sean los mismos a los nuestros, indican que son los loci de mayor variabilidad alélica en cada uno de las poblaciones mencionados, por lo que se recomienda seguir empleándolos en estudios genético poblacionales en ovinos, en el otro extremo se encuentra el locus OarAE129 quien fue el que menor variabilidad alélica presentó con 6 alelos, así como para las poblaciones de ovinos criollos de Pasco(72), ovinos de raza Assaf, Blackbelly y Asblack(23) y para los ovinos Pantaneños(74), por lo que se recomienda realizar programas de conservación a fin de no seguir perdiendo la variabilidad alélica para este locus.

En toda la población se encontró 137 alelos, valores que no son tan distantes de los reportados por Flores y Sovero(72), 152 alelos para la población de ovinos criollos de la región Pasco, pero que indican que existe mayor variabilidad alélica para los ovinos criollos de Pasco respecto a los ovinos criollos de Huancavelica, considerando que se ha empleado el mismo panel de marcadores microsatélites en ambas poblaciones, de la misma manera se reportó valores de 91, 123 y 93 alelos para los ovinos de la raza Assaf, Asblack y Blackbelly(23), valores que son diferentes a los nuestros, probablemente debido a que se empleó el uso de un panel de 17 marcadores microsatélite para esta población, además de considerar que son poblaciones de razas, donde los alelos presentes son producto de la constante selección y cruzamientos que han sufrido estos ovinos generación tras generación a fin de fijar características únicas en cada una de ellas y como consecuencia también fijar alelos específicos para cada raza, en Uruguay para la población de ovinos de raza Corriedale se reportaron 86 alelos en total(10), resultado que está por debajo de los que reportamos, probablemente debido a que el estudio se condujo en población de ovinos de

raza, y además considerando que estos estaban emparentados a fin de diagnosticar paternidad de estos ovinos. La población de ovinos criollos de Huancavelica presentó una variabilidad alélica alta en comparación con poblaciones de ovinos de razas, el cual es justificado debido a que estas poblaciones no están sometidas a un programa de mejoramiento genético.

- **Número efectivo de alelos**

En todas las subpoblaciones el locus que mayor número efectivo de alelos ( $N_e$ ) presentó fue el OarCP49 = 10,55, 6,11 y 8,54 número efectivo de alelos para los distritos de Vilca, Yauli y Acoria respectivamente, y el locus que menor número efectivo de alelos presentó fue el OarAE129 = 2,73, 1,47 y 2,11 para los distritos de Vilca, Yauli y Acoria respectivamente, estas presentan pequeñas diferencias, que son proporcionales al número de alelos encontrados para cada locus en los diferentes subpoblaciones, indicando que a mayor cantidad número de alelos encontrados, mayor será el número efectivo de alelos, entre las subpoblaciones el distrito de Vilca presento mayor número efectivo de alelos=62,96, le sigue Acoria=59,51 y Yauli=49,78, valores que son proporcionales al número de alelos en cada subpoblación, para la población en total el locus OarCP49 fue el que mayor número efectivo de alelos presentó con 9,91, valor que es similar al que reportó Carrión(77), 10,04 número efectivo de alelos, reportados en poblaciones de ovinos Pirenaicas orientales en España, el locus OarAE129 presentó 2,27 número efectivo de alelos, siendo el más en bajo en toda la población, resultados que son similares a los ovinos de Indonesia, donde se reportó valores de 3,2 número efectivo de alelos para el locus OarAE129, en promedio la población presento 5,75 número efectivo de alelos por locus, valores que son superiores reportados en la población de ovinos de indonesia(22), donde se encontró un promedio de 3,7 número efectivo de alelos, diferencia que muy probable sea a razón de la cantidad de locus utilizados, ya que en este estudio se empleó 17 loci, así como también al promedio de alelos encontrados en la población=10,6 el cual fue menor a los encontrados en nuestra población que fue 12,45 alelos por locus, en Colombia(6), reportaron 4,676 alelos efectivos, resultado que es ligeramente diferente del nuestro.

- **Frecuencia alélica**

La frecuencia alélica está relacionada directamente con el número de alelos presentes, así pues se observa al locus OarCP49, quien presentó la mayor cantidad de alelos en cada subpoblación, en consecuencia presento mayor variabilidad alélica, con frecuencias alélicas que no superaron el valor de 0,176 para el alelo de 81 pb en Vilca, 0,275 para el alelo de 101 pb en Yauli y 0,190 para el alelo de 81 pb en Acoria, a diferencia del locus OarAE129 quien presentó menor número de alelos y por ende menor variabilidad alélica, las frecuencias de sus alelos fueron superiores, en Vilca la mayor frecuencia fue 0,448 para el alelo de 149 pb, Yauli 0,8 para el alelo 149 pb y Acoria 0,610 para el alelo 149, se observa que las frecuencias de estos son altos, a diferencias de los loci con mayor variabilidad alélica, sin embargo podemos decir que todos los loci son polimórficos debido a que la frecuencias de todos los alelos presentes fue menor a 0,999.

- **Alelos privados**

El locus OarFCB304, fue el que presentó mayor cantidad de alelos privados en cada subpoblación, presentando 4 alelos privados para el distrito de Vilca y otros 4 para el distrito de Acoria, no presentando ninguno para el distrito de Yauli, y el locus McM527 fue el que no presentó ningún alelo privado en ninguna de las subpoblaciones, el distrito de Vilca presentó en total 20 alelos privados, Yauli = 2 alelos y Acoria = 14 alelos privados, esta diferencia contribuye a la variabilidad alélica, por lo general las frecuencias de estos alelos son bajos(57), se sabe que los microsatélites tienen una alta tasa de mutación que varía entre  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ (78), por lo que se presume que su origen se da producto de la mutación donde, según el modelo de mutación por pasos (*stepwise mutation*) puede producirse un cambio en la cantidad de nucleótidos ya sea por perdida o ganancia de nucleótidos(46, 78), la frecuencia alélica de los alelos privados generalmente no superaron los 0,05 y algunos los 0,01, por lo que según Hale(57), podrían clasificarse en alelos raros (frecuencia  $<0,05$ ) y alelos muy raros (frecuencia $<0,01$ ), los cuales deberían considerarse al momento de

plantear programas de conservación y mejoramiento genético, a fin de conservar estos alelos en las futuras generaciones.

La presencia de alelos nulos de los loci BM1258, HSC, INRA63 y OarAE129 en la población total se debería principalmente a la mutación en el punto de hibridación del iniciador a la cadena de ADN molde, aumentando las frecuencias de homocigotos(34-36), provocando un déficit de heterocigotos como consecuencia un desequilibrio de Equilibrio H-W(46).

Los loci BM1258 y OarAE129 no lograron amplificar en su totalidad, debido probablemente a que el ADN extraído estuvo fragmentado en las regiones de anillamiento o hibridación de los cebadores(79, 80), siendo este también un indicador de la presencia de alelos nulos(81), así mismo se ha reportado que estos loci están asociados al conteo de células somáticas en vacunos productores de leche(82-87), probablemente debido a la asociación que existe entre estos loci y el conteo de células somáticas, estas no habrían amplificado(88, 89).

