



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
Facultad de Ciencias Biológicas**

Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL EN LLAMAS *Lama glama*
(Linnaeus, 1758) DE LA REGIÓN PUNO UTILIZANDO LA REGIÓN
CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL**

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo
con Mención en Zoología

Bach. Orson Antero Mestanza Millones

LIMA-PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

**Análisis Genético Poblacional en llamas *Lama glama* (Linnaeus, 1758)
de la Región Puno Utilizando la Región Control del ADN Mitocondrial**

Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Zoología

AUTOR

Bach. Orson Antero Mestanza Millones

ASESOR

Dra. Rina Lastenia Ramírez Mesías

LIMA-PERÚ

2014

El tiempo ha volado a través de mis ojos, picaflor
Mientras observaba en el jardín como marchita y nace la flor de floripondio

Nosro

A Doris y Antero

Maravillosos y extraordinarios seres humanos, Gracias por la inspiración.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud a mis padres Doris y Antero por el apoyo incondicional, las enseñanzas, la confianza y las arengas de ánimo a lo largo de la vida. Los quiero.

A mis tíos Rosa y Víctor por dejar hacer de su casa, mi casa.

A Soraya mi hermana incondicional para toda la vida, con quien compartí y aprendí lo bueno de la vida, gracias por existir. Te quiero.

A Adriana la persona con quien aprendí a compartirlo todo, y estaremos ¡palo malo, palo bueno! Te quiero cada día más.

Así también, a Diogenes a quien le debo la totalidad de este trabajo y mucho más. Gracias por todo.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la guía y experiencia de la Dra. Rina Ramírez muy agradecido por su paciencia y comprensión.

Un especial agradecimiento a Claudia, Vannesa, Gabriela, Evelyn, Jonathan, Roger, Ricardo, Eudocio compañeros del Laboratorio de Biología Molecular del INIA y María y Manuel con quienes se ha compartido gratos momentos de risas, bromas, torpezas y felicidad mientras aprendíamos el método para llegar a ser científicos.

Agradezco a todas las personas que trabajan en el INIA. A los amigos de la sede Quimsachata – Puno, un especial recuerdo del Sr. Isaías, piloto de la nave “xenón” en la fantástica travesía de expedición por las punas marcianas.

Finalmente, agradezco infinitamente a todos los comuneros y criadores de Llamas de la Región Puno, quienes permitieron la toma de muestras de sus valiosos animales y la información brindada sobre las zonas llameras. Espero hacerles llegar la información generada en este pequeño trabajo.

RESUMEN

Se evaluó la diversidad genética en las poblaciones de *Lama glama* (llama) en las Regiones de Puno y Cuzco, para conocer la variabilidad genética contenida en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental (E. E.) Quimsachata – Puno, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) creada hace 25 años por el gobierno peruano, para consolidar los planes de manejo y conservación. La extracción del material genético se realizó a partir de muestras de folículos pilosos en animales pertenecientes a los pequeños y medianos productores de llamas de las provincias de Melgar, El Collao, Chicuito y Lampa en la Región Puno; asimismo, Quispicanchi, Canchis y Espinar en la Región Cuzco. Se analizó el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial de 282 individuos por PCR. Los productos de la amplificación fueron secuenciados y analizados a nivel intraespecífico, poblacional y filogenético.

Se identificaron 29 haplotipos a partir de las secuencias analizadas. Las poblaciones presentaron alta diversidad genética y haplotípica, y sus distancias genéticas pequeñas. El análisis de la red de haplotipos mostró que las poblaciones de llamas comparten linajes maternos con guanacos, vicuñas y alpacas. Es una población con historia demográfica estable, producto de su origen múltiple de las diversas subespecies de camélidos. Y en la E. E. Quimsachata se conservan los linajes maternos más frecuentes, ampliamente distribuidos y los compartidos con guanacos, vicuñas y alpacas. Los análisis de estructuración poblacional revelaron que no existe estructuración geográfica y no hay correlación geográfica con la composición genética. Además, a nivel de variedad se hace evidente la ausencia de estructuración genética, y el fuerte efecto de hibridación. Sin embargo, la gran diversidad genética contenida en las Regiones de Puno y Cuzco, y los catorce nuevos linajes maternos encontrados, convierte estas regiones en lugares potenciales para la conservación y diseño de futuros planes de manejo genético para la especie.

ABSTRACT

We assessed genetic diversity in populations of *Lama glama* (llama) in the regions of Puno and Cuzco, for genetic variability contained in the Germplasm Bank Experimental Station (EE) Quimsachata - Puno, the National Institute of Agricultural Innovation (INIA) created 25 years ago by the Peruvian government to consolidate the management and conservation plans. The extraction of the genetic material was made from samples of hair follicles in animals of small and medium producers from provinces Melgar, El Collao, and Lampa, Chicuito in Puno region, also Quispicanchi, Canchis and Espinar the Cuzco region. The hypervariable domain I of the Control region of mtDNA of 282 individuals was analyzed by PCR. The amplification products were sequenced and analyzed intraspecific, population and phylogenetic level.

29 haplotypes were identified from the sequences analyzed. The populations showed high genetic and haplotype diversity, genetic distances between populations are small. The network analysis of haplotypes showed that populations of llamas have maternal lineages share guanacos, vicuña and alpaca. It is a population with stable demographic history, product of its multiple origins of the various subspecies of camelids. And the most frequent, widely distributed and share of guanacos, vicuñas and alpacas are preserved in E.E. Quimsachata. The population structure analysis revealed that there is no geographical structuring and geographic correlation with pool genetic. Furthermore, level of variety of llama the absence of genetic structuring is evident, and the strong effect of hybridization. However, the high genetic diversity contained in the regions of Puno and Cuzco and the new maternal lineages found converts to areas at potential sites for conservation and design of genetic management plans for the species in the future.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
CONTENIDO	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1. Origen, Evolución y Domesticación de los Camélidos	3
2.2. Importancia Productiva y Producción en llamas	9
2.3. Distribución Geográfica, Habitación y Censos Poblacionales	13
2.4. Importancia de su conservación para el mejoramiento genético	15
2.5. Marcadores Moleculares	
2.5.1. El ADN mitocondrial	17
2.5.2. Aplicaciones del ADN mitocondrial	18
2.6. Estudios genéticos poblacionales en Camélidos Sudamericanos	20
2.7. Análisis genético poblacional	
2.7.1. Diversidad nucleotídica	23
2.7.2. Número de haplotipos y Diversidad haplotípica	24
2.7.3. Mismatch Distribution y F_s de F_u	25
2.7.4. Redes Haplotípicas	26
2.7.5. Análisis de Estructuración Poblacional	26

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	
3.1. Problema	28
3.2. Preguntas de Investigación	29
3.3. Hipótesis	29
3.4. Objetivos	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. Fase de Campo	31
4.2. Fase de Laboratorio	36
4.3. Fase de Análisis Bioinformático	41
5. RESULTADOS	
5.1. Análisis y Descripción de las secuencias	44
5.2. Determinación de Haplotipos Mitocondriales	45
5.3. Patrones demográficos	49
5.4. Redes Haplotípicas (<i>Networks</i>)	55
5.5. Análisis de Coordenadas Principales	58
5.6. Análisis de Varianza Molecular	59
5.7. Test de Mantel	61
5.8. Análisis de los haplotipos de llama contra los de guanaco, vicuña y alpaca	62
6. DISCUSIÓN	
6.1. Del Análisis Molecular	65
6.2. Del número de Haplotipos Mitocondriales	67
6.3. De los Patrones Demográficos	68
6.4. De las Redes Haplotípicas	72
6.5. Del Análisis de Estructura Poblacional	75
6.6. Del Análisis de los haplotipos de llama contra los de guanaco, vicuña y alpaca	76

7. CONCLUSIONES	79
8. RECOMENDACIONES	80
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10. ANEXOS	
Anexo 1. Ficha de colecta de campo.	92
Anexo 2. Secuencias de haplotipos reportados en el <i>GeneBank</i> hasta el 2013 de guanacos, vicuñas, alpacas y llamas. Fueron usadas en la construcción de los Networks y los haplotipos únicos para el árbol de inferencia bayesiana.	93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de las carcasas de alpacas y llamas. Fuente Cristofanelli et al. 2005.....	12
Tabla 2. Se describe el proceso de la erosión genética: en los camélidos domésticos. Fuente Bruford, presentada en el VI Congreso Mundial de Camélidos.....	16
Tabla 3. Lista de especímenes de camélidos sudamericanos muestreados (<i>Lama glama</i>). Tipo de muestra (P: pelo), localidad, Zona agroecológica (PS: puna seca, PH: puna húmeda), Región (P: puno y C: cuzco), coordenadas geográficas, número de rebaños colectados (R) y número de muestras colectadas (N). *Ver figura 7 y pag. 31.....	33
Tabla 4. Primers empleados para el análisis.....	39
Tabla 5. Haplotipos (H) encontrados en las Regiones de Puno y Cuzco de llamas, del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial. F = frecuencia del haplotipo en la población total. En la posición 23 se aprecia el <i>indel</i> y la posición 175 es un <i>singleton</i>	46
Tabla 6. Resumen de los diferentes índices de diversidad encontrados en los cuatro grupos de <i>L. glama</i> analizadas usando el dominio hipervariable I de la región control del ADNmt. N = número poblacional, #Hap = número haplotipos diferentes en la población.....	50
Tabla 7. AMOVA fue estructurado con cuatro grupos conformados por las poblaciones en paréntesis: Quimsachata (población E.E. Quimsachata Puno), Puno Sur (Población El Collao y Chucuito), Puno Norte (Población Melgar y Lampa) y Cuzco (Población Quispicanchi, Canchis y Espinar), usando el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial de las poblaciones de las Regiones de Puno y Cuzco.....	59
Tabla 8. AMOVA fue estructurado con cinco grupos conformados por las variedades de llamas: Ccara (Puno), Chaku (Puno), Ccara (Cuzco), Chaku (Cuzco) y Suri (Cuzco).....	60
Tabla 9. Se han recopilado los datos de número poblacional (N), número de haplotipos (# Hap), diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π), sitios polimórficos (s) de estudios poblacionales que han usado el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial para las diferentes especies de camélidos sudamericanos. * Distribución Perú, Bolivia y norte de Chile. ** Distribución Chile Sur, Argentina. – Falta de datos.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Una moderna filogenia de Camelinae. Las sinapomorfias están numeradas con slash:
- 1 LAMINI: arcos nasales.
 - 2 I1-2 perdidos; P2/p2 perdidos; estilo antero externo sobre los molares inferiores.
 - 3 PequeñosP1/p1; p3 pequeños o ausentes; cavidad lacrimal reducida; rostrum corto.
 - 4 HEMIAUCHENIA: metapodios y cuellos extremadamente elongados.
- Fuente Julie Ann 2003 adaptado de Honey *et al.* 1998.....4
- Figura 2.** Relaciones filogenéticas de Camelidae basadas en análisis de parsimonia del gen citocromo b, los números indican la longitud de la rama y todos los nodos obtuvieron en 100% de *bootstrap*. Fuente Stanley *et al.* 1994.....6
- Figura 3.** Imágenes de las tres variedades de llamas existentes en la Región Puno.....8
- Figura 4.** Efecto del diámetro de la fibra sobre el precio (1999-2004) en llamas. Fuente Frank *et al.* 2006.....11
- Figura 5.** El área sombreada con línea punteada negra muestra la expansión de las llamas (*L. glama*) antes de la conquista. El área roja es la distribución actual de llamas. Los puntos negros indican hallazgo fósil en el Pleistoceno y el Holoceno temprano. Y las cifras son censos poblacionales de llamas hasta el año 2005 según FAO. Modificado Fuente Wheeler *et al.* 1995 y Fernández-Baca 2005.....14
- Figura 6.** Diferentes variaciones genéticas registradas en ventanas de tiempo diferentes. Box I muestra la variación genética histórica correspondiente al tiempo de especiación. Box II reporta eventos recientes y corresponde al tiempo de diferenciación en unidades de significancia evolutiva. Box III corresponde a patrones genéticos contemporáneos y corresponde al tiempo definiendo unidades de manejo, unidades de acción y “net family”. Fuente Wan *et al.* 2004.....19
- Figura 7.** Los puntos amarillos indican las zonas de muestro en las Regiones de Puno, Cuzco. El punto verde limo indica la estación Quimsachata E.E. Ilpa – Puno (Banco de Germoplasma de Camélidos), las coordenadas exactas están en la tabla 3.....32
- Figura 8.** Gel de agarosa al 2%. La numeración 539 corresponde a muestras de ADN de llamas. La numeración A419 corresponde a muestra control de ADN de alpacas. El pocillo donde aparece el H₂O corresponde al control negativo. Se observa que al cambiar la concentración de ADN contenido en las muestras el tamaño del amplicon varía, de tal forma que se escogió la concentración de 40ng/μl.....40
- Figura 9.** Secuencias alineadas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt con la secuencia de referencia (accesión AP003426 del NCBI). Programa SeqScape v2.7 of Applied Biosystems.....41

Figura 10. Transiciones (s) y transversiones (v) comparadas contra las distancias a pares entre los 29 haplotipos del dominio Hipervariable I de la región control de llamas (<i>Lama glama</i>) de las Regiones de Puno y Cuzco. El modelo de distancia utilizado fue el de TN93 (Tamura y Nei 1993). Programa DAMBE v5.....	44
Figura 11. Distribución de frecuencias haplotípicas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de llamas (<i>Lama glama</i>), por provincia muestreada de la Región Puno, Cuzco.....	47
Figura 12. Distribución de frecuencias haplotípicas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de <i>Lama glama</i> , según la variedad de llama muestreada de las Regiones Puno y Cuzco. El color azul corresponde a la variedad Ccara, el verde a la variedad Chaku y el rojo a la variedad Suri.....	48
Figura 13. <i>Mismatch Distribution</i> de las 282 secuencias del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de <i>Lama glama</i> , de las Regiones de Puno y Cuzco. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. La línea continua representa el modelo demográfico de cuello de botella genético seguido por crecimiento poblacional y expansión súbita, lo cual no corresponde a los datos observados.....	49
Figura 14. UPGMA usando las distancias genéticas por poblaciones (provincias), dentro de las regiones, obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.....	52
Figura 15. <i>Neighbor Joining</i> usando las distancias genéticas entre provincias, obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.....	52
Figura 16. <i>Neighbor Joining</i> usando las distancias genéticas entre grupos designados <i>a priori</i> , obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.....	53
Figura 17. UPGMA usando las distancias genéticas entre grupos designados <i>a priori</i> , obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.....	53
Figura 18. <i>Árbol filogenético</i> usando <i>Neighbor Joining</i> de los 29 haplotipos pertenecientes al dominio hipervariable I de la región control de ADNmt de las Regiones Puno y Cuzco. Los números sobre las ramas indican el porcentaje de <i>bootstrap</i> . Se hace referencia a los grupos estudiados Quimsachata (Q), Pn (Puno Norte), Ps (Puno Sur) y C (Cuzco) y se observan dos clados bien soportados (Clado A= haplogrupo guanaco y Clado B= haplogrupo vicuña). Están incluidas dos secuencias del GenBank JX678590.1 (guanaco) y AY856341.1 (Vicugna) para mayor detalle.....	54
Figura 19. <i>Median Joining Network</i> de los 29 haplotipos pertenecientes a las Regiones de Puno y Cuzco, del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt. Los colores son las agrupaciones de acuerdo a la ecorregión. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia.....	56

Figura 20. *Median Joining Network* de los 29 haplotipos pertenecientes a las Regiones de Puno y Cuzco, del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt. Los colores representan las variedades de llamas estudiadas. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia.....57

Figura 21. Análisis de Coordenadas Principales. Se evaluó usando los parámetros estadísticos de las varianzas (V_{AP} es la varianza entre las poblaciones y V_{WP} varianza dentro de las poblaciones), estas varianzas son relacionadas bajo la distancia Φ_{PT} (Φ_{PT}). Las secuencias corresponden al dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de las ocho poblaciones pertenecientes a las Regiones de Puno y Cuzco.....58

Figura 22. Test de Mantel en el eje X se encuentran las distancias geográficas (GGD) y en el eje Y las varianzas moleculares (Φ_{PTP}) entre rebaños de las Regiones de Puno y Cuzco. En la figura observa la línea de tendencia y el ajuste del R^2 el cual es no significativo.....61

Figura 23. Red de haplotipos mitocondriales. Se comparan los 29 haplotipos (H_{-}) encontrados en las Regiones Puno y Cuzco, con los haplotipos de Guanacos, Vicuñas y Alpacas reportados hasta el momento en el *GenBank*. Q = Estación Experimental Quimsachata. H_3 es el más frecuente en las Regiones Puno y Cuzco. *L. g. huanacus* (*L.g.h.*), *L. g. cacsilensis* (*L.g.c.*) y *L. g. guanice* (*L.g.g.*).....63

Figura 24. Filogenia construida usando Inferencia Bayesiana, en los nodos se indica la probabilidad posterior. Se usó la región control del ADN mitocondrial de los 29 haplotipos encontrados en las Regiones Puno y Cuzco (señalados ←), y los haplotipos únicos de guanacos, vicuñas, alpacas y llamas reportados hasta el momento en el GenBank a fin de esclarecer las relaciones evolutivas de las llamas. Gc (*L. g. cacsilensis*), Gh (*L. g. huanacus*), Gg (*L. g. guanicoe*), Gv (*L. g. voglii*), Vm (*V. v. mensalis*), Vv (*V. v. vicugna*), Lp (*L. pacos*) y las H y Lg (*L. glama*). Los números que acompañan a los acrónimos corresponden al código del GenBank. El rectángulo naranja encierra al haplogrupo guanaco y el rectángulo violeta corresponde al haplogrupo vicuña.....64

1. INTRODUCCIÓN

La llama es el camélido actual más grande de Sudamérica, que fue domesticados hace 5.000 – 6.000 años (Wheeler 1995, Kadwell *et al.* 2001), por los cazadores y recolectores. La llama se asemeja a su ancestro el guanaco, en la gran mayoría de los aspectos de morfología, comportamiento y adaptaciones a climas extremos (Wheeler 1995). Existen dos variedades de llamas más frecuentes en los rebaños de los criadores, Chaku y Ccara, conocidas también como lanuda y pelada respectivamente; mientras que la Chaku tiene mayor cobertura de fibra, la Ccara tiene una apariencia de mayor fortaleza corporal. En muchos lugares de los Andes, carentes de vías de comunicación, la llama sigue prestando valiosos servicios como animal de carga ya que está adaptada a vivir en altura y zonas de escasos recursos naturales, proporcionando productos de alta calidad como la carne y la fibra, y subproductos como pieles y cuero que tienen múltiples usos industriales, artesanales (Pinto *et al.* 2010).

Según la FAO (Fernández-Baca 2005), el Perú tiene el privilegio de ocupar el segundo lugar, en el mundo, en tenencia de llamas, después de Bolivia. Sin embargo, la selección que se practica en llamas con miras a mejoramiento genético, es muy limitada; la razón es la poca disponibilidad de reemplazos debido al bajo porcentaje de vientres, madres en edad reproductiva en los rebaños, baja tasa de natalidad y alta mortalidad de crías. Todo ello no permite hacer una adecuada renovación de los rebaños y ejercer una presión de selección; por otro lado, la tendencia a mantener a los machos castrados como productores de fibra por toda su vida (10 a 12 años), impide imprimir un ritmo dinámico al proceso productivo mediante la renovación de animales.

Por lo tanto, en 1987 se propició crear en Perú, mediante una iniciativa nacional, el Banco de Germoplasma de alpacas y llamas con el apoyo técnico y financiero del Proyecto Alpacas (PAL) - Convenio de Cooperación Técnica del Gobierno Suizo (COTESU-INIA) frente a los

graves problemas en la producción de fibra fina y la pérdida de la diversidad tanto fenotípica como genética en llamas y alpacas; el Banco de Germoplasma fue establecido en la Estación Experimental Illpa: Departamento de Puno (Anexo: QUIMSACHATA) (Huanca *et al.* 2007). En Puno existe la mayor población de llamas, estimado en 1´462,730 (Llacsá *et al.* 2007). Sin embargo, en el último reporte realizado por Censo Nacional Agropecuario (2012), Puno cuenta con 746,269 llamas, lo cual significa un descenso poblacional de llamas para la región de Puno.

En el Perú existen escasos estudios en genética de poblaciones usando marcadores moleculares; se ha demostrado la gran importancia de esta área relacionada a esclarecer los procesos de domesticación y manejo sostenible de los recursos Zoogenéticos (Bruford *et al.* 2003). Por lo tanto, existe un gran vacío del conocimiento de la variabilidad genética, la historia evolutiva y estructura poblacional de las llamas en Perú.

Por tal motivo, el presente estudio evaluó las poblaciones de Quispicanchi, Canchis y Espinar en la Región Cuzco; Melgar, Lampa, El Collao y Chucuito en la Región Puno, usando como herramienta molecular el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial, usado ampliamente en estudios similares (Frankham *et al.* 2002; Barreta *et al.* 2012). A partir de este análisis genético poblacional, se buscó evaluar la diversidad genética de poblaciones en llamas de Puno y Cuzco, evaluando la diversidad nucleotídica, haplotípica, generar redes haplotípicas que permitieran inferir el flujo genético de los linajes maternos, así como patrones geográficos de diversidad y evolución. La información generada es importante si se pretende consolidar planes de manejo y primordialmente la conservación del acervo genético de esta especie (Bustamante *et al.* 2006), en el Banco de Germoplasma E. E. Quimsachata del INIA. De tal manera que la información generada por este trabajo sirve de referente a escala local, regional y nacional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Origen, Evolución y Domesticación de los Camélidos

Los camélidos de Sudamérica son clasificados, junto a los camellos del viejo mundo, en el orden Artiodactyla, suborden Tylopoda y familia Camelidae. La familia Camelidae Gray 1821, en su historia evolutiva temprana adquirió largos cuellos y labios, ausencia de cuernos o astas. Aunque algunos camélidos del Mioceno presentan dentición completa, en la actualidad camellos y llamas han perdido el primer y segundo incisivo de la mandíbula superior, además de uno o más premolares; presentan caninos verdaderos separados de los premolares por un diastema, tanto en la mandíbula superior e inferior, la anatomía de las extremidades traseras les permite doblar sus patas bajo su cuerpo, además de la presencia de una almohadilla digital en lugar de un casco. Los hallazgos de fósiles sugieren que la familia Camelidae se originó en América del Norte aproximadamente en el Eoceno, hace 40-45 millones de años (Honey *et al.* 1998; Wheeler 1991; Harris *et al.* 2010; Wheeler 2012).

La subfamilia Camelinae Gray 1821 (figura 1) apareció al iniciar el Mioceno tardío en América del Norte, y divergió en las tribus Camelini (con la fórmula dentaria 1/3, 1/1, 3/2, 3/3) y Lamini (con la fórmula dentaria 1/3, 1/1, 2/1, 3/3) (Harrison 1979). Según registro fósil y análisis moleculares del ADN mitocondrial, la divergencia tuvo lugar hace 11 millones de años (Honey *et al.* 1998; Stanley *et al.* 1994; Peng Chui *et al.* 2007). La tribu Lamini se subdivide en: Subtribu Camelopina Harrison 1979, cuyos representantes son el género *Alforjas* (Harrison 1979) y *Camelops* (Leidy 1854) que se extinguieron. Y la Subtribu Lamina, cuyos representantes son de los géneros *Pleiolama* (Meachen 2003), *Hemiauchenia* (Gervais y Ameghino 1880), *Paleolama* (Gervais, 1867), *Lama* (Cuvier 1800) y *Vicugna* (Miller 1924). De los cuales, los estudios confirman que los géneros *Lama* y *Vicugna* divergieron hace 2-3 millones de años en América del Norte y son géneros válidos (Webb 1974; Wheeler 2006).

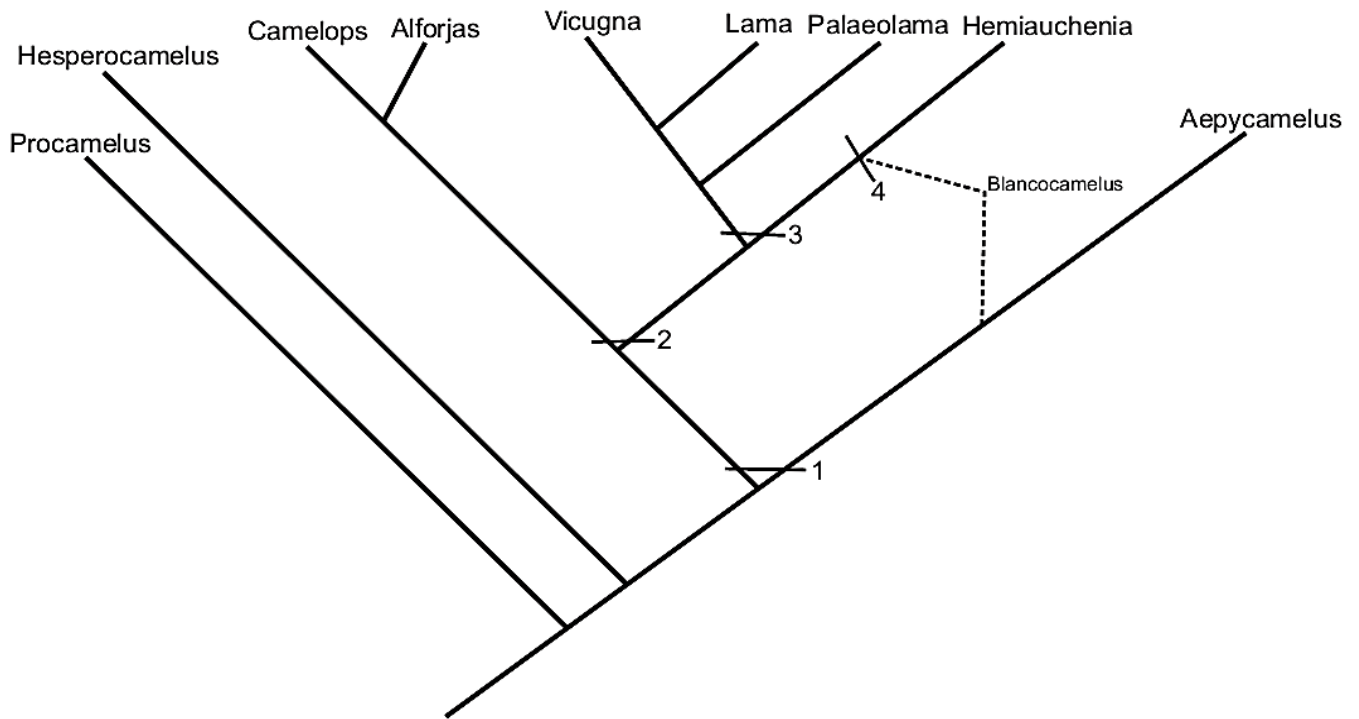


Figura 1. Una moderna filogenia de Camelinae. Las sinapomorfias están numeradas con slash:
 1 LAMINI: arcos nasales.
 2 I1-2 perdidos; P2/p2 perdidos; estilo antero externo sobre los molares inferiores.
 3 Pequeños P1/p1; p3 pequeños o ausentes; cavidad lacrimal reducida; rostrum corto.
 4 HEMIAUCHENIA: metapodios y cuellos extremadamente elongados.
 Fuente Julie Ann 2003 adaptado de Honey *et al.* 1998

En definitiva, ocurrieron cuatro mayores episodios en la diversificación de los camélidos en Norte América. El primer episodio ocurrió en el Eoceno tardío hasta mediados del Oligoceno medio y consistió en la aparición de *Poebrotherium* y *Paratylopus*. La segunda radiación se originó en el Oligoceno tardío hasta el Mioceno temprano con la radiación de Stenomylines (*Blickomylus*, *Rakomylus*). Estas especies se extinguieron en el Mioceno medio. La tercera radiación se dio en el mismo lapso de tiempo de la segunda radiación, y consistió de “camélidos enormes”; esta radiación dio más del doble del número de géneros de camélidos. La cuarta radiación de camélidos ocurrió en el temprano y medio Mioceno, donde se produjeron

los Camelinae (Lamini y Camelini) incluyendo todos los extintos y modernos Laminis Americanos (Honey *et al.* 1998).