- **Heterocigosidad**

Los niveles de heterocigosidad observada para los loci BM1258 y OarAE129, fueron los valores más bajos, Vilca=0,258 y 0,438, Yauli=0,176 y 0,3 y Acoria=0,410 y 0,341, comparado con el locus OarCP49 que mostró valores de: Vilca=0,922, Yauli=0,8 y Acoria=0,952, los cuales están entre los valores más altos en cada subpoblación, sólo los loci BM1258 y OarAE129 mostraron valores de heterocigosidad observada inferiores a 0,5, el cual se podría atribuirse al reducido número de alelos presentes y a la presencia de alelos nulos, en promedio Vilca mostró un  $H_o=0,721$ , Yauli  $H_o=0,661$  y Acoria  $H_o=0,741$ , indicando que existe ligeramente mayor frecuencia de individuos heterocigotos observados que homocigotos en cada subpoblación.

En toda la población de la misma manera los loci BM1258 y OarAE129 fueron los que mostraron los valores más bajos de 0,303 y 0,376 respectivamente, Flores y Sovero(72), reportaron valores de 0,504 y 0,508 para los mismos loci en poblaciones de ovinos criollos de la región Paso, valores que son superiores a los nuestros, indicándonos que en nuestra población hay un déficit de

heterocigotos para estos loci, Morón(23) por otro lado reporta valores de 0,43 y 0,363 para los mismos loci, en poblaciones de ovinos de la raza Blackbelly, Assaf y Asblack en la región Lima, valores que casi se acercan a los nuestros, considerando que son poblaciones de razas, donde los niveles de heterocigosidad son bajas producto de la selección y cruzamientos en esta población.

La población mostró 0,719 de heterocigosidad observada, valor que es similar a lo que mostró los ovinos criollos de Paco con 0,739(72), y a las poblaciones de ovinos en Jordan donde se reportó un valor de 0,734 para Ho(21), por otro lado también se encontró poblaciones con valores ligeramente bajos al nuestro como en: ovinos de raza Aranesa=0,648 de España(73), 0,683 para los ovinos de Colombia(6) y 0,62 para los ovinos Pantaneños(74), el cual es justificado, debido a que estos estudios se condujeron sobre poblaciones de razas; las poblaciones de ovinos criollos presentan mayor heterocigosidad observada que las poblaciones de ovinos de raza, considerando que las poblaciones de razas han pasado por un programa de mejoramiento genético, contrario a lo que pasa con las poblaciones de ovinos criollos.

En cuanto a la heterocigosidad esperada, el locus OarAE129 mostró valores de 0,634, 0,320 y 0,525 para los distrito de Vilca, Yauli y Acoria respectivamente, siendo en Yauli donde se muestra el menor valor para este locus y por ende una baja variabilidad por el exceso de homocigotos esperados para este locus, indicando también que este locus no es muy útil para análisis de parentesco en el distrito de Yauli, por presentar valor inferior a 0,5, contrario a lo que muestra el locus OarCP49, que muestra valores de 0,905, 0,836 y 0,883 para los distritos de Vilca, Yauli y Acoria respectivamente, presentando estos alta variabilidad por la cantidad esperada de heterocigotos. En promedio se muestra valores de 0,792, 0,732 y 0,771 para los distritos de Vilca, Yauli y Acoria, valores que no presentan diferencias entre sí.

para toda la población el locus OarAE129 mostró el valor más bajo con 0,560 de heterocigosidad esperada, valor similar a 0,549, que fue reportado para los ovinos de raza Blackbelly, Assaf y Asblack de la región Lima(23), y diferente de

los reportados para los ovinos criollos de la región Pasco 0,626(72), factores como el número de alelos y la presencia de alelos nulos, hacen que exista diferencia entre estas poblaciones criollas, por otro lado el locus OarCP49 fue el que mayor valor reportó en toda la población  $H_E=0,899$ , valor similar a los reportados en los ovinos criollos de Pasco  $H_E=0,883$ , y similar a los ovinos de raza Blackbelly, Assaf y Asblack de la región Lima  $H_E=0,813$ , ninguno de los loci empleados reportó valores inferiores a 0,5 a nivel poblacional, demostrando que son útiles para el análisis de parentesco a nivel poblacional.

En promedio la población mostró un  $H_E=0,790$ , valor similar al de los ovinos criollos de Pasco  $H_E=0,796(72)$ , ovinos de Colombia  $H_E=0,770(6)$ , ovinos Pantaneños  $H_E=0,71(74)$ , ovinos de raza Aranasa  $H_E=0,740(73)$  y a los ovinos de Jordan  $H_E=0,734(21)$ , la heterocigosidad representa una mejor medida de la variación genética, ya que estos valores son precisos, esta medida indica que existe variabilidad genética en nuestra población.

- **Índice de contenido polimórfico (PIC)**

Botstein *et al*(43) menciona que:  $PIC > 0,5$  altamente informativo,  $0,5 > PIC > 0,25$ , medianamente informativo y  $PIC < 0,25$  ligeramente informativo, considerando esta premisa podemos ver en nuestros resultados que solo el locus OarAE129 tiene un  $PIC=0,486$  el cual es medianamente informativo, valor que está por debajo de lo reportado para la población de ovinos Hamdani  $PIC=0,562$  en la región Kurdistan de Iraq(90), y aún más por debajo de lo reportado para ovinos Pantaneños  $PIC=0,72$ , en España(74), demostrando de esta manera que este locus no brinda mucha información para nuestra población, pero sí para otras poblaciones de ovinos, por lo que se recomienda seguir empleando en otras poblaciones, ya que todas las poblaciones reciben un manejo y comportamiento diferente, por otro lado el locus OarCP49 presentó  $PIC=0,891$  valor que fue superior a lo reportado para ovinos Pantaneños  $PIC=0,76$  en España, indicando que fue el más informativo para nuestra población, es muy importante conocer el grado de información que brindan cada uno de los loci, a fin de verificar la veracidad de la información obtenida, así como para decidir su empleo en futuras investigaciones relacionadas con estos loci.

En promedio se encontró un  $PIC=0,7625$  para todos los loci empleados en el estudio de toda la población, este valor fue similar a lo reportado para ovinos Hamdani  $PIC=0,744(90)$ , ovino Pantaneño  $PIC=0,71(74)$  y ovinos de Colombia  $PIC=0,741(6)$ , indicando que en panel empleado resultó ser altamente informativo para nuestra población, por lo que se recomienda seguir empleándolos en investigaciones futuras.

- **Equilibrio Hardy-Weinberg**

El equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) se estimó mediante déficit y exceso de heterocigotos, mostrando en el distrito Vilca a los loci BM1258, INRA63 y OarAE129, quienes no se encuentran en EHW por déficit de heterocigotos, y al locus OarFCB304 por exceso de heterocigotos, en el distrito de Yauli se encontró a los loci BM1258 y HSC en desequilibrio H-W por déficit de heterocigotos, no habiendo exceso de heterocigotos para ningún locus, en el distrito de Acoria se encontró a los loci BM1258 y OarAE129 en desequilibrio H-W por déficit de heterocigotos, no habiendo ninguno por exceso de heterocigotos, se observa que el locus BM1258 presentó desequilibrio H-W para toda las subpoblaciones, por el déficit de heterocigotos, debido a la presencia de alelos nulos o procesos de endogamia para este locus en todas las subpoblaciones, por otro lado el exceso de heterocigotos presentado por el locus OasFCB304 en el distrito de Vilca, podría evidenciar la alta tasa de mutación que hay, según el modelo de mutación por pasos se generan nuevos alelos, el cual pudo haber aumentado la heterocigosidad para este locus.