Los camélidos de Norte América realizaron su última migración hacia Sudamérica en el Pleistoceno temprano para dar lugar a la tribu Lamini (Webb 1974), ya que en el Pleistoceno tardío se extinguieron de Norte América junto con la megafauna endémica (Honey *et al.* 1998; Julie 2003).

Wheeler (1982) describe la morfología dental de las cuatro especies existentes de la tribu Lamini: llama, alpaca, vicuña y guanaco poseen seis incisivos percederos y seis incisivos permanentes localizados al frente de la mandíbula inferior. Estos dientes tienen superficie afilada para cortar plantas contra una almohadilla en la encía, localizada al frente de la mandíbula superior. Los incisivos percederos son pequeños en tamaño, pero idénticos en forma a los permanentes los cuales los remplazan. En la llama y el guanaco son de forma espatulada, con esmalte cubriendo toda la superficie de la corona y con una muy clara diferencia de la raíz. En la vicuña sin embargo, los incisivos son no espatulados, y solo presentan esmalte en la parte labial del diente. Los incisivos de la alpaca son de forma intermedia: no espatulados, pero son más rectangulares en la sección transversal y presentan la misma distribución del esmalte que la vicuña, además desarrollan la estructura de la raíz como en la llama y guanaco con la edad. De esta manera se logra agrupar a las especies silvestres con sus derivados domésticos. Además, análisis de parsimonia de la secuencia completa del citocromo b, define al genotipo de la llama emparentada con el guanaco y a la alpaca emparentada con la vicuña (Stanley *et al.* 1994), de la misma manera Marín *et al.* (2007a) analizaron el patrón de Bandas G de los cromosomas, las secuencias de dos genes citocromo b y la región hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial, y agrupó nuevamente a guanacos con llamas y vicuñas con alpacas (figura 2).

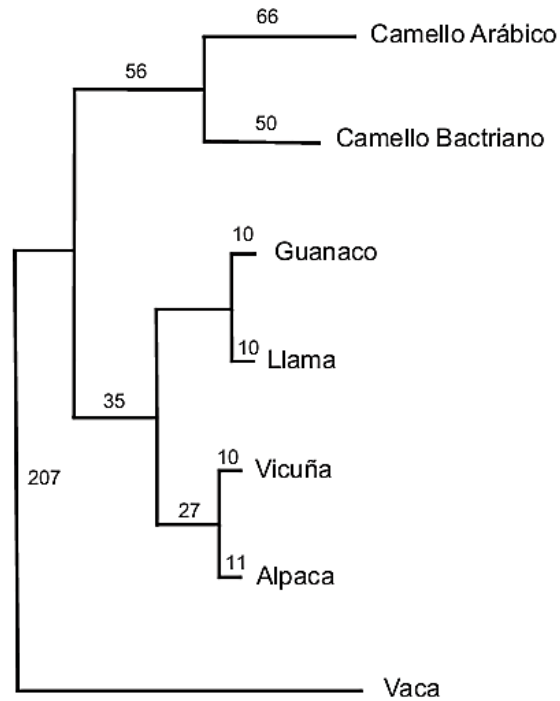


Figura 2. Relaciones filogenéticas de Camelidae basadas en análisis de parsimonia del gen citocromo b, los números indican la longitud de la rama y todos los nodos obtuvieron en 100% de bootstrap. Fuente Stanley *et al.* 1994.

El guanaco pertenece al género *Lama*, presenta cuatro subespecies que han sido descritas bajo características externas, patrones de coloración y distribución geográfica (Wheeler 1995), aunque los análisis recientes del citocromo b y la región control del ADN mitocondrial representativos para las cuatro subespecies propuestas (Marín *et al.* 2007b), separa en el norte a *L.g. cacsilensis* de los restantes guanacos (*L. g. guanicoe*). Y las poblaciones del sur (*L. g. guanicoe* y *L. g. huanacus*) son caracterizados por presentar una reducida variabilidad genética, lo que sugiere que ellos han sufrido un severo cuello de botella o eventos de extinción con una posterior recolonización en el pasado. En contraste, las poblaciones de *L. g. cacsilensis* presentan altos niveles de diversidad genética, lo que sugiere largos periodos de estabilidad que pudo permitir la acumulación de los relativos niveles de diversidad genética. En consecuencia, los nuevos estudios usando ADN proponen la existencia de solo dos formas: *Lama guanicoe cacsilensis* (forma del norte, 8° – 20° S) y *Lama guanicoe guanicoe* (forma del

sur, al sur de 21° S) (González *et al.* 2006; Marín *et al.* 2013). Además, se ha propuesto a *Lama guanicoe cacsilensis* como el ancestro más probable de las llamas para el Perú, basándose en recientes estudios genéticos (Wheeler 2006).

Los Camélidos Sudamericanos del género *Lama* y *Vicugna* fueron domesticados hace 5.000 – 6.000 años (Wheeler 1995), por los cazadores y recolectores, pero al mismo tiempo, la domesticación de camélidos cambió las bases de la sociedad cazadora. Esto se debe a que la domesticación no es un único evento instantáneo en el cual un animal silvestre es transformado de repente a un derivado doméstico, más bien es un proceso acumulativo marcado por cambios en ambos lados de la relación mutualista, como manda la necesidad de las poblaciones compañeras, con el tiempo se va incrementando su interdependencia.

Existen al menos tres variedades (figura 3): Ccara, Chaku y suri (Wheeler 2012). La mayoría de las llamas en Perú, Bolivia y el norte de Chile son la variedad Ccara caracterizadas por el crecimiento de poca fibra en el cuerpo, fibra muy corta en el rostro y las piernas. En el sur, especialmente en Argentina donde se han descrito siete tipos de fibra (Frank y Wehbe 1994), la variedad Chaku es la más común y presenta gran densidad de fibra en el cuerpo que se extiende entre las orejas, pero es ausente en las piernas. La llama variedad suri es caracterizada por presentar fibras largas y rectas, organizadas en ondas que caen a cada lado del cuerpo; en el caso de las llamas suri, ellas representan un pequeño porcentaje de la población de llamas, pero existen desde tiempos pre Incas (Wheeler *et al.* 1995 y Wheeler 2012).



Llama variedad Chaku



Llama variedad Ccara



Llama variedad Suri

Figura 3. Imágenes de las tres variedades de llamas existentes en la Región Puno.

2.2. Importancia Productiva y Datos de Producción

Los camélidos fueron integrados a la comunidad humana en el transcurso del proceso de domesticación, intercediendo como símbolo económico y social desde los primeros cazadores. En el imperio Inca (1470-1532) la distribución de la llama alcanzó su mayor expansión, como animal de carga acompañando a la armada imperial hacia el sur de Colombia y al centro de Chile, según los reportes, pero éstos no mencionan la producción de fina fibra en llamas; esto posiblemente como error general de los escritores españoles, quienes no distinguían entre llamas y alpacas, ya que prestaban mayor interés a los animales de carga para poder transportar el oro (Wheeler 1995). También, a partir de 1532 con la colonización española y la introducción de ganado foráneo, los rebaños nativos (llama y alpaca) fueron diezmados y desplazados a la puna de gran altura (3.800-5.000 m de altitud), donde los animales europeos no prosperaban; asimismo, se perdió toda clase de registros existentes asociados a la crianza de llamas y alpacas (Wheeler 1995). Además, según Renieri *et al.* (2009), la evolución post-domesticación de la llama y alpaca, con la llegada de los españoles al continente americano, puede ser esquematizada en tres grandes periodos:

- La fase de pre-conquista, de la domesticación a la llegada de los conquistadores.
- La gran crisis de la conquista, que duró pocos decenios, pero fue de impacto devastador.
- El desarrollo sucesivo a la conquista, de la reanudación de los camélidos domésticos hasta el momento actual.

Por tales motivos, la cría de llamas y alpacas forma parte del acervo cultural heredado por los primeros hombres cazadores de Sudamérica y por las culturas emergentes a partir de ellos, entre las más importantes la cultura Inca. Sin embargo, la cría de camélidos en nuestros días

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

Según FAO (Fernández-Baca 2005) en Perú, Bolivia, Argentina y Chile la importancia productiva de los camélidos sudamericanos domésticos, presenta dos áreas de gran importancia: Primero la producción de fibra (figura 4). Actualmente, la producción de fibra fina de alpaca presenta 22 μm de diámetro y en las llamas peruanas actuales el diámetro promedio del vellón varía desde $27.0 \pm 15.6 \mu\text{m}$ para las Ccaras y $35.3 \pm 17.8 \mu\text{m}$ para las Chaku (Vidal 1967). El deterioro de la calidad de fibra de las actuales llamas y alpacas andinas se puede explicar como producto de la hibridación entre ambas, hecho probablemente ocurrido durante el caos y la destrucción que acompañó a la conquista española (Wheeler 1995). En tal sentido, la fibra de la llama generalmente es gruesa y peluda, y el consenso de opinión en Perú es que la llama ahora y nunca será criada para la producción de fibra. Sin embargo, el análisis de la fibra de llamas en dos regiones productoras de Argentina, muestra que algunas llamas poseen fibra suficientemente fina en diámetro (menor a 23 μm si se excluyen los pelos) y permitir que sus vellones sean vendidos de calidad *premium* en el mundo textil (Frank *et al.* 2006). Segundo, la producción de carne de camélidos domésticos juega un rol importante en la sociedad Andina, es una importante fuente de alimento y proteínas para los pobladores andinos (Wheeler 1993), y también este producto es requerido por consumidores de Norte América y/o Europa, debido al valor nutricional de esta carne, caracterizado por tener bajas concentraciones de grasa y colesterol (Pérez *et al.* 2000; Cristifanelli *et al.* 2004). El rendimiento de la carcasa de llama es del 58% (Zea *et al.* 2007), frente al 53% de la alpaca (Calderón y Fernández-Baca 1972).

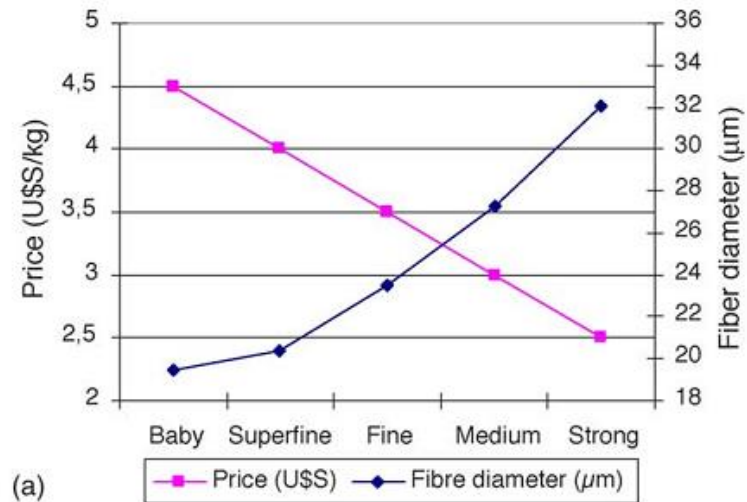


Figura 4. Efecto del diámetro de la fibra sobre el precio (1999-2004) en llamas. Fuente Frank *et al.* 2006.

Además, la llama demuestra tener un plus potencial como fuente de carne en la región alto andina, por tener adaptabilidad y ser más eficientes que los ovinos, vacunos y la alpaca en el aprovechamiento de los pastos fibrosos de baja calidad nutritiva; por tener un rango ecológico amplio entre altitudes que van desde 2000 a 5000 msnm, y en ambientes predominantemente áridos (García *et al.* 2002).

Mamami-Linares y Cayo (2011) caracterizaron el charqui de llama como:

- Un nivel alto de proteína y baja actividad de agua.
- Grasa con un cociente de ácidos grasos poliinsaturados/saturados y nivel de CLA similar a la carne de alpacas y bovinos criados en sistemas de pastoreo.
- Cocientes de ácidos grasos n-6/n-3 favorables y niveles de ácidos grasos deseables superior al encontrado en otras carnes de rumiantes.
- Nivel de sodio más bajo que el charqui de alpaca pero relativamente más alto que el de bovino.
- Características tecnológicas coincidentes con valores reportados para charqui de alpaca y bovino.

- Se reporta que el contenido de hierro en carne de llamas es mayor que en la carne bovina.

Por consiguiente, en el Perú en los últimos años se vienen realizando estudios para determinar las variables de producción en carne de llama (tabla 1), podemos mencionar a Zea *et al.* (2007) quien sugiere que el área de la grupa y volumen del muslo pueden ser usados como indicadores genéticos para la selección temprana de crías de llama para producción de carne por mantener una correlación alta y significativa con el peso corporal y el perímetro torácico.

Tabla 1. Características de las carcasas de alpacas y llamas. Fuente Cristofanelli *et al.* 2005

Carcass characteristics (\pm S.E.) of the alpaca and llama carcasses		
	Alpaca ($n=40$)	Llama ($n=20$)
Live weight at slaughter (kg)	46.1a \pm 2.23	63.2b \pm 2.92
Carcass length (cm)	71.1a \pm 1.9	130.4b \pm 2.7
Warm carcass weight (kg)	24.4a \pm 1.53	31.2b \pm 1.93
Warm dressing (%)	53.0a \pm 0.84	49.3b \pm 1.06
Muscle area ¹ (cm ²)	33.8a \pm 2.9	41.3b \pm 3.4
Leg (%)	34.4a \pm 1.1	35.7b \pm 1.7
Shoulder (%)	23.7a \pm 1.3	20.2b \pm 1.8
Thorax (%)	17.7a \pm 1.6	18.5b \pm 2.1
Chops (%)	16.8a \pm 2.2	17.6b \pm 2.9
Neck (%)	6.8a \pm 0.14	7.7b \pm 1.1
Tail (%)	0.25a \pm 0.01	0.46a \pm 0.02

Means within a row not followed by the same letter (a, b) differ ($P < 0.05$).

¹ Area of muscle *Longissimus Thoracis et Lumborum*, measured at the 12th rib.

Además, las llamas pueden prestar servicios para el consumo local (Fernández-Baca 2005) en producción de leche, cuero, estiércol, como animales de carga o como animales de guardia para los rebaños de ovejas (esto último desarrollado en los Estados Unidos según Franklin *et al.* 2012). Como reportaron Reik y Gerken (2006), los constituyentes de la leche en las llamas durante la lactación son similares al de los rumiantes domésticos, aunque diferentes en sus valores.

Debido a esto, se requiere disponer de indicadores fenotípicos corporales y genéticos que expresen la realidad en las poblaciones de camélidos en Perú, una vez que sean identificados, entonces utilizar para desarrollar núcleos de rebaños de llamas para la producción.

2.3. Distribución Geográfica, Habitación y Censos Poblacionales

Las mayores poblaciones de llamas viven en el Altiplano (Fernández-Baca 2005), que es una meseta de 153.000 Km² comprendida entre los ramales Occidental y Oriental de la Cordillera de los Andes. La altitud fluctúa entre los 3.600 a 5.300 m sobre el nivel del mar.

Las llamas se han adaptado muy rápidamente a vivir bajo condiciones de estrés hídrico y falta de oxígeno (Wheeler 1982), son resistentes a las heladas características del altiplano y, al igual que el guanaco, se alimentan del *Stipa ichu* muy característica y alimento más importante del altiplano (Huanca *et al.* 2007). Por otro lado, las poblaciones de llamas actualmente están decreciendo, lo confirma el último censo Nacional Agrario realizado (INEI 2012). Los departamentos con mayor tenencia de camélidos son Puno y Cuzco (Fernández-Baca 2005). Para mayor detalle de los datos poblacionales observar la figura 5.

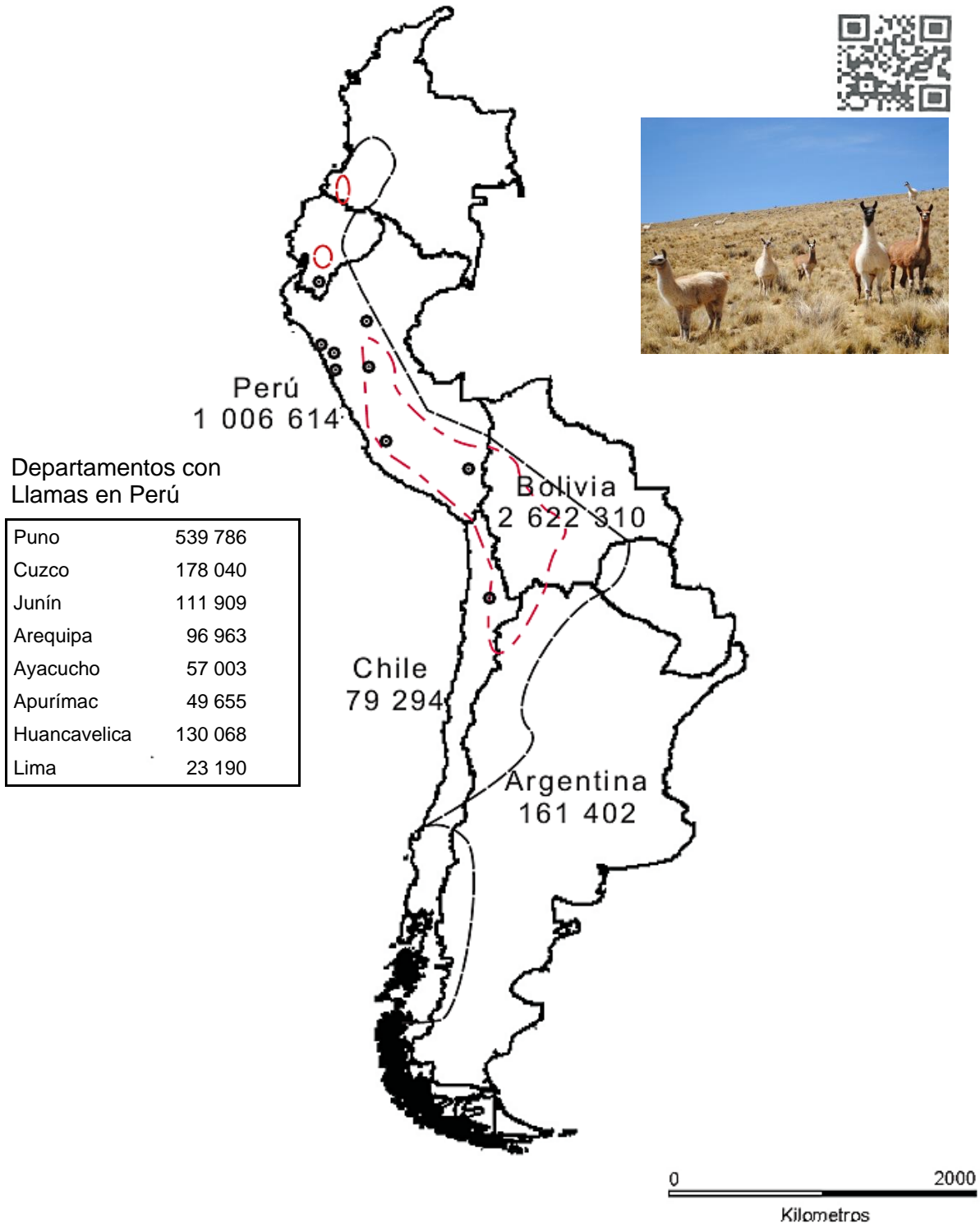


Figura 5. El área sombreada con línea punteada negra muestra la expansión de las llamas (*L. glama*) antes de la conquista. El área roja es la distribución actual de llamas. Los puntos negros indican hallazgo fósil en el Pleistoceno y el Holoceno temprano. Y las cifras son censos poblacionales de llamas hasta el año 2005 según FAO. Modificado Fuente Wheeler et al. 1995 y Fernández-Baca 2005.

2.4. Importancia de Conservación para el mejoramiento genético

Según Henson (1992), los objetivos de conservación de los Recursos Genéticos Animales incluyen lo económico, lo social, cultural, el ambiente, la reducción de riesgos, la investigación y la formación. Estos objetivos han sido resumidos como sigue por Henson (1992): La diversidad debe ser mantenida por su potencial económico, permitiendo responder rápidamente a los cambios de condiciones del mercado, las preferencias de los consumidores o las condiciones del ambiente. También, tiene un rol social y cultural importante. Además, la diversidad animal es parte integrante de un agroecosistema; la pérdida de esta diversidad haría pesar un mayor riesgo sobre el sistema de producción, reducida la capacidad de responder a los cambios, contribuiría a degradar el ambiente en cuestión y podría aún conducir a su destrucción. Por consiguiente, la diversidad de los animales domésticos es un seguro importante para poder responder a las posibles necesidades futuras, desconocidas actualmente, se reduce el riesgo e incrementa la seguridad alimentaria, depender sólo de algunas variedades o razas es arriesgado: la concentración sobre un pequeño número de razas resulta en la pérdida de genes o de combinación de genes, sin interés actualmente, pero que podrían serlo en el futuro. Razas distantes genéticamente son necesarias en la investigación sobre la resistencia y la susceptibilidad a las enfermedades, ayudando a comprender mejor los mecanismos subyacentes, y para el desarrollo de tratamientos más eficaces o para el control de las enfermedades. La actividad de la conservación sirve a la formación de los que toman parte en la misma, lo que provoca una toma de conciencia, conocimiento y reducción del riesgo. La conservación *in situ*, como el caso de la E.E. Quimsachata, permite a la población animal y al ambiente evolucionar juntos e implica la conservación de los animales en el ambiente bajo el cual se han desarrollado o en el agrosistema donde se están produciendo. En un enfoque más amplio, la conservación *in situ*

también incluye el manejo del ecosistema para la sustentabilidad del alimento (citado en Segura-Correa y Montes-Pérez 2001).

Al presente no existe un programa de mejoramiento genético exclusivo en Sudamérica o Perú, para la producción de carne de llama, mejora en fibra y núcleos de reproductores que facilite la selección de estos animales (Zea *et al.* 2007). Bruford *et al.* (2003) describen los procesos, efectos, consecuencias y posibles soluciones de conservación en los camélidos domésticos, proponiendo los test moleculares para identificar los núcleos fundadores (tabla 2). Por lo tanto, La prueba de ADN debe llevarse a cabo para identificar cuál de los animales de lana fina en llamas criadas son verdaderamente “puros”, y aquellos que han sido identificadas como raza “pura” se pueden entonces utilizar para desarrollar núcleos de rebaños que tengan el carácter de vellón fino (Coates y Ayerza 2004).

Tabla 2. Se describe el proceso de la erosión genética en los camélidos domésticos. Fuente Bruford, presentada en el VI Congreso Mundial de Camélidos (comunicación personal).

Proceso	Efecto Genético	Aumento o descenso de la diversidad genética	Posibles consecuencias	Soluciones
Intensificación	Pérdida de adaptaciones al ambiente natural	decrece si no se manejan buenos registros	Pérdida de adaptaciones locales	Exelentes registros, para el manejo genetico y mantener el Ne
Línea reproductiva / tecnología de reproducción asistida (en algunos casos)	Perdida del tamaño poblacional efectivo de los machos	decrece	Predominancia de pocos genotipos, pérdida de flexibilidad al cambio ambiental	Manejo cuidadoso en la conservacion del material genetico – gen- drop analysis
Hibridizacion entre camélidos domésticos	Posible caída del cruzamiento, el aumento de la varianza rasgo	Incremento inicial pero incierto a medio termino	abrupta e impredesible modificación fenotípica	Test molecular para identificar los núcleos fundadores
Hibridización con camélidos silvestres	Posible caída del cruzamiento, el aumento de la varianza rasgo	Incremento inicial pero incierto a medio termino	Camélidos silvestres: perdida del Ne. Camélidos domésticos: necesario para selección intensiva	Establecer altos razas de características genéticas en poblaciones "puras" para su posterior selección cuidadosa

2.5. Marcadores Moleculares

2.5.1. El ADN mitocondrial

La mayoría de organismos eucariotas llevan la información hereditaria en el núcleo, plastidio o mitocondria, esta última se acepta generalmente que desciende de procariotas de vida libre (Margulis y Sagan 2001). También conocemos que el ADN nuclear se hereda de manera mendeliana y expresa codominancia alélica (Litt y Luty 1989), y el DNA mitocondrial se hereda únicamente de la madre en la mayoría de las especies reportadas (Frankham *et al.* 2002).

En las células de los mamíferos, cada mitocondria alberga en promedio de 2 a 10 copias de ADN mitocondrial, el cual es circular de doble cadena (Robín y Wong 1988, Tomado de Lee y Wei 2005). Un ADN mitocondrial típico codifica 13 subunidades de proteínas de la fosforilación oxidativa, 2 rARNs del ribosoma mitocondrial, y 22 tARNs necesarios para la traslación de proteínas codificadas por el ADN mitocondrial (Boore 1999). Asimismo, el ADN mitocondrial generalmente presenta una simple y larga región no codificante, la cual se conoce en algunos animales que controla elementos para la replicación y transcripción (Shadel y Clayton 1997). El ADN mitocondrial humano es más susceptible al daño por oxidación que el ADN nuclear y consecuentemente su tasa de mutación es mayor (Richter *et al.* 1988; Ames *et al.* 1993). De tal manera, que la tasa de mutación estimada en la región codificante del ADN mitocondrial es de 2-4% por millón de años (Cann *et al.* 1987; Stoneking *et al.* 1990). Asimismo, ha sido recientemente demostrado que la región D-loop o segmento no codificante del ADN mitocondrial, es altamente susceptible al ataque por compuestos electrofílicos que infligieron con mayor daño oxidativo, cuando se compararon con otras regiones del ADN mitocondrial (Mambo *et al.* 2003). En consecuencia, se han reconocido regiones “*hot spots*” cuyas tasas de mutación son 4 ó 5 veces mayor que el promedio (Pakendorf y Stoneking 2005).

2.5.2. Aplicaciones del ADN mitocondrial

La genética de poblaciones es el principal componente de la genética de la conservación, esta última se ocupa de los efectos de la pérdida de diversidad genética, cambios recientes en la estructuración genética y de la supervivencia a largo plazo de las poblaciones de especies amenazadas (Wan *et al.* 2004). En la mayoría de los casos, se requiere marcadores moleculares sensibles para poder obtener abundante y apropiada data de poblaciones pequeñas para estudiar su diversidad genética, haplotípica y la distribución de los haplotipos en las poblaciones (Frankham *et al.* 2002). Por tal motivo, los genetistas se enfocan en la evolución neutral, loci no codificantes y genomas de organelos; las tasas de evolución del genoma nuclear, mitocondrial y cloroplastidial no son iguales, lo cual afecta a su uso relativo (figura 6). Además, el ADN mitocondrial en animales tiene una tasa de evolución que es de cinco a diez veces más rápido que el genoma nuclear, convirtiendo al ADN mitocondrial en el ideal para estudiar la divergencia entre poblaciones domésticas y silvestres, que presenten tiempos cortos de domesticación (por ejemplo <10 000 años) (Zeder *et al.* 2006). También, el ADNmt presenta regiones variables (por ejemplo la región control) que son típicamente flanqueadas por sitios conservados (por ejemplo ADN ribosomal), para los cuales se pueden diseñar *primers*. Además, es una herramienta barata y permite obtener una visión inicial de la estructura genética de especies no caracterizadas, y representa un método fácil de obtener información sobre la especie en estudio (Galtier *et al.* 2009). El único problema técnico asociado a la amplificación de los genes mitocondriales son los *numts*, regiones del ADNmt insertados en el núcleo en algunas especies (Bensasson *et al.* 2001). En el mundo se desarrollan programas de conservación animal de los recursos Zoogenéticos, podemos mencionar el programa de conservación en Catalunya de España, donde se analizó el ADNmt de trece subpoblaciones de ovejas de raza Xisqueta; se encontró que la raza presenta reducido tamaño poblacional, pero conserva altos niveles de variabilidad genética ($\pi =$

0.01165 ± 0.00056, $h = 0.998 \pm 0.003$). Por otro lado, no se detectaron evidencias de estructuración poblacional, lo que sugiere en cierto modo hay, o antiguamente hubo, un activo intercambio de individuos reproductores o que la raza se fundó a partir de un único *pool* genético (Jordana *et al.* 2007). Así, en Asia y Europa, se analizó la misma región del ADN mitocondrial, encontrándose que la diversidad haplotípica en jabalíes silvestres es 0.912 ± 0.027 y cerdos domésticos es 0.886 ± 0.008 , la estructuración filogeográfica es muy fuerte con respecto a los jabalíes silvestres y permitió evidenciar la ruptura filogeográfica entre Asia y Europa (Van Asch *et al.* 2011).