En la población en general, los loci resultaron estar en equilibrio H-W por no presentar exceso de heterocigotos, sin embargo los loci BM1258, HSC, INRA63 y OarAE129 resultaron estar en desequilibrio H-W por presentar un déficit de heterocigotos, por lo tanto se asume que existe presencia de alelos nulos, así como posibles procesos de endogamia, los cuales contribuyen al déficit de heterocigotos. mutación en la población, esto para los loci que muestran desequilibrio H-W, sin embargo el 64% de los loci muestran que existe equilibrio HW, mostrándonos ausencia de migración, mutación o deriva genética para estos locus.

## Parámetros de Endogamia, AMOVA y Estructura Genética

- **Índice de endogamia**

Los valores de coeficiente de endogamia, muestra valores para el locus BM1258 0,6379, 0,7594 y 0,3573 para los distritos de Vilca, Acoria y Yauli respectivamente, valores que son altos debido a la presencia de alelos nulos y procesos de endogamia para este locus, generando déficit de heterocigotos, los cuales fueron observados en el test de equilibrio H-W, por el contrario el locus OarFCB304 mostro valores de -0,1078, 0,0362 y 0,1115 para los distritos de Vilca, Yauli y Acoria respectivamente, mostrando en Vilca que no existe endogamia debido al exceso de heterocigotos, el cual es corroborado en el test de equilibrio H-W. El distrito de Vilca mostro  $F_{IS}=0.1095$ , Yauli  $F_{IS}=0,125$  y Acoria  $F_{IS}=0,067$ , mostrando un índice de endogamia medio en los tres distritos, el proceso de endogamia se da por los cruzamientos emparentados, por lo que se asume que existe cruzamientos de este tipo en las subpoblaciones, aunque estas no sean frecuentes, ya que los cruzamientos no son dirigidos, aunque se debería considerar un número reducido de reproductores machos en cada rebaño, motivo por el cual se estaría originando un índice de endogamia entre bajo y medio en los diferentes subpoblaciones, valores similares se reportaron para: los ovinos de Jordan, con un  $F_{IS}=0,078(21)$ , ovinos Pantaneños  $F_{IS}=0,12(74)$ , ovinos de Colombia  $F_{IS}=0,094(6)$  y ovinos de raza Blackbelly, Assaf y Asblack de la región Lima, donde se reportó  $F_{IS}=0,07686(23)$ , siendo este un índice de endogamia medio.

Para toda la población se estimó el estadístico  $F_{IT}$ , donde se encontró que el locus BM1258 fue el que mayor índice reporto  $F_{IT}=0,597$  seguido por el locus OarAE129  $F_{IT}=0,313$ , siendo estos lo más altos para toda la población y reportando un índice de endogamia muy alto en toda la población, y los loci que reportaron valores negativos fueron CSR247  $F_{IT}=-0,006$  y MCM527  $F_{IT}=-0,021$ , en promedio la población reportó  $F_{IT}=0,111$ , siendo este un índice de endogamia moderado para toda la población, indicando que existe conexión genética entre las subpoblaciones.

- **AMOVA y Estructura Genética**

La prueba de AMOVA mostró que existe una diferenciación de 2% entre las poblaciones, con un  $F_{ST}=0,016$ , este fue calculado asumiendo que en la población existe un modelo de mutación de alelos infinitos en el cual se asume que cada mutación crea un alelo nuevo, esto fue propuesto por Wright(42), resultado que es diferente cuando se asume que existe un modelo de mutación por paso (*Stepwise mutation model*), donde se asume que la mutación se da por inserción o deleción de una repetición, esto implica que dos alelos que difieren en una sola repetición están más relacionados, mediante el uso de este modelo se estima el estadístico  $R_{ST}$  propuesto por Slatkin(44) que el análogo del estadístico  $F_{ST}$  en el cual según nuestros resultados muestra 0% de diferenciación entre las poblaciones, por lo tanto se asume que las poblaciones son iguales, reportando  $R_{ST}=0,00$ , entonces, se observa que existe diferencia en el resultado final según al modelo de mutación propuesto, pero este último según Slatkin es ideal para trabajar con marcadores microsatélites debido al tipo de mutación que presentan los marcadores microsatélites, sin embargo aun tomando en cuenta los valores de  $F_{ST}$  se observa que la diferenciación entre subpoblaciones es baja, probablemente debido a la migración que sufren estos animales a través de la comercialización entre productores, generando así un flujo genético entre las subpoblaciones y reduciendo la diferenciación entre estas, muchos autores estimaron la diferenciación genética entre poblaciones utilizando el estadístico propuesto por Wright(42), para la población de ovinos de la raza Blackbelly, Assaf y Blackbelly se reportó un  $F_{ST}=0,11$  indicando que existe una diferenciación de aproximadamente el 11%(23), un valor superior al nuestro, debido muy probablemente porque en este estudio se trata de razas diferentes, en Colombia reportaron un  $F_{ST}=0,039$  mostrando un grado de diferenciación aproximada del 3.9%, es ligeramente diferente al nuestro, tomando en cuenta que en este estudio trabajaron con 13 razas diferentes de ovinos(6).

## CONCLUSIONES

- La población de ovinos de la provincia de Huancavelica presentó una considerable cantidad de alelos, así como una heterocigosidad del 79%, también se considera que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg excepto para loci BM1258, HCS, INRA63 y OarAE129, también se muestra un grado de diferenciación entre individuos del 88%, considerando estos datos se puede concluir que existe una alta variabilidad genética en la provincia de Huancavelica, aceptándose de esta manera la hipótesis propuesta en el presente estudio.
- Se encontró un índice de endogamia de 0,111 siendo este un índice de endogamia moderado en toda la población de la provincia de Huancavelica, con lo que se concluye que existe índice de endogamia medio, más no es alto como se propuso en la hipótesis.
- Tomando en cuenta el modelo de mutación indicado para los microsatélites se puede afirmar que no existe diferenciación genética entre las subpoblaciones de ovinos criollos de Huancavelica, por lo que se rechaza la hipótesis propuesta.