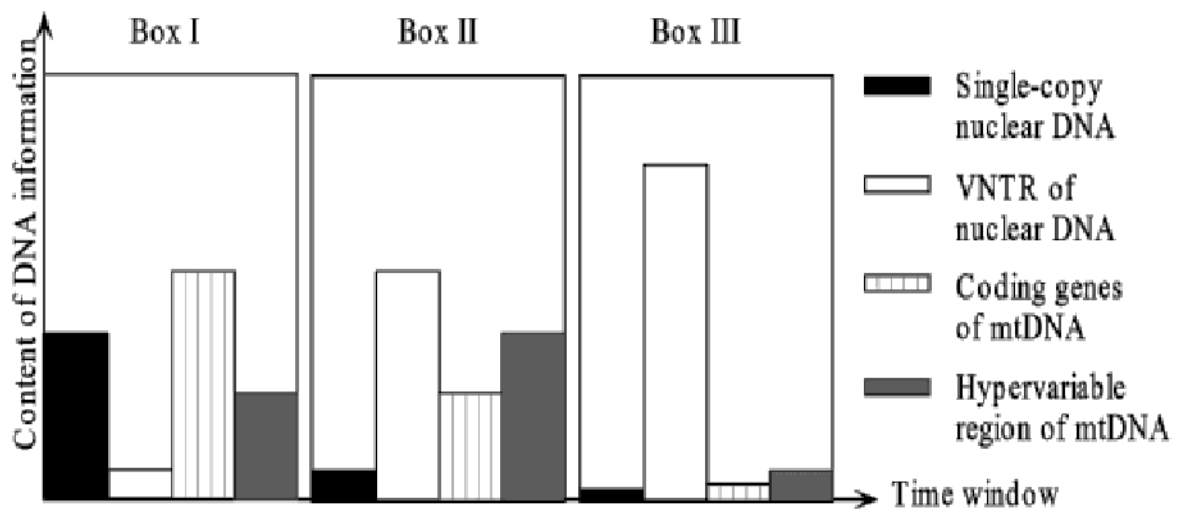


Figura 6. Diferentes variaciones genéticas registradas en ventanas de tiempo diferentes. Box I muestra la variación genética histórica correspondiente al tiempo de especiación. Box II reporta eventos recientes y corresponde al tiempo de diferenciación en unidades de significancia evolutiva. Box III corresponde a patrones genéticos contemporáneos y corresponde al tiempo definiendo unidades de manejo, unidades de acción y “*net family*”. Fuente Wan *et al.* 2004.

2.6. Estudios Genético Poblacionales en Camélidos Sudamericanos.

En los últimos treinta años en Sur América se viene desarrollando estudios ambiciosos a nivel zooarqueológico, ecológico y molecular (Wheeler 1995; Kadwell *et al.* 2001; Maté *et al.* 2004; Bustamante *et al.* 2006; Barreta *et al.* 2012), con el fin de dilucidar completamente el proceso evolutivo e inferir el acervo genético de las poblaciones ancestrales de los camélidos sudamericanos, debido al supuesto cuello de botella originado en la época de la pre conquista planteado por Wheeler (2012).

Por este motivo se ha desarrollado diversos trabajos usando técnicas moleculares en todos los camélidos sudamericanos (CS). Se iniciaron los estudios tomando pequeñas poblaciones de CS en Argentina y Perú, usando el gen mitocondrial del citocromo b, resultando insuficiente para aclarar la ambigüedad existente entre las relaciones filogenéticas de los CS domesticados con sus ancestros (Stanley *et al.* 1994). Posteriormente se amplió el rango de muestreo a Argentina, Chile y Perú, aquí también usaron el gen mitocondrial del citocromo b y además se sumó el uso de 4 marcadores moleculares, a fin de elucidar las relaciones filogenéticas entre los CS (Kadwell *et al.* 2001). Posteriormente, para aclarar completamente las relaciones existentes, se analizaron los genomas completos del ADN mitocondrial, exceptuando la región control (Peng *et al.* 2007). Así, se reforzó completamente la hipótesis encontrada estudiando la evidencia zooarqueológica, en la cual la llama y alpaca descienden directamente del guanaco y vicuña respectivamente (Stanley *et al.* 1994).

En Argentina se estudió la región control del ADN mitocondrial de los CS, procurando elegir individuos que no estén emparentados. Se encontró que la longitud de la región control fue de 1060 pb para todos los CS, se reportó la presencia de secuencias conservadas (CSB I-III) y la secuencia extendida asociada a la terminación I (ESAT I), así también en el dominio 5' de la región control se ha detectado la presencia de un segmento hipervariable de 337 pb. Tal

segmento variable es usado como marcador para los estudios en camélidos enfocados hacia evolución filogenética y diversidad genética de poblaciones (Marín *et al.* 2006). También puede ayudar al diseño de estrategias de mejoramiento y las condiciones de manejo sostenible para esta especie (Maté *et al.* 2004).

A nivel de Genética de poblaciones de CS se viene estudiando: En Chile, donde se ha determinado la distancia genética, usando alozimas en 34 individuos, pertenecientes a las poblaciones de *V. v. mensalis* y *V. v. vicugna*, de la Primera y Segunda región. Se detectó polimorfismo y niveles de heterocigosidad que reflejan un alto grado de variabilidad genética entre las poblaciones analizadas (Norabuena y Paredes 2003).

En Argentina se ha desarrollado dos estudios que involucran poblaciones de llamas, primero se estudió la diversidad genética de una población de llamas y dos poblaciones de guanaco usando seis marcadores de nucleótidos para loci microsatélites de llama; aquí se reporta la heterocigosidad media elevada para ambas especies y la diversidad genética es mayor en la población de guanacos con respecto a las poblaciones de llamas. Notablemente, se reportó el hallazgo de alelos privados para todos los loci analizados en ambas especies, 25 fueron registrados para guanacos y 16 para las llamas (Bustamante *et al.* 2002). Finalmente, se estudió en Argentina tres poblaciones de llamas, las cuales hace diez años fueron subdivididas, y hasta la actualidad han ingresado nuevos individuos en mayor o menor frecuencia. Aquí se estudió 12 loci microsatélites, los análisis realizados mostraron un probable exceso de homocigotos, sin embargo, se reportó la presencia de 44 alelos privados distribuidos en las tres poblaciones estudiadas; esto permitirá diseñar apareamientos dirigidos a mejorar la diversidad genética (Bustamante *et al.* 2006).

En Bolivia, se ha realizado el primer reporte de diversidad genética en poblaciones de *L. glama* (número de individuos muestreados 109), usando el dominio Hipervariable I de la región D-

Loop y el gen citocromo b del ADN mitocondrial, para medir estado actual de su diversidad genética en sus poblaciones y encontrar las relaciones filogenéticas con otras poblaciones de CS (Barreta *et al.* 2012). Sus resultados mostraron que las poblaciones de llamas comparten un *pool* genético ancestral de haplotipos con todas las subespecies de guanacos existentes, distribuidas en Argentina, Chile, Perú y Bolivia.

En el Perú existen escasos estudios en genética de poblaciones usando marcadores moleculares; se ha demostrado la gran importancia de esta área relacionada a esclarecer los procesos de domesticación y manejo sostenible del recurso (Bruford *et al.* 2003). En nuestro país se ha trabajado principalmente con poblaciones de guanacos, vicuñas y alpacas (Wheeler *et al.* 2001; Rodríguez *et al.* 2004). Además, existe un único estudio para el Banco de Germoplasma del INIA estación Ilpa - Puno, donde se analizó 10 marcadores de microsatélite, para medir el grado de variabilidad genética y la estructura poblacional en las dos variedades (alpaca Suri y Huacaya) de alpacas, reportándose que no existe diferencia significativa entre estas dos poblaciones, según el análisis de varianza molecular (La Manna *et al.* 2011).

Por lo tanto, existe un gran vacío en el conocimiento de la variabilidad genética y de la estructura poblacional de las llama en Perú. En consecuencia se hace necesario su estudio, para conocer el estado actual de variabilidad genética de la Estación Experimental del INIA en Quimsachata Puno.

2.7. Análisis genético poblacional

Análisis de Patrones Demográficos

2.7.1. Diversidad Nucleotídica

Es una medida apropiada de polimorfismo del ADN. Es el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias o diversidad nucleotídica. Se define:

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde x_i es la frecuencia de los i th tipos de secuencias de ADN, y π_{ij} es la proporción de diferencias nucleotídicas entre los i th y j th tipos de secuencia de ADN. En una población donde suceden cruces aleatoriamente, π es simple heterocigosidad para el nivel nucleotídico. Y puede ser estimado por cualquiera de las dos formas siguientes:

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} \hat{x}_i \hat{x}_j \pi_{ij}$$

o por,

$$\hat{\pi} = \sum_{i < j} \frac{\pi_{ij}}{n_c}$$

donde, n , x_i , y n_c son el número de secuencias examinadas, la frecuencia de los i th tipos de secuencias de ADN en la muestra, y el número total de secuencias comparadas $[\frac{n(n-1)}{2}]$, respectivamente. En la última ecuación, i y j se refieren a las i th y j th secuencias en lugar de a los i th y j th tipos de secuencias. Si asumimos que π_{ij} 's son constantes, la varianza de la diversidad nucleotídica obtenida por (Según Nei 1987):

$$V(\pi) = \frac{4}{n(n-1)} \left[(6-4n) \left(\sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij} \right)^2 + (n-2) \sum x_i x_j x_k \pi_{ij} \pi_{ik} + \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij}^2 \right]$$

Esta es la varianza generada en el momento del muestreo de la frecuencia alélica y no está incluida la varianza esperada para errores estocásticos.

2.7.2. Número de Haplotipos y Diversidad Haplotípica

Uno de los principales objetivos de los genetistas poblacionales es poder describir la cantidad de variación en las poblaciones y estudiar los mecanismos por los cuales se mantiene esa variación. Por lo tanto, una apropiada medida de la variación genética es el promedio de heterocigosidad o de diversidad genética.

Según Nei (1973) diversidad genética es simplemente una medida de la variabilidad genética, y puede ser usada para cualquier organismo, si es haploide, diploide, o poliploide. También puede ser usada para cualquier tipo de sistema reproductivo. Pero aun así tienen una buena propiedad estadística.

Nosotros denotamos por X_{ij} la frecuencia poblacional del genotipo A_iA_j para un locus, y asumimos que n individuos son muestreados aleatoriamente y sus genotipos son determinados. Decimos que \hat{X}_{ij} es la frecuencia de A_iA_j en la muestra, además el estimado (\hat{x}_i) de la frecuencia alélica x_i (es la frecuencia poblacional de i th alelo para un locus) está dado por $\hat{x}_i = \hat{X}_{ii} + \sum_{i \neq j} \hat{X}_{ij}/2$.

Por lo tanto, un estimador imparcial para h (diversidad haplotípica) está dado como sigue: para n en organismos haploides, si es diploide se reemplaza n por $2n$.

$$\hat{h} = n(1 - \sum \hat{x}_i^2)/(n - 1)$$

Y su varianza está dada por:

$$V_{s1}(h) = \frac{2}{n(2n - 1)} \left\{ 2(n - 2) \left[\sum x_i^3 - \left(\sum x_i^2 \right)^2 \right] + \sum x_i^2 - \left(\sum x_i^2 \right) \right\}.$$

2.7.3. *Mismatch Distribution* y F_s de F_u

Para evaluar si existió una expansión demográfica súbita en las poblaciones se calculó la distribución de diferencias a pares de las secuencias (*mismatch distribution*) (Rogers & Harpending, 1992), la fórmula fue planteada por Watterson (1975) en genes sin recombinación:

$$F_i = \left(\frac{1}{\theta + 1} \right) \left(\frac{\theta}{\theta + 1} \right)^i, \quad (i = 0, 1, 2, \dots)$$

F_i es la probabilidad que un par de secuencias difieran por i sitios. Donde $\theta = 4Nu$, u es la tasa de mutación por generación, y $2N$ es el número de genes en la población.

El test F_s (Fu, 1997), sugiere estimar la probabilidad observada en un muestreo aleatorio con un número de alelos iguales o menores que el valor observado, según los niveles de diversidad y la suposición que todos los alelos son selectivamente neutros.

$$F_s = \ln \left(\frac{\hat{S}}{1 - \hat{S}} \right)$$

- Para F_s negativos, se evidencia un exceso en el número de alelos. Probablemente a ocurrido expansión poblacional reciente.
- Para F_s positivos, es evidencia de deficiencia de alelos, probablemente un reciente cuello de botella o selección.

2.7.4. Redes haplotípicas

El método *median joining* (Bandelt *et al.* 1999), es usado para la construcción de redes haplotípicas, a partir de datos de genéticos poblaciones con libre recombinación, método que combina las características del algoritmo de Kruskal (1956) para hallar los *minimum spanning trees* para un set de secuencias, el cual conecta todos los tipos de nodos sin crear algún ciclo o inferir adicionales nodos (ancestros), tal que la longitud total sea la mínima. El algoritmo de búsqueda heurística empleado es el de máxima parsimonia de Farris (1970), el cual agrega secuencialmente nuevos vértices llamados *median vectors*, con la excepción de que el algoritmo del *median joining* no resuelve los *median vectors*; los *median vectors* pueden ser biológicamente interpretados como posibles secuencias no muestreadas o ancestrales, ya extintas. El programa que desarrolla esta búsqueda estipula que los estados ambiguos son infrecuentes y existe ausencia de recombinación génica; estos requerimientos los cumple el ADN mitocondrial, especialmente la región control, así como el cromosoma Y (Bandelt *et al.* 1995).

2.7.5. Estructuración poblacional

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

La variación molecular en las poblaciones fue estudiada según propone Excoffier *et al.* (1992); la información haplotípica es incorporada dentro de un análisis de formato de varianza, derivado de una matriz del cuadrado de las distancias entre todos los pares de haplotipos. A partir de las distancias se producen estimadores de componentes de varianza (Φ_{ST} estadísticos), que reflejan la correlación de la diversidad haplotípica para diferentes niveles jerárquicos de subdivisión poblacional; la significancia de los componentes de varianza es evaluada usando aproximación por permutaciones.

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2} \quad , \quad \Phi_{CT} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2} \quad , \quad \Phi_{SC} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2}$$

Donde, Φ_{ST} es la correlación aleatoria de los haplotipos dentro de las poblaciones, Φ_{CT} es la correlación aleatoria de los haplotipos dentro de un grupo de las poblaciones y Φ_{SC} es la correlación de la diversidad molecular aleatoria de los haplotipos dentro de las poblaciones, relativa a la de pares aleatorios de haplotipos extraídas de la región.

Análisis de coordenadas principales

Es una técnica numérica implementada por Pearson (1901) que permite correlacionar mejor los patrones de variación dentro de un set de datos multivariados, en este caso nos permite encontrar la relación de las distancias genéticas usando las varianzas (Φ estadísticos poblacionales) entre las poblaciones.

Test de Mantel

Permite evaluar la estructuración geográfica de las distancias genéticas del grupo en estudio, en nuestro caso los rebaños muestreados. Particularmente, el test de Mantel mide el grado de correlación existente entre dos matrices numéricas (Mantel 1967), en nuestro caso de las distancias genéticas y las geográficas. Peakall y Smouse (2012), en nuestro caso usamos las distancias de las varianzas lo cual está incorporado en su software GenAlEx v6.5.

3. Formulación del problema y justificación

3.1. Problema

En la actualidad la selección y conservación que se practica en la Estación Experimental Ilpa - Quimsachata en Puno, con miras al mejoramiento genético en llamas es a nivel fenotípico en las variedades Chaku y Ccara (Huanca *et al.* 2007), sin tener en consideración la existencia de la variedad llama Suri. Se debe a falta de información genética a nivel básico (conocer la variabilidad y diversidad genética poblacional) para poder plantear unidades de manejo, programas de conservación y manejo del recurso Zoogenético. Además, según la FAO (Fernández-Baca 2005) la totalidad de las poblaciones de llamas se encuentran en manos de los pequeños productores (comunidad, parcialidad y minifundio), quienes manejan a las llamas y alpacas en un solo rebaño, sin separarlos por especie, variedad o sexo.

De acuerdo a esto, los análisis genéticos en la especie *Lama glama* con sus tres variedades (Chaku, Ccara y suri) son una herramienta clave para determinar la variabilidad genética, la diversidad haplotípica, los linajes maternos y ciertos eventos de la historia evolutiva de la especie, y es gracias a este tipo de resultados que se pueden esbozar las líneas base de programas de conservación, manejo y programas de mejoramiento de características productivas en la especie.

Por otra parte, los eventos históricos de la domesticación en los camélidos sudamericanos, no se encuentran completamente esclarecidos. Así también, se sabe que en el imperio Incaico se gozaba de características fenotípicas muy finas a nivel de fibra (Wheeler *et al.* 1992). Además se discute mucho el origen de la variedad llama Suri en llamas (Wheeler 2012). De acuerdo a esto, los análisis moleculares permitirán construir un panorama más objetivo de los procesos de domesticación y esclarecimiento del origen de las variedades.

3.2. Preguntas de investigación

- ¿Existe variabilidad y diversidad genética en las poblaciones de llamas de Puno y Cuzco?
- ¿Cuánta diversidad genética es albergada en el Banco de germoplasma *in vivo* de la E.E. Ilpa – Quimsachata en Puno?
- ¿Existe diversidad haplotípica entre las poblaciones de llamas de Puno y Cuzco?
- ¿Existe estructuración en las poblaciones de llamas en Puno y Cuzco?
- ¿Existen haplotipos únicos en las variedades Chaku, Ccara y Suri de llamas?
- ¿Existen haplotipos únicos en las poblaciones de llamas de Puno y Cuzco?

3.3. Hipótesis

Hipótesis H₁

- La diversidad genética en las poblaciones de llamas de las Regiones Puno y Cuzco es similar a la reportada para Bolivia y está representada en la Estación Experimental Quimsachata.

Hipótesis H₀

- La diversidad genética en las poblaciones de llamas de las Regiones Puno y Cuzco es menor a la reportada para Bolivia y no está adecuadamente representada en la Estación Experimental Quimsachata.

3.4. Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la diversidad genética de llamas *Lama glama* (Linnaeus, 1758) en poblaciones de las Regiones de Puno y Cuzco empleando el dominio hipervariable I de la región control del DNA mitocondrial con énfasis en la conservación y manejo de la Estación Experimental Quimsachata.

Objetivos Específicos

- Determinar la diversidad genética en poblaciones de llamas de la Región de Puno y Cuzco.
- Calcular la diversidad haplotípica y nucleotídica de ADN mitocondrial en poblaciones de llamas de Puno y Cuzco.
- Determinar los linajes maternos presentes en poblaciones de llamas de las Regiones de Puno y Cuzco.
- Conocer la relación de los linajes maternos presentes en las poblaciones de Puno y Cuzco.
- Conocer cuan diferentes genéticamente son las poblaciones de las Regiones Puno y Cuzco.
- Determinar la existencia de estructuración genética en las poblaciones de llamas de las Regiones de Puno y Cuzco.
- Conocer el estado genético actual del Banco de Germoplasma de llamas de la Estación Experimental Quimsachata del INIA.
- Plantear planes de manejo y conservación para el Banco de Germoplasma de llamas de la Estación Experimental Quimsachata del INIA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fase de Campo

Del muestro:

El muestreo se realizó en ocho provincias correspondientes a tres Regiones del sur del Perú: Quispicanchi, Canchis y Espinar en Cuzco y Melgar, Lampa, El Collao y Chucuito en Puno, del 15 al 28 de Agosto del 2012. Asimismo, se realizó un remuestreo del Banco de ADN presente en los laboratorios de biología molecular y genómica del INIA (Sede Central Lima), representativo de la Estación Experimental Quinsachata de Puno.

En el sucesivo trabajo se propone cuatro poblaciones para el análisis de los datos generados, esto con el motivo de evaluar el estatus actual de la Estación Experimental Quinsachata de Puno, con respecto a la diversidad del Departamento de Puno y Cuzco. La primera población de estudio se llamó Quimsachata (representa a la E.E. Quimsachata - Puno); la segunda población se denominó Puno Sur (incluye a las provincias de El Collao y Chucuito de Puno; la tercera población es Puno Norte (incluye a las provincias de Melgar y Lampa) y finalmente la cuarta población fue Cuzco (provincias de Quispicanchis, Canchis y Espinar) (tabla 3 y figura 7). El rebaño 17 es considerado de Puno, aunque al momento de plotear en el mapa cayeron en la región Tacna, porque usamos la denominación de los pobladores que los consideraban como Puno.

Se colectó muestras de sangre en tarjetas FTA[®] (Whatman Bioscience) y folículo piloso de 335 llamas para ambos casos, las cuales pertenecen a 32 rebaños, distribuidos en las dos regiones, con énfasis en la Región Puno. Se asegura que los animales sean hembras, descendientes de diferentes madres y lo menos emparentados posibles, ya que el ADN mitocondrial se hereda únicamente de la madre en los mamíferos (Frankham 2002).

Los puntos de muestreo se marcaron con GPS. Las localidades de muestro fueron ploteadas en un mapa (figura 7) usando el software DIVA-GIS v5.1 (Hijmans et al., 2005b).

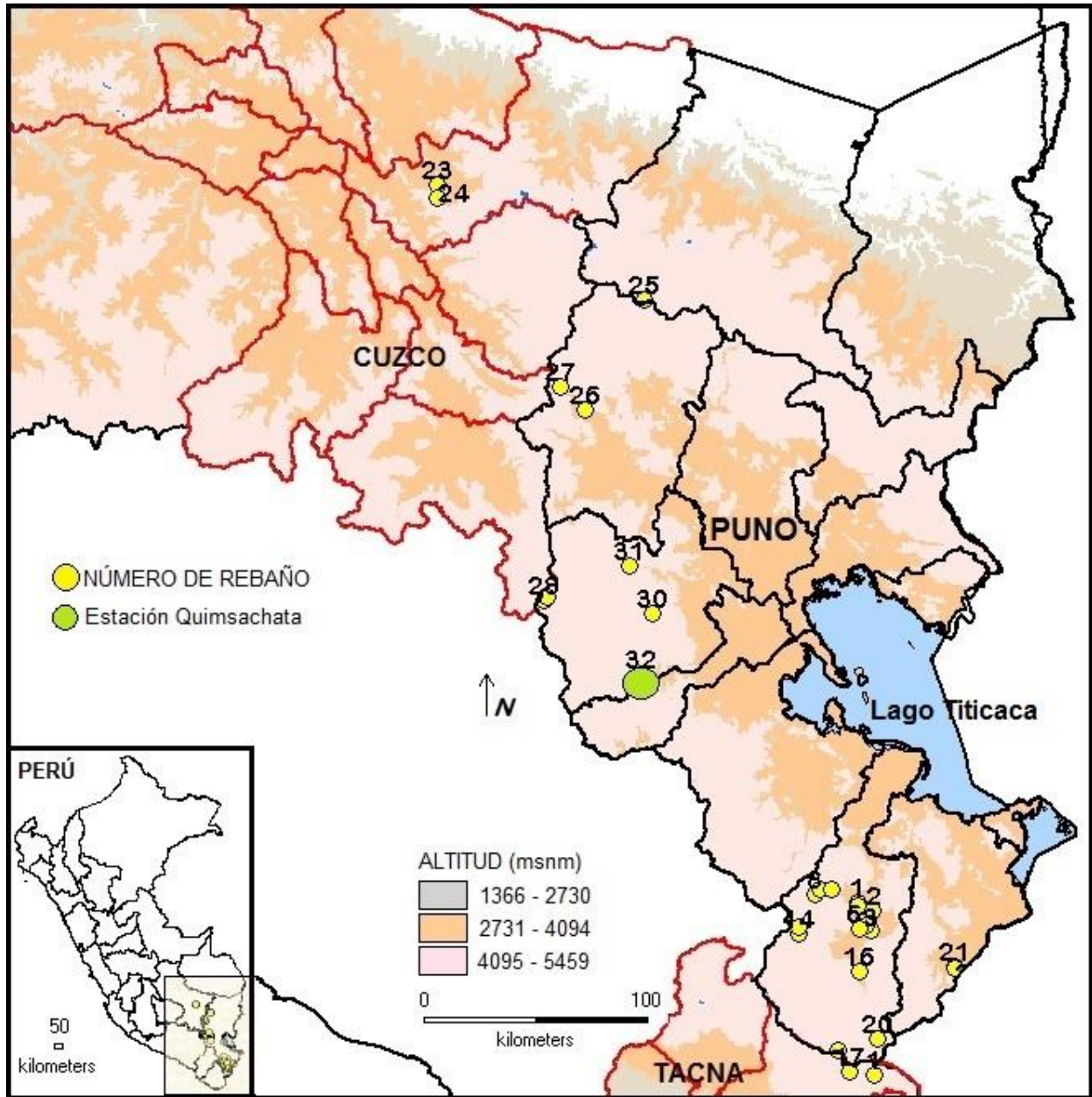


Figura 7. Los puntos amarillos indican las zonas de muestro en las Regiones de Puno, Cuzco. El punto verde lino indica la estación Quimsachata E.E. Ilpa – Puno (Banco de Germoplasma de Camélidos), las coordenadas exactas están en la tabla 3.

Tabla 3. Lista de especímenes de camélidos sudamericanos muestreados (*Lama glama*). Tipo de muestra (P: pelo), localidad, Zona agroecológica (PS: puna seca, PH: puna húmeda), Región (P: puno y C: cuzco), coordenadas geográficas, número de rebaños colectados (R) y número de muestras colectadas (N). * Ver figura 7 y pag. 31.

R	Tipo de muestra	Localidad	Zona Agroecológica	Región	Ubicación geográfica	Altitud	N
1	P	Condoriri, Condoriri	PS	P	16°37' S 69°42' O	3969	7
2	P	Central Quequesama, Condoriri	PS	P	16°39' S 69°39' O	3980	10
3	P	Lacotuyo Chullpa Silvinki, Masocruz	PS	P	16°42' S 69°41' O	3964	5
4	P	Lacotuyo, Masocruz	PS	P	16°44' S 69°39' O	3977	7
5	P	Chullpa - Lacotuyo, Masocruz	PS	P	16°42' S 69°41' O	3973	6
6	P	Unidad ganadera Masocruz	PS	P	16°43' S 69°42' O	3981	8
7	P	Isla Capachica, Masocruz	PS	P	16°37' S 69°42' O	3906	8
8	P	Huancollo, Masocruz	PS	P	16°35' S 69°53' O	4262	4
9	P	Huancollo, Masocruz	PS	P	16°35' S 69°53' O	4286	6
10	P	Huancollo, Masocruz	PS	P	16°34' S 69°52' O	4327	3
11	P	Huancollo, Masocruz	PS	P	16°34' S 69°52' O	4327	5
12	P	Huancollo, Masocruz	PS	P	16°34' S 69°52' O	4327	6
13	P	Huanacamaya, Masocruz	PS	P	16°34' S 69°49' O	4110	8
14	P	Rosario Sacata, Masocruz	PS	P	16°44' S 69°57' O	4546	5

15	P	Rosario Sacata, Masacruz	PS	P	16°43' S 69°57' O	4628	7
16	P	Llusta, Masacruz,	PS	P	16°54' S 69°42' O	3987	2
17	P	Llusta, Masacruz, (Tacna)*	PS	P	17°18' S 69°44' O	4269	2
18	P	Challapalca, Capaso	PS	P	17°13' S 69°47' O	4265	5
19	P	Rosario Alto Ancomarca, Capaso	PS	P	17°19' S 69°38' O	4264	9
20	P	Rosario Alto Ancomarca, Capaso	PS	P	17°10' S 69°38' O	4236	8
21	P	Parcialidad Quenta, Pisacoma	PS	P	16°53' S 69°19' O	3914	11
22	P	Parcialidad Quenta, Pisacoma	PS	P	16°53' S 69°18' O	3950	8
23	P	Llullucha, Quispicanchi	PH	C	13°39' S 71°26' O	3844	3
24	P	Huacatingo, Quispicanchi	PH	C	13°43' S 71°26' O	4021	2
25	P	Toxaccota, Marangani	PH	C	14°16' S 70°57' O	4496	28
26	P	Fundo Huatayhuasi, Santa Rosa	PH	P	14°35' S 70°50' O	3973	23
27	P	Machuas, Santa Rosa	PH	P	14°29' S 70°56' O	4917	25
28	P	Alto Yungarase, Condoroma	PH	C/P	15°22' S 71°00' O	4755	3
29	P	Alto Yungarase, Condoroma	PH	C/P	15°21' S 70°59' O	4716	7
30	P	Comunidad Pucari, Lampa	PH	P	15°25' S 70°33' O	4482	6
31	P	Parcialidad Suatia, Palca	PH	P	15°14' S 70°39' O	4376	6
32	P	Santa Lucía, Lampa	PS - Quimsachata	P	15°04' S 70°78' O	4300	39

De la toma de muestra

La extracción de la sangre se realizó mediante el uso de jeringa hipodérmica de 1 ml, en la cual se extrajo sangre de la vena yugal externa. La sangre extraída se colocó muy rápidamente en una tarjeta FTA[®] (Whatman Bioscience), la cual estaba perfectamente etiquetada (Sexo, variedad, lugar, fecha, edad). Se procuró que la solución (sangre) se encuentre homogéneamente distribuida en la superficie de la tarjeta, exactamente en los espacios indicados, sin permitir que se formen grumos de sangre coagulada, ya que esto impide tener una buena purificación posterior del ADN. Las tarjetas FTA[®] con las muestras se dejaron secar por 10 minutos a condiciones ambientales, siempre cuidando de la sobrexposición al viento, lugares polvorientos o sobrexposición al sol. Por último, las tarjetas se forraron con papel aluminio, encima se le adhirió un código por individuo y agrupó en un sobre de *Manila* diferente por cada rebaño visitado. Las muestras se conservan almacenadas en un área a -23°C en el Laboratorio de Biología Molecular del INIA.