## RECOMENDACIONES

- Se ha encontrado una variabilidad genética alta en la población de ovinos de Huancavelica, por lo cual se recomienda plantear programas de conservación a fin de no perder esta variabilidad existente, asimismo se recomienda plantear programas de mejoramiento genético tomando en cuenta la conservación de la variabilidad genética.
- Implementar un programa adecuado para ovinos criollos en el cual se pueda controlar el índice de endogamia.
- Seguir caracterizando molecularmente más poblaciones de ovinos criollos, a fin de poder diseñar programas de conservación y mejoramiento genético acordes a la realidad de cada población.
- Los marcadores microsatélites empleados resultaron ser altamente informativos por lo que se recomienda seguir empleándolos en este tipo de estudios, asimismo incluir algunos más que ayuden a mejorar los resultados de estudios genéticos poblacionales.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Rischkowsky B, Pilling D. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura: FAO; 2010.
2. Ferreira ME, Grattapaglia D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético: Embrapa; 1998.
3. FAOSTAT. FAO Dirección de Estadística. 2013.
4. INEI. IV Censo Nacional Agropecuario. 2012.
5. de la Barra R, Carvajal A, Uribe H, Martínez M, Gonzalo C, Arranz J, et al. El ovino criollo Chilote y su potencial productivo. *Animal Genetic Resources/Ressources génétiques animales/Recursos genéticos animales*. 2011;48:93-9.
6. Ocampo Gallego RJ. Caracterización genética de ovinos en Colombia por medio de marcadores microsatélites. 2014.
7. Montesinos IS, Catachura A, Sánchez J, Franco JL, Arnhold E, McManus C, et al. Caracterización de ovinos en el litoral sur del Perú. *Animal Genetic Resources / Resources génétiques animales / Recursos genéticos animales*. 2015;56:55-62.
8. Delgado J, Barba C, Camacho M, Sereno F, Martinez A, Vega-Pla J. Caracterización de los animales domésticos en España. *Animal Genetic Resources/Recursos génétiques animales/Recursos genéticos animales*. 2001;29:7-18.
9. Arranz J-J, Bayón Y, San Primitivo F. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genetics Selection Evolution*. 2001;33(5):529.
10. Peraza P, Rincón G, Ravagnolo O, Dalla Rizza M, Kelly L. Desarrollo de un multiplex de microsatélites para diagnóstico de paternidad en ovinos Corriedale del Uruguay. *Agrociencia Uruguay*. 2013;17(1):114-9.
11. Barrera G, Martínez R, Pérez J, Polanco N, Ariza F. Evaluación de la variabilidad genética en ganado Criollo Colombiano mediante 12 marcadores microsatélites. *Animal Genetic Resources Information*. 2006;38:35-45.
12. Sun W, Chang H, Ji D, Liao X, Du L, Lu S, et al. Analysis on Genetic Diversity and Isolation Mechanism by Distance of Different Ecological Type Sheep Breeds in Mongolia Sheep Group. *Journal of Genetics and Genomics*. 2007;34(11):1001-9.

13. Lara M, Contel E, Sereno J. Caracterización genética de poblaciones cebuínas a través de marcadores moleculares. *Archivos de zootecnia*. 2005;54(206):295-303.
14. Villasmil-Ontiveros Y, Román-Bravo R, Yáñez-Cuéllar L, Contreras G, Jordana J, Aranguren-Méndez J. Diversidad genética de la raza criollo limonero utilizando marcadores de ADN microsatélites. *Revista Científica*. 2008;18(4):415-23.
15. Paredes Rojas G. Caracterización molecular de las llamas (*Lama glama*) Ch'aku y Ccara del Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas del Centro Experimental ILLPA-INIA anexo Quimsachata, usando marcadores microsatélites. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Ciencias; 2013.
16. Yalta Macedo CE. Variabilidad genética poblacional de alpacas *Vicugna pacos* determinada por marcadores microsatélites en el Centro Piloto Munay Paqocha y del Fundo Itita, Puno-Perú. 2014.
17. Ağaoğlu ÖK, Ertuğrul O. Assessment of genetic diversity, genetic relationship and bottleneck using microsatellites in some native Turkish goat breeds. *Small Ruminant Research*. 2012;105(1):53-60.
18. Brown R, Acosta J, Sarah-Rey S, Brito JJP, Martínez A, Cabello A, et al. Caracterización genética de la cabra Majorera de Fuerteventura con microsatélites. *Archivos de zootecnia*. 2005;54(206):261-6.
19. Aranguren-Méndez J, Portillo-Ríos M, Rincón X, Martínez A, Dickson L, D'Aubeterre R. Diversidad genética en la cabra criolla venezolana mediante análisis con microsatélites. *Revista Científica*. 2013;23(003).
20. Othman OE, Pariset L, Balabel EA, Marioti M. Genetic characterization of Egyptian and Italian sheep breeds using mitochondrial DNA. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2015;13(1):79-86.
21. Al-Atiyat RM, Salameh NM, Tabbaa MJ. Analysis of genetic diversity and differentiation of sheep populations in Jordan. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2014;17(4):168-73.
22. Jakaria J, Zein M, Sulandari S, Subandriyo S, Muladno M. The use of Microsatellite Markers to Study Genetic Diversity in Indonesian sheep. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 2012;37(1):1-9.

23. Morón Barraza J. Caracterización molecular en ovinos (*Ovis aries*) Assaf, Blackbelly y Asblack utilizando marcadores microsatélites. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Zootecnia. Departamento de Producción Animal; 2013.
24. Torrent M. La oveja y sus producciones. 1986.
25. Díaz R. Cadena productiva de ovinos: Ministerio de Agricultura y Riego, Perú; 2013.
26. Aliaga Gutiérrez JL. Producción de Ovinos 2006.
27. Gutiérrez JLA. Posibilidades del Desarrollo de la Crianza Ovina en el Perú.
28. Azofeifa-Delgado Á. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*. 2006;17(2):221-42.
29. Alcántara MR. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*. 2007:541-66.
30. Cornejo R, Serrato D, Aguilar B, Munive M. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC, UAM-I. 2014.
31. Eguiarte LE. *Ecología molecular*: Instituto Nacional de Ecología; 2007.
32. Aranguren-Méndez J, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review). 2005.
33. Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. *Introduction to conservation genetics*: Cambridge university press; 2002.
34. Dawson RJ, Gibbs HL, Hobson KA, Yezerinac SM. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity*. 1997;79 ( Pt 5):506-14.
35. Neumann K, Wetton JH. Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow *Passer domesticus*. *Molecular Ecology*. 1996;5(2):307-9.
36. Mundy N, Woodruff D. Polymorphic microsatellite markers in the loggerhead shrike *Lanius ludovicianus* isolated from a library enriched for CA repeats. *Molecular Ecology*. 1996;5(6):811-3.
37. Crow JF, Kimura M. *An introduction to population genetics theory*. An introduction to population genetics theory. 1970.

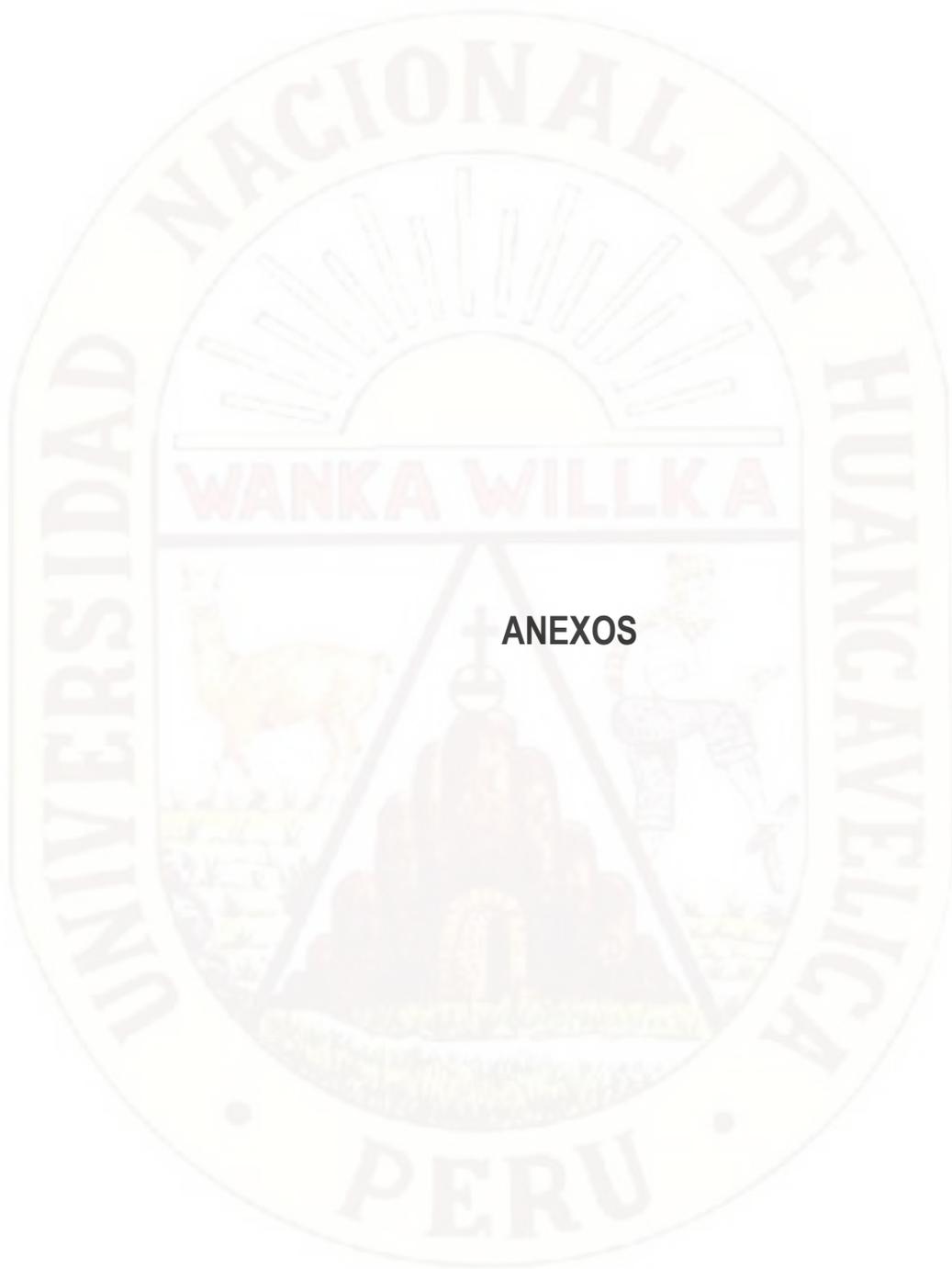
38. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of human genetics*. 1977;41(2):225-33.
39. Zapata C. La variabilidad genética de las poblaciones. *Genética de la acuicultura*. 1987:33-57.
40. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908;28(706):49-50.
41. Weinberg W. Über den nachweis der vererbung beim menschen. *Jh Ver vaterl Naturk Wurttemb*. 1908;64:369-82.
42. Wright S. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*. 1965;19:395-420.
43. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*. 1980;32(3):314.
44. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 1995;139(1):457-62.
45. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945-59.
46. Aranguren-Méndez J, Gómez M, Jordana J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. *Heredity*. 2002;89(3):207.
47. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(12):3321-3.
48. Montoya C, Arias DM, Rey L, Rocha PJ. Caracterización molecular de materiales *Elaeis guineensis* Jacq. procedentes de Angola.
49. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*. 1984;38(6):1358-70.
50. Wright S. *The theory of gene frequencies*: University of Chicago Press Chicago; 1969.
51. Avilés Esquivel D. Caracterización genética del cuy doméstico de América del Sur mediante marcadores moleculares. 2016.

52. Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*. 2002;11(2):155-65.
53. Cockerham CC. Analyses of gene frequencies. *Genetics*. 1973;74(4):679-700.
54. Michalakis Y, Excoffier L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. 1996;142(3):1061-4.
55. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131(2):479-91.
56. Álvarez-Gayou JL. Cómo hacer investigación cualitativa. Fundamentos y metodología. Colección Paidós Educador México: Paidós Mexicana. 2003.
57. Hale ML, Burg TM, Steeves TE. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLOS ONE*. 2012;7(9):e45170.
58. Danusevicius D, Kavaliauskas D, Fussi B. Optimum Sample Size for SSR-based Estimation of Representative Allele Frequencies and Genetic Diversity in Scots Pine Populations. *Baltic Forestry*. 2016;22(2):194-202.
59. DE LA VIDA SEA. Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados de Campo para Documentar Incidentes de Mortandad de Fauna Silvestre en Agroecosistemas.
60. Di Stasio L. Applied Genetics in Sheep and Goats. Panels of markers for parentage verification tested at the 2001/02 ISAG comparison test. 2001.
61. Alfonso L, Parada A, Legarra A, Ugarte E, Arana A. The effects of selective breeding against scrapie susceptibility on the genetic variability of the Latxa Black-Faced sheep breed. *Genetics Selection Evolution*. 2006;38(5):495.
62. De Gortari MJ, Freking BA, Cuthbertson RP, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, et al. A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mammalian genome*. 1998;9(3):204-9.
63. Montgomery G, Crawford A, Penty J, Dodds K, Ede A, Henry H, et al. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature genetics*. 1993;4(4):410-4.

64. Sambrook JR, Russell D. DW. 2001 Molecular cloning: a laboratory manual. Quarterly Review of Biology. 2001;76(3):348-9.
65. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American. 1990;262(4):56-61.
66. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics. 2012;28(19):2537-9.
67. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Resources. 2004;4(3):535-8.
68. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology. 2007;16(5):1099-106.
69. Raymond M. GENEPOP: Population genetics software for exact tests and ecumenism. Vers. 1.2. J Hered. 1995;86:248-9.
70. Pritchard JK, Wen W, Falush D. Documentation for structure software: version 2. 2003.
71. Earl D. Structure harvester version 0.6. 1. Distributed over the internet at [http://taylor0biologyucla.edu/structure\\_harvester](http://taylor0biologyucla.edu/structure_harvester) Accessed. 2013;23.
72. Flores Casas ME, Sovero Ambrosio LE. Caracterización molecular del ovino criollo en la región Pasco mediante el uso de marcadores microsatélites. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrion, Pasco (Perú). Facultad de Cincias Agropecuarias. Escuela de Formación Profesional de Zootecnia.; 2015.
73. Marmi J, Jordana i Vidal J, Parés Casanova P-M. Análisis genético de la raza ovina aranesa con marcadores microsatélite. Archivos de Zootecnia, 2007, vol 56, núm 1, p 435-439. 2007.
74. do Amaral Crispim B, de Oliveira Seno L, do Egito AA, de Vargas Junior FM, Grisolia AB. Application of microsatellite markers for breeding and genetic conservation of herds of Pantaneiro sheep. Electronic Journal of Biotechnology. 2014;17(6):317-21.