Para la extracción del folículo piloso, se tomó un mechón de muestra de la base de la cola de la llama, para lograr la extracción del pelo con folículo usando siempre guantes estériles. Las muestras de pelo extraídas se guardaron en bolsas *ziploc* debidamente etiquetadas (código de la muestra y número de rebaño) a temperatura ambiente (sin que luz solar incida directamente), hasta el retorno a Lima. En Lima las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente y posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular del INIA para obtener el ADN.

De la colección de datos

Se confeccionó una tabla de datos (Anexo 1) antes de iniciar el proceso exploratorio. Se tomó los datos más relevantes (sexo, raza, edad, arete, localidad, etc.) y se acompañó de un registro fotográfico por cada individuo.

4.2. Fase de Laboratorio

De la Extracción de ADN del Folículo Piloso usando el método modificado fenol – cloroformo

En el presente trabajo se optó por extraer el ADN de las llamas a partir del folículo piloso, mediante el protocolo alcohol – isoamílico, modificado y estandarizado, a partir del protocolo de extracción Fenol – Cloroformo (Sambrook *et al.* 1989), por el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA , por presentar mejor calidad de ADN.

Al iniciar el proceso de extracción a partir de folículo piloso, se debe tener los siguientes equipos: el *Thermoblock*, centrifuga, el *Vortex*, micropipetas, *Tips* (10, 200 y 1000 ul), tubos *Eppendorf* (1.5 y 2 ml), papel toalla, pinza de punta fina, alcohol y mechero.

A continuación se detalla paso a paso el protocolo de extracción de ADN a partir de folículo piloso, el cual tiene una duración de dos días:

Método alcohol – isoamílico y cloroformo:

DIA 1

1. Encender el termo bloque y regular a una temperatura de 55°C.
2. En un tubo de microcentrifuga (2.0 ml) adicionar aproximadamente 40 fibras con folículo piloso, cortando a una distancia de 5 a 10 mm, del folículo.
3. Adicionar 750 ul de T.E. 20:5 y 75 ul de SDS, homogenizar usando *vortex*.
4. Adicionar 20 ul de proteinaza K (20 ng/ul)
5. Adicionar 100 ul de DTT (1M)
6. Incubar a 55 °C x 3 horas
7. Después de las primeras 02 horas de incubación adicionar 20 ul de DTT y dejar seguir la incubación.
8. Retirar los tubos del termobloque y enfriar (10 minutos aproximadamente).
9. Adicionar 500 ul de acetato de potasio 3M, mezclar
10. Refrigerar x 10' a -20 °C.

11. Centrifugar a 14000 rpm x 10 minutos y recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
12. Centrifugar a 14000 rpm x 3 minutos y repartir el sobrenadante en dos tubos de microcentrífuga de 2.0 ml que contengan 800 ul de isopropanol helado.
13. Homogenizar suavemente por inversión para la formación del pelet de ADN y refrigerar x 30' a -20 °C.
14. Centrifugar a 14000 rpm x 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
15. Adicionar 200 ul de TE 20:5, 400 ul de Cloroformo alcohol isoamilico (24:1), homogenizar con Vortex por 1 minuto.
16. Centrifugar a 14000 rpm x 10 minutos y recuperar el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
17. Adicionar 400 ul de cloroformo alcohol isoamilico (24:1), Vortex 1.0 min.
18. Centrifugar x 7' a 14000 RPM, trasvasar el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, que será el tubo definitivo.
19. Adicionar 800 ul de etanol absoluto, invertir suavemente hasta visualizar el algodón de ADN y refrigerar a -20 °C durante 30` o hasta el siguiente día.

DIA 2:

20. Centrifugar X 5` a 14000rpm a 10 °C y eliminar el sobrenadante por inversión. Cuidando de no votar el pellet.
21. Adicionar 200 ul de TE 20:5 y mezclar. Adicionar 8 µl NaCl 5M. Mezclar utilizando Vortex.
22. Adicionar 800 µl de etanol absoluto helado, mezclar invirtiendo el tubo suavemente hasta que se formen los pellets de ADN, dejar a -20°C x 10 minutos.
23. Centrifugar 5` a 14000rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante.

24. Adicionar 400 μ l de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5` a 14000rpm a 10 °C, eliminar sobrenadante por inversión.
25. Adicionar 400 μ l de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5` a 14000rpm a 10 °C, eliminar sobrenadante por inversión.
26. Adicionar 300 μ l de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5` a 14000rpm a 10 °C, eliminar sobrenadante por inversión.
27. Adicionar 400 μ l de etanol absoluto. Centrifugar 5` a 14000rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante por inversión.
28. Adicionar 200 μ l de etanol absoluto. Centrifugar 5` a 14000rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante por inversión.
29. Dejar secar a temperatura ambiente por 1h.
30. Resuspender en buffer TE 10:1 (o en Agua libre de nucleasas), de acuerdo al tamaño del pellet de ADN.
31. Almacenar a -20 °C hasta que se requiera.

De la amplificación del dominio hipervariable I en la región D-loop del ADN mitocondrial

Se utilizó para la obtención de fragmentos deseados la técnica en Cadena de Reacción de la Polimerasa (PCR), la cual se basa en la replicación de un(os) segmento(s) específico(s) de ADN con el uso de una enzima termo-estable (Mullis 1990).

Para el análisis específico de la especie, se eligió el marcador reportado en artículos internacionales (tabla 4), que amplifica el dominio hipervariable I de la región D-Loop del DNA mitocondrial, fue elegido por poseer una alta tasa de mutación confiriéndole importancia al tratarse de un estudio en genética de poblaciones.

Tabla 4. *Primers* empleados para el análisis

Rango de longitud	Primer Forward LThr ARTIO	Primer Reverse H15998	Autor
620 pb	5'GGT CTT GTA AGC CGA AAA AGGA3'	5' CGC AG T CAA ATC AAT TGAAGCTGG3'	Marín 2004

Se usó el protocolo de amplificación estandarizado por Vallejo y Cerna INIA 2011 (Sin publicar), para la amplificación de la región control del dominio hipervariable I. Las concentraciones de ADN usadas para una óptima amplificación fueron a 40 ng/ul. Los ciclos de amplificación fueron: Desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación (*annealing*) de los *primers* a 63°C por 45 segundos, y extensión a 72°C durante 60 segundos, finalmente una extensión final por 60 segundos. El proceso de amplificación se repitió por 35 ciclos. Para el control de la amplificación se utilizó 3ul de agua destilada en vez del ADN, manteniendo los demás componentes.

El mix de PCR para cada muestra contenía: 2µl de Buffer Tris EDTA (10mM), 3µl de MgCl₂ (100mM), 2µl dNTPs (100mM), 0.75µl LthArtio (*forward*) (5µM), 0.75µl H15998 (*reverse*) (5µM), 1ul de ADN a 40ng/µl, 15.3ul de agua ultrapura libre de nucleasas y 0.2µl de *Taq HotStar* (Invitrogen), completando una reacción total de 25ul.

Electroforesis:

Para poder observar el producto amplificado (figura 8) se utilizó cámaras de electroforesis pequeñas para aproximadamente 12 muestras y con un tamaño del gel de 12cm x 12cm. Se preparó geles de agarosa al 2% (agarosa, TBE y bromuro); para saber el tamaño del amplicon, se colocó un *Ladder* de 100 pb.

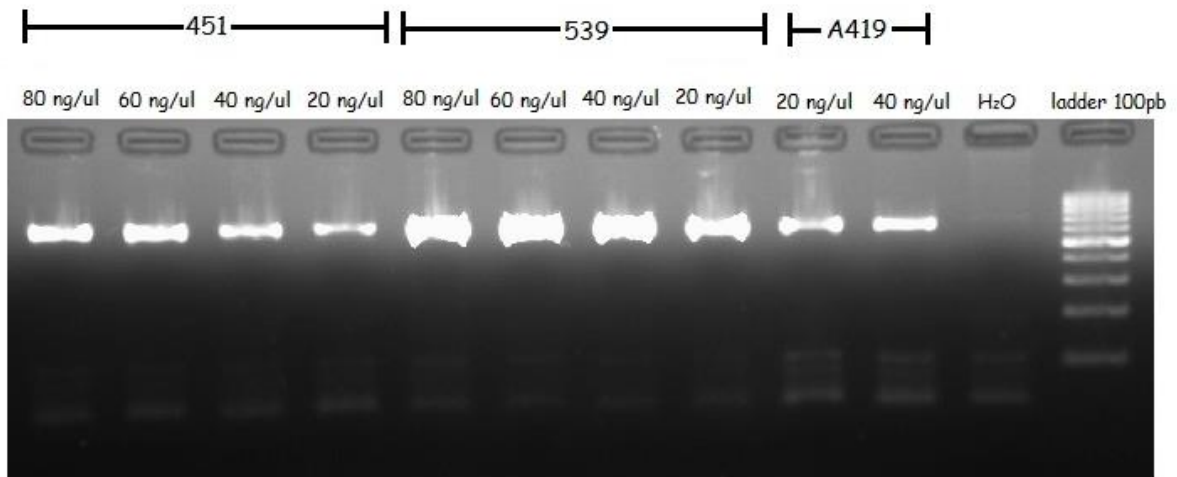


Figura 8. Gel de agarosa al 2%. La numeración 539 corresponde a muestras de ADN de llamas. La numeración A419 corresponde a muestra control de ADN de alpacas. El pocillo donde aparece el H₂O corresponde al control negativo. Se observa que al cambiar la concentración de ADN contenido en las muestras el tamaño del amplicon varía, de tal forma que se escogió la concentración de 40ng/μl.

Parámetros:

- El tiempo de corrida en los geles pequeños y grandes fue de aproximadamente 30 min a 100v.
- La cantidad de muestra que se siembra en cada pozo es de 5μl del producto de PCR con 3ul de buffer de siembra que contiene xilen cianol, azul de bromo fenol, sucrosa y formamida. Para la asignación de los tamaños moleculares se utilizó el *ladder* que va de 100pb en 100pb (Invitrogen), cuyo rango es de 100 pb hasta 10000 pb.

Del Secuenciamiento

Cuando se obtuvo las concentraciones apropiadas de ADN (40 ng/μl) se realizó la Reacción en cadena de la Polimerasa y su posterior evaluación en geles de 38cm x 48cm (Cámaras de electroforesis *Biorad*). Estas muestras en las cuales se visualizó cantidad optima de amplificado, fueron elegidas para la secuenciación respectiva. Se armaron 3 placas con 20ul

del producto amplificado por PCR para cada muestra, en total se enviaron 288 muestras a MACROGEN USA (Maryland - USA), donde se realizó la purificación del amplificado y las reacciones del secuenciamiento fueron realizadas en un secuenciador automático ABI 3730xl. Ambas hebras fueron secuenciadas con los mismos *primers* de PCR.

4.3. Fase de Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron evaluadas y editadas con el software SeqScape v2.5 (Applied Biosystem). Se obtuvo ambas hebras de ADN para cada individuo, una perteneciente a la hebra molde (F) y otra a la complementaria (R). Se usó la secuencia completa de la mitocondria (accesión AP003426 del NCBI) de llama como referencia para el ensamblaje de las hebras complementarias, generándose un *contig* o secuencia consenso (figura 9).

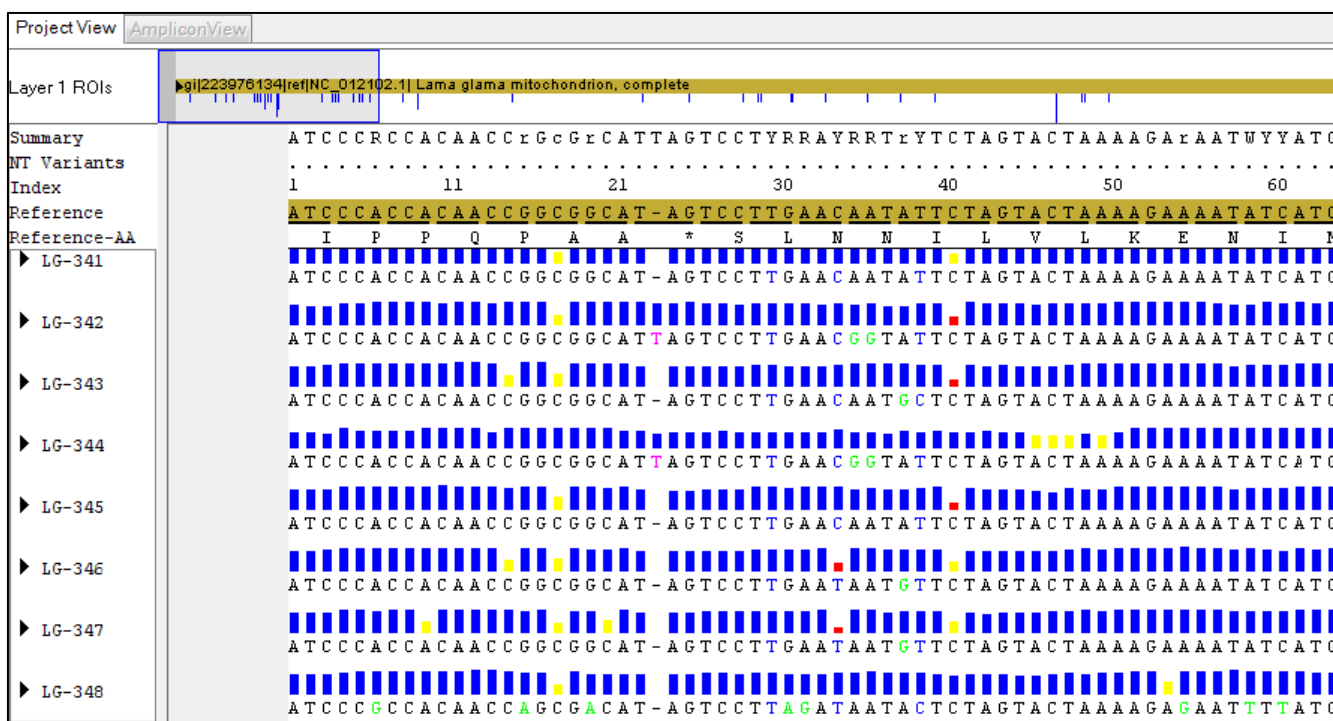


Figura 9. Secuencias alineadas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt con la secuencia de referencia (accesión AP003426 del NCBI). Programa SeqScape v2.7 of Applied Boystems.