75. Tolone M, Mastrangelo S, Rosa A, Portolano B. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research*. 2012;102(1):18-25.
76. Álvarez I, Royo L, Fernandez I, Gutiérrez J, Gómez E, Goyache F. Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *Journal of animal science*. 2004;82(8):2246-52.
77. Carrión Bonilla CA. Estudio de la diversidad y relaciones genéticas de seis razas ovinas pirenaicas orientales: ESPAÑA/Universidad Autónoma de Barcelona/2012; 2012.
78. Demarchi DA. Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de antropología biológica*. 2009;11(1).
79. Butler JM. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*: Academic Press; 2011.
80. Velázquez LPA, Martínez MdCA, Romero AC. Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. 2014:1.
81. Dakin E, Avise J. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*. 2004;93(5):504.
82. Chockalingam A. *Genomic and Immunological Approaches to Control Gram-negative Intramammary Infections in Dairy Cattle*. 2006.
83. Chu M-X, Zhou G-L, Jin H-G, Shi W-H, Cao F-C, Fang L, et al. Study on relationships between seven microsatellite loci and somatic cell score in Beijing Holstein cows. *Yi Chuan Xue Bao*. 2005;32(5):471-5.
84. Gupta JP, Bhushan B, Panigrahi M, Ranjan S, Asaf VM, Kumar A, et al. Study on genetic variation of Short Tandem Repeats (STR) markers and their association with Somatic Cell Scores (SCS) in crossbred cows. *Indian J Anim Res*. 2015;49(5):595-8.
85. Hai-Guo J, Guo-li Z, Yang C, Ming-Xing C. Study on genetic variation of 4 microsatellite DNA markers and their relationship with somatic cell counts in cow milk. *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*. 2003;16(10):1535-9.

86. Prajapati BM, Gupta JP, Pandey DP, Parmar GA, Chaudhari JD. Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. *Veterinary World*. 2017;10(1):112-20.
87. Schulman N, Viitala S, de Koning D-J, Virta J, Mäki-Tanila A, Vilkki J. Quantitative trait loci for health traits in Finnish Ayrshire cattle. *Journal of dairy science*. 2004;87(2):443-9.
88. Kühn C, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, et al. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *Journal of dairy science*. 2003;86(1):360-8.
89. Moro Méndez J, F. Hayes J. Métodos de mapeo de loci de rasgos cuantitativos y sus aplicaciones potenciales en la industria lechera. 2012. 2012;44(3):22.
90. Al-Barzinji Y, Lababidi S, Rischkowsky B, Al-Rawi A, Tibbo M, Hassen H, et al. Assessing genetic diversity of Hamdani sheep breed in Kurdistan region of Iraq using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(67):15109-16.



**ANEXOS**

**ANEXO 1:** Población de ovinos en Huancavelica

<b>Cuadro 1:</b> Población de ovinos en la Región de Huancavelica			
<b>PROVINCIAS Y DISTRITOS</b>	<b>OVINO</b>	<b>PROVINCIAS Y DISTRITOS</b>	<b>OVINO</b>
ACOBAMBILLA	58.000	CUENCA	7.430
LIRCAY	48.175	STO DOM. CAPILLAS	7.315
VILCA	46.055	LOCROJA	6.985
YAULI	45.645	ÑAHUINPUQUIO	6.935
PILPICHACA	43.140	PACHAMARCA	6.730
HUANCAVELICA	38.780	CHINCHIHUASI	6.725
ASCENCION	29.555	HUAMATAMBO	6.640
CHUPAMARCA	22.650	CCOCHACCASA	6.600
ACORIA	21.455	MOLLEPAMPA	6.545
COLCABAMBA	21.140	CONAICA	6.390
SANTA ANA	19.535	ROSARIO	6.325
MANTA	19.515	POMACCOCHA	6.265
SANTIAGO DE CHOCORVOS	19.295	DANIEL HERNANDEZ	6.160
NUEVO OCCORO	17.835	HUACHOCOLPA	6.060
AURAHUA	16.335	ACOBAMBA	5.850
CONGALLA	16.260	HUANDO	5.625
CASTROVIRREYNA	15.835	HUAYACUNDO ARMA	5.390
MOYA	15.800	CORDOVA	5.265
LARAMARCA	15.305	TANTARA	5.185
S. ANT. DE CUSICANCHA	15.175	JULCAMARCA	5.125
OCOYO	15.045	PILCHACA	5.075
PAUCARA	14.675	QUITO ARMA	4.965
ARMA	14.615	SAN ISIDRO DE H.	4.820
ANCHONGA	14.510	ANDABAMBA	4.535
PALCA	13.985	SALCAHUASI	4.495
PAUCARBAMBA	13.890	AYAVI	4.445
QUERCO	13.750	AHUAYCHA	4.318
S.F. DE SANGAYAICO	13.165	CAJA ESPIRITU	4.235
SANTIAGO DE QUIRAHUARA	12.905	PAMPAS	4.070
PAZOS	12.755	CALLANMARCA	3.795
CAPILLAS NORTE	12.430	HUACHOCOLPA	3.755
HUARIBAMBA	12.417	TICRAPO	3.755
ANTA	12.240	S.A DE ANTAPARCO	3.750
SURCUBAMBA	11.850	MARCAS	3.690

TINTAY PUNCU	11.670	EL CARMEN	3.370
HUACHOS	11.525	SAN JUAN DE CASTROV.	3.340
CHINCHO	9.475	COCAS	3.100
ANCO	9.280	S. CLARA DE COSME	2.854
LARIA	9.260	S. PEDRO DE CORIS	2.635
SALCABAMBA	9.244	QUISHUAR	1.715
ACRAQUIA	8.665	S. MARCOS DE ROCHACC	1.630
HUAYLLAHUARA	8.635	LA MERCED DE CCASIR	1.175
SECCLLA	8.208	HUAYLLAY GRANDE	1.155
ACOSTAMBO	8.130	S. MIGUEL DE MAYOCC	592
HUANCA-HUANCA	7.645	MARISCAL CACERES	475
TAMBO	7.500	SANTO TOMAS DE PATA	335
HUAYTARA	7.480	IZCUCHACA	310
CHURCAMPA	7.463		

Fuente: Dirección Regional Agraria 2014

## ANEXO 2: Encuesta realizada a los criadores de ovinos criollos

ENCUESTA OVINOS CRIOLLOS	
Propietario: _____	Fecha: ____/____/____
Edad: _____	Sexo: F ( ) M ( )
Región: _____	Provincia: _____
Distrito: _____	Localidad: _____
<b>A. INFORMACIONES GENERALES</b>	
1. ¿Qué animales cría conjuntamente con los ovinos? ( ) Cabras ( ) Bovinos ( ) Porcinos ( ) Camélidos ( ) Otros _____	
2. Número actual de ovinos _____ a. Hembras : _____ b. Machos _____	
3. Identificación de animales Si ( ) No ( ) Especificar (arete, otros): _____	
4. ¿Cuáles son los sistemas de producción observada? ( ) Extensiva ( ) Semi extensiva ( ) Mixta	
5. Tipo de Alimentación a) Balanceado b) Pastos Naturales c) Pastos cultivados d) otros _____	
6. Capacitación recibidas: Si ( ) No ( ) Frecuencia..... Tema: _____	
7. Vacunaciones: Si ( ) No ( ) Frecuencia: 1 vez al año ( ) 2 vez al año ( )	
8. Problemas sanitarios más comunes: _____	
9. Cruzamientos: Al azar ( ) Dirigido ( )	
10. Presencia de reproductores : : N° ( ) Hembras ( ) Machos	
<b>B. DESCRIPCIÓN</b>	
1. Algunas características particulares: _____	
<b>C. APTITUDES</b>	
. Indicar los usos principales de esta población: ( ) Autoconsumo ( ) Reproductores ( ) Carne ( ) Leche ( ) Investigación ( ) Otros _____	
2. Producción por animal: Lana (..... libras por Vellón) Carne ( .....kg/animal) Frecuencia de esquila de animales por año ( ), Edad promedio al sacrificio en años ( )	
3. Lugar de venta: ( ) Mercado ( ) Chacra ( ) Distribuidor Costo venta Carne S/._____ frecuencia de venta: _____ Costo venta Lana S/._____ frecuencia de venta: _____	

**ANEXO 3:** Ficha de campo utilizada para el recojo de información

**FICHA CAMPO OVINOS CRIOLLOS**

RESPONSABLES

FECHA

COMUNIDAD

DISTRITO

PROVINCIA

DEPARTAMENTO

Nº	COD. MUESTRA LABORATORIO	COD. CAMPO	ARETE	REGISTRO/ TATUAJE/ OTROS	SEX O	COLOR	EDAD	PROPIETARIO	Nº FOTO	PUNTO DE COLECTA	COORDENADAS DE COLECTA	ALTURA	OBSERVACIONES
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													

#### ANEXO 4: Ilustración de toma de muestras



Equipo responsable de muestreo de ovinos criollos de izquierda a derecha: Prodctor de ovinos criollos, Blga. Wendy (consultora del Proyecto PI\_094), Ing Eudosio (líder del proyecto PI\_094), MV. Mario (especialista en ovinos INIA-Santa Ana), Alan (tesista proyecto PI\_094), Jhon (responsable de transporte). B). Rebaño de ovinos criollos distrito de Vilca C). Sujeción de ovinos criollos D). Toma de muestra sanguínea a nivel de la yugular.

## ANEXO 5: Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de células blancas

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE LINFOCITOS

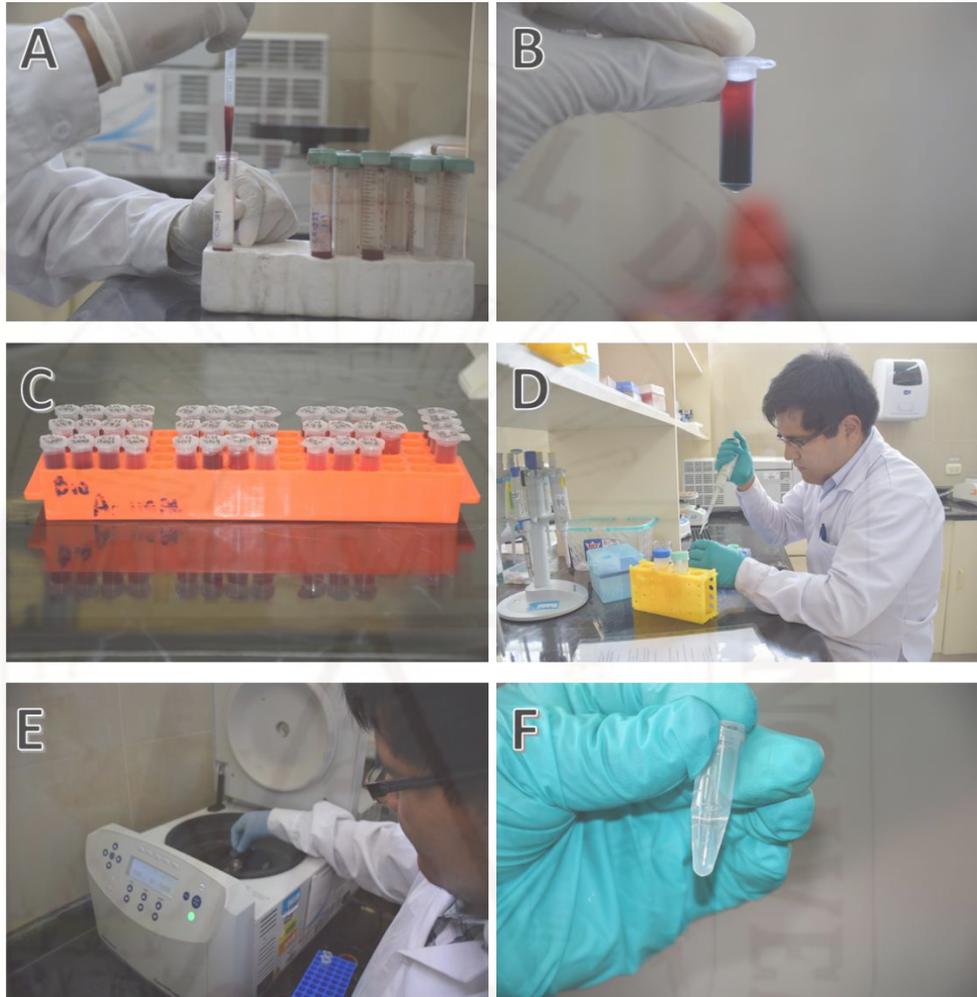
Día 1:

1. Adicionar TE 20:5 500  $\mu$ L, 75  $\mu$ L de detergente (SDS 10%) y 15  $\mu$ L de Proteinasa K e incubar 3 horas a 56°C 1000 rpm.
2. Agregar 500  $\mu$ L de Acetato de K 3M (vortex).
3. Refrigerar por 10 min a -20°C y centrifugar por 15 minutos, 14000 rpm y 10°C.
4. Separa el sobrenadante en dos tubos de 2 ml.
5. Agregar 500  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1, vortex.
6. Centrifugar 15 min, 14000 rpm y 10°C. y separar en tubos de 1.5 ml.
7. Agregar isopropanol hasta 1.5 ml e invertir suavemente hasta visualizar pellet y refrigerar 30 minutos a -20°C
8. Centrifugar 5 min, 14000 rpm y 10°C y eliminar el sobrenadante por inversión.
9. Agregar 300  $\mu$ L de TE 20:5 y almacenar a 4°C hasta el día siguiente.

Día 2:

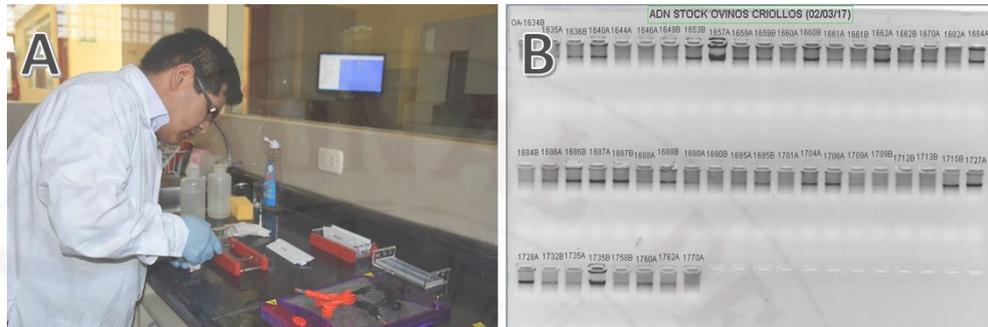
10. Añadir 200  $\mu$ L de acetato de potasio 3M (vortex),
11. Añadir 500  $\mu$ L cloroformo isoamílico 24:1, y centrifugar 15 min, 14000 rpm a 10°C.
12. Separar el sobrenadante en dos tubos de 1.5 ml.
13. Adicionar 800  $\mu$ L de etanol absoluto, e invertir suavemente hasta visualizar pellets, y refrigerar 20 min a -20°C.
14. Centrifugar por 5 min a 14000 rpm y 10°C, y se eliminar el sobrenadante por inversión
15. Adicionar 200  $\mu$ L de TE 20:5 finger vortex.
16. Añadir 8  $\mu$ L de NaCl (cloruro de sodio) 5M finger vortex.
17. Añadir 420  $\mu$ L de etanol absoluto helado e invertir hasta visualizar pellets.
18. Centrifugar 5 min a 14000 rpm y 10°C, y eliminar el sobrenadante por inversión.
19. Adicionamos 400  $\mu$ L de etanol al 70% helado, *finger vortex* hasta desprender el pellets.
20. Centrifugar 5 min, 14000 rpm a 10°C, y eliminar el sobrenadante por inversión
21. Repetir los pasos 19 y 20
22. Añadir 400  $\mu$ L etanol absoluto, *finger vortex*, y asignar TE 10:1 según el tamaño de los pellets.
23. Centrifugar y eliminar el sobrenadante por inversión.
24. Dejar secar a temperatura ambiente o en el concentrador de ADN durante 7 min a 60°C.
25. Verificar que el tubo esté seco y resuspender el ADN en TE 10:1 asignado
26. Almacenar a -20°C.

**ANEXO 6:** Ilustración de extracción de ADN a partir de Sangre



A). muestra de sangre de ovinos criollos. B). muestra de sangre en ovinos criollos transvasado a tubos de 2ml. C). conjunto de muestras transvasadas a tubos de 2ml, después de adicionar TE20:5 para la extracción de linfocitos. D). proceso de extracción de ADN genómico a partir de linfocitos. E) Centrifugado de muestras. F). pellets de ADN genómico obtenidas a partir de linfocitos.

**ANEXO 7: Ilustración de determinación de la calidad de ADN extraído**



A). Preparación de gel de agarosa 1% con Gel Red 2X. B). Visualización de calidad de ADN en gel de agarosa 1% Gel Red 2X.

**ANEXO 8: Gel de agarosa 1%, ADN total ovinos criollos**



**ANEXO 9:** Ilustración de PCR multiplex



A). Preparación de mix de PCR multiplex. B). Amplificación de fragmentos.

**ANEXO 10:** Cuadro de protocolos y programas de amplificación de fragmentos mediante PCR multiplex

<b>Cuadro 10.1: Protocolo Multiplex 1 (CSRD247, HSC, OarAE129, MAF65, OarCP0049, OarFCB304)</b>				
	Con. Stock		Conc. Final	
H2O MQ				
BUFFER	5	X	1	X
dNTPs	2,5	mM	0,3	mM
MgCl <sub>2</sub>	25	mM	3	mM
PRIMER F: CSRD247	20	μM	0,2	μM
PRIMER R: CSRD247	20	μM	0,2	μM
PRIMER F: OarAE129, HSC, OarFCB304	20	μM	0,13	μM
PRIMER R: OarAE129, HSC, OarFCB304	20	μM	0,13	μM
PRIMER F: MAF65	20	μM	0,12	μM
PRIMER R: MAF65	20	μM	0,12	μM
PRIMER F: OarCP0049	20	μM	0,1	μM
PRIMER R: OarCP0049	20	μM	0,1	μM
TAQ	5	U	0,5	U
DNA	15	ng/μL		
Volumen total			10	μl

**Cuadro 10.2: Programa De Amplificación Multiplex 1**

95°	5'	1 CICLO
95°	45"	25 CICLOS
60°	1'	
72°	1'	
72°	15'	1 CICLO
4°	<i>FOR EVER</i>	

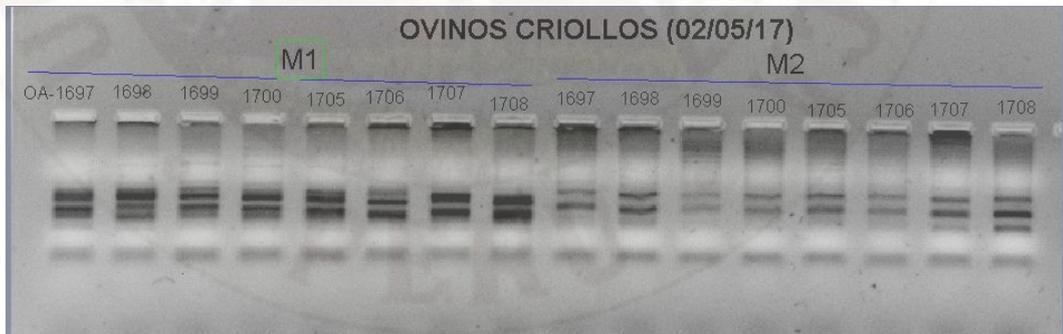
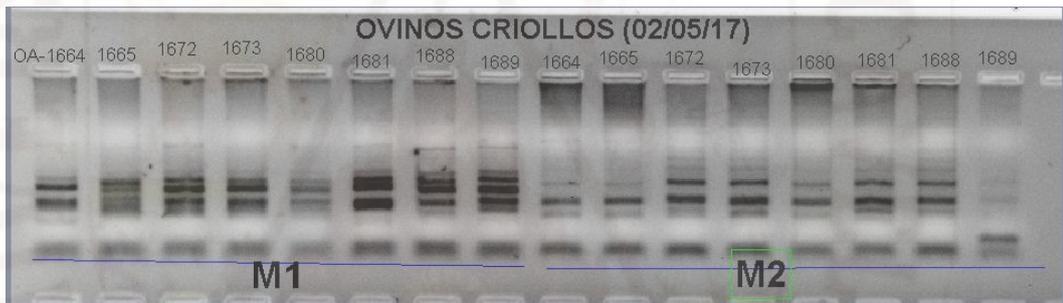
**Cuadro 10.3: Protocolo Multiplex 2 (BM1818, INRA63, BM1258, OarFCB20, McM527)**

	Con. Stock		Conc. Final	
H2O MQ				
BUFFER	5	X	1	X
dNTPs	2,5	mM	0,2	mM
MgCl <sub>2</sub>	25	mM	2,5	mM
PRIMER F: BM1818	20	μM	0,3	μM
PRIMER R: BM1818	20	μM	0,3	μM
PRIMER F: INRA063	20	μM	0,15	μM
PRIMER R: INRA063	20	μM	0,15	μM
PRIMER F: McM527, OarFCB20	20	μM	0,1	μM
PRIMER R: McM527, OarFCB20	20	μM	0,1	μM
PRIMER F: BM1258	20	μM	0,085	μM
PRIMER R: BM1258	20	μM	0,085	μM
TAQ	5	U	0,4	U
DNA	15	ng/μL		
Volumen total			10	μl

**Cuadro 10.4: Programa De Amplificación Multiplex 2**

95°	5'	1 CICLO
95°	45"	25 CICLOS
56°	1'	
72°	1'	
72°	15'	1 CICLO
4°	<i>FOR EVER</i>	

**ANEXO 11: Gel de agarosa 2%, visualización de productos de PCR multiplex**



**ANEXO 12: Electroferogramas de microsatélites A) 6-FAM, B) HEX y C) NED**