Se analizó la tasa de transversiones y transiciones nucleotídicas, a fin de evaluar el grado de saturación de la secuencia con el software DAMBE v5. La diversidad nucleotídica (π), la diversidad haplotípica (h), los sitios polimórficos (s), el promedio de diferencia nucleotídica (k), la F_s de F_u (cuya significancia estadística fue evaluada por una simulación de coalescencia con 10000 permutaciones) y el *mismatch distribution* fueron estimados usando el software DnaSP v5 (Librado y Rozas 2009). La distancia genética entre las poblaciones, grupos se calcularon con el software MEGA v5 (Tamura *et al.* 2011). Además, el set de datos de los 29 haplotipos de llama obtenido en el presente estudio, así como aquel en donde se consideran a las secuencias obtenidas en el *GenBank* (llama, alpaca, vicuña y guanaco, ver anexo 2) fueron sometidos al programa JModelTest v.2 (Darriba *et al.* 2012), para seleccionar el mejor modelo nucleótido al cual se ajustan los datos. Las relaciones evolutivas fueron evaluadas mediante el método de *Neighbor joining* (NJ) para el set de datos de los 29 haplotipos y dos secuencias de guanaco y vicuña, con el programa MEGA v5 (Tamura *et al.* 2011), usando el modelo de sustitución nucleotídica de Jukes y Cantor (1969) propuesto por el JModelTest.

Para representar las relaciones entre los haplotipos (H) y sus frecuencias (f) identificadas se generan árboles no enraizados; este análisis permite observar visualmente patrones demográficos, flujo genético y posibles cuellos de botella en las poblaciones, se usó el software NETWORK v4.6.1.1 (Bandelt *et al.* 1999). La diferenciación genética entre poblaciones, grupos y subgrupos fue determinada por el análisis de varianza molecular (AMOVA), para lo que se asumió *a priori*, dado el objetivo de la tesis, los grupos: “Espinar, Canchis, Quispicanchi”, “Chucuito y El Collao”, “Quimsachata” y “Lampa y Melgar”; se utilizó el software ARLEQUIN v3.5. (Excoffier *et al.* 2007). El análisis de coordenadas principales representa las relaciones genéticas usando las distancias Φ_{PT} (Φ_{PT}), obtenida a partir de la V_{AP} (es la varianza entre las poblaciones) y V_{WP} (varianza dentro de las poblaciones) (Peakall y Smouse 2012), en un conjunto de individuos que pertenecen a las Regiones de Puno y Cuzco, se usó el software

GenAIEx v6.5 (Peakall y Smouse 2012). El Test de Mantel se realizó con el software GenAIEx v6.5 (Peakall y Smouse 2012).

Finalmente, a fin de conocer los linajes ancestrales presentes en las poblaciones de llamas de las Regiones de Puno y Cuzco, y sus relaciones evolutivas se evaluaron las secuencias obtenidas en el presente estudio con el total de secuencias del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial reportadas hasta la fecha para las cuatro especies de camélidos sudamericanos, y que se encuentran depositadas en el *GenBank* (08 llamas chilenas, 182 de guanaco, 69 de vicuña y 11 alpacas (anexo 2) y los 29 haplotipos encontrados para las Regiones de Puno y Cuzco. Las secuencias fueron alineadas con ClustalX (Larkin *et al.* 2007). El número de haplotipos fue obtenido con el software DnaSP v5 (Librado y Rozas 2009) y finalmente se construyó la red de haplotipos con el software *NETWORK* v4.6.1.1 (Bandelt *et al.* 1999). Además, se obtuvo una filogenia usando el método de inferencia bayesiana (Larget y Simon 1999) para el set completo de haplotipos únicos de guanacos, vicuñas, alpacas, llamas y los 29 haplotipos de las regiones Puno y Cuzco, juntamente con dos secuencias de camellos como grupo externo (*GeneBank* EF471320.1 y EF471319.1); el análisis se evaluó con el programa Mr. Bayes v3.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) con los parámetros propuestos por el programa JModelTest v.2 (Darriba *et al.* 2012), K80 + I +G, evaluando las topologías mediante el algoritmo Metropolis Coupled Monte Carlo Markov Chain (MCMCMC), y usando 2 cadenas de Markov con 1 millón de generaciones cada una, cada generación representa una hipótesis de relaciones filogenéticas entre los organismos (i.e. árbol filogenético), a cada paso de la cadena el programa evalúa la topología del árbol construido, por ello no se necesita realizar un análisis de bootstrap. Se eliminaron los primeros 2500 árboles muestreados (*burning*), debido a que poseían bajos valores de probabilidad posterior. El árbol consenso se observó con la aplicación Fig Tree (Rambaut 2009).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis y Descripción de las secuencias

En total se consiguió la amplificación de 282 secuencias de *Lama glama* de la Región Puno y Cuzco: 39 de Quimsachata (Banco nacional de Germoplasma de camélidos), 61 de Puno Norte (Provincias de Melgar y Lampa), 139 de Puno Sur (Provincias de El Collao y Chucuito) y 43 de Cuzco (Provincias de Quispicanchi, Canchis y Espinar). Las secuencias obtenidas del dominio hipervariable I de la región control tienen de 514 a 515 nucleótidos, la composición nucleotídica promedio de las 282 secuencias analizadas es 27.7% (T), 26.6% (C), 27.9 % (A) y 17.8% (G). Además, se obtuvo los porcentajes para GC (44.36%) y GT (45.49%).

Se halló la relación entre el número de transiciones y transversiones comparando las secuencias obtenidas de a pares, empleando el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura y Nei (1993) con un bootstrap de 10000, la tasa de sustitución por sitio bajo el parámetro gamma (5 categorías, parámetro 0.0500); todas las posiciones con *gaps* y los datos perdidos fueron eliminados. Se encontró $R = 15.52$, además se realizó la gráfica correspondiente (Figura 10).

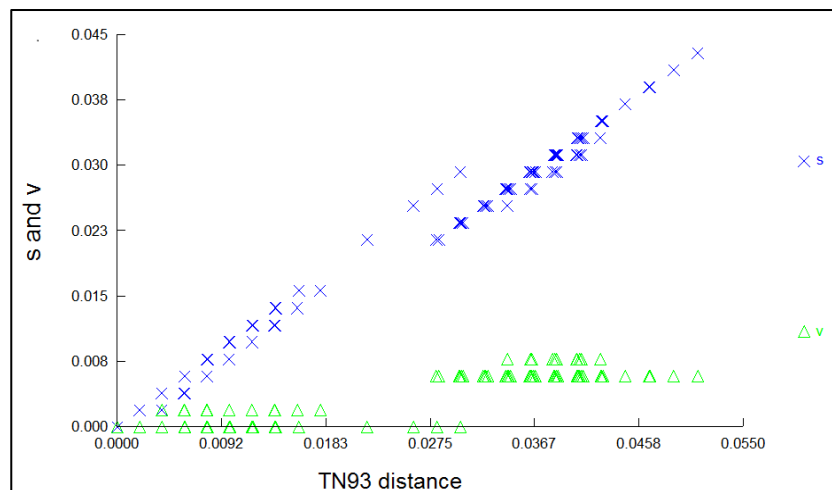


Figura 10. Transiciones (s) y transversiones (v) comparadas contra las distancias a pares entre los 29 haplotipos del dominio Hipervariable I de la región control de llamas (*Lama glama*) de las Regiones de Puno y Cuzco. El modelo de distancia utilizado fue el de TN93 (Tamura y Nei 1993). Programa DAMBE v5.

En el gráfico se observó que las transiciones y transversiones no presentan saturación, por lo tanto dichas secuencias son óptimas para la construcción de árboles filogenéticos, además las distancias entre pares de secuencias son pequeñas.

Las 282 secuencias de *Lama glama* analizadas en el presente estudio tienen 476 sitios monomórficos (no informativos), un *indel*, 38 mutaciones totales, 37 sitios polimórficos, 1 *singleton* (secuencia con una mutación única dentro de la población) y finalmente 35 sitios informativos de parsimonia (tabla 5).

Se tienen un *indel*, una inserción de timina (T) en la posición 23. Los sitios informativos de parsimonia se ubican en las posiciones: 6, 32, 35, 36, 55, 69, 73, 85, 126, 192, 218, 243 y 259 producto de transición A → G; en las posiciones 15, 19, 31, 38 y 340 transición de G → A; en las posiciones 30, 34, 39, 60, 67, 219, 230 y 271 la transición T → C; en las posiciones 61, 70, 212, 284, 339 y 349 la transición C → T; en las posiciones 59 y 491 la transversión A → T; en la posición 231 la transversión A → C.

Además, un *singleton* en la posición 175 y en la posición 91 se evidencia la sustitución nucleotídica C ↔ G ↔ T, que puede deberse a sucesivas transiciones o transversiones, sin embargo esta secuencia se encuentran homogéneamente distribuida entre las poblaciones.

5.2. Determinación de Haplotipos Mitocondriales

Los haplotipos (H) son secuencias únicas que presentan un patrón de composición nucleotídica similar dentro de una población, y son la evidencia de los linajes maternos ancestrales. Por lo tanto, es importante conocer su distribución, frecuencia y evolución.

En las 282 secuencias del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt se encontraron 29 haplotipos (tabla 5, figura 11). El haplotipo 3 (H_3) es el más abundante, con una frecuencia de 40 individuos distribuidos homogéneamente en la población. Los haplotipos

H_11 y H_29 presentaron solo una mutación con respecto al haplotipo más frecuente, con una frecuencia de 13 y 1 respectivamente (este último corresponde al *singleton*). El H_15 presentó 23 mutaciones con respecto al haplotipo más frecuente. Los H_7, H_10 y del H_12 al H_29 son haplotipos con frecuencias de 5 y 1 individuos en el total de las poblaciones analizadas. Los H_1, H_2, del H_4 al H_6, H_8, H_9 y H_11 son los haplotipos más frecuentes y de amplia distribución entre las poblaciones.

Tabla 5. Haplotipos (H) encontrados en las Regiones de Puno y Cuzco de llamas, del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial. F = frecuencia del haplotipo en la población total. En la posición 23 se aprecia el *indel* y la posición 175 es un *singleton*.

Posición Absoluta	6	1	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	5	5	6	6	6	6	7	7	8	9	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	F		
	5	9	3	0	1	2	4	5	6	8	9	5	9	0	1	7	9	0	3	5	1	2	7	9	1	1	1	1	1	3	3	4	5	7	8	3	4	4	9	
																							6	5	2	2	8	9	0	1	3	9	1	4	9	0	9	1		
H_1	A	G	G	-	T	G	A	T	A	A	G	T	A	A	T	C	T	A	C	A	A	C	A	T	A	C	A	T	T	A	A	A	T	C	C	G	C	A	40	
H_2	A	.	.	-	C	.	.	C	.	.	.	C	G	C	.	.	G	31	
H_3	.	.	.	-	.	.	C	.	.	.	C	G	49
H_4	.	.	.	-	.	.	C	.	.	A	G	26	
H_5	.	.	.	-	.	.	C	.	.	A	G	G	20	
H_6	G	A	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	G	.	G	.	C	G	T	.	21		
H_7	.	.	.	-	.	.	C	.	A	.	.	.	C	G	3	
H_8	.	.	.	-	T	.	C	G	G	A	G	26	
H_9	G	A	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	G	.	G	.	C	G	T	.	12		
H_10	.	.	.	-	G	.	.	.	C	1	
H_11	.	.	.	-	C	13	
H_12	.	.	.	-	.	.	C	.	.	C	G	G	C	2	
H_13	.	.	.	-	T	.	C	G	G	A	G	G	2	
H_14	.	.	.	-	C	.	C	C	.	G	5	
H_15	G	.	A	-	C	A	.	.	.	C	G	T	C	T	.	T	G	G	T	.	.	T	.	C	C	C	G	.	.	T	A	T	T	2		
H_16	.	.	.	-	C	.	C	.	.	C	G	G	.	.	C	.	G	3		
H_17	.	.	.	-	C	.	C	C	G	1	
H_18	.	.	.	-	.	.	C	.	A	G	G	2		
H_19	G	A	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	T	.	G	.	G	C	C	G	T	.	1			
H_20	G	A	A	-	A	G	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	T	.	G	.	G	.	C	G	T	.	3			
H_21	.	.	.	-	C	.	C	G	1		
H_22	.	.	.	-	C	.	C	G	G	2		
H_23	G	A	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	C	G	.	G	.	T	.	G	C	G	T	.	1				
H_24	.	.	.	-	.	.	C	.	C	G	.	T	.	.	G	4			
H_25	G	.	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	T	.	T	G	.	C	C	G	C	.	.	.	T	.	1			
H_26	G	A	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	T	.	.	G	.	C	G	T	.	5				
H_27	G	A	A	-	A	.	.	.	A	C	G	T	.	T	G	G	T	.	G	.	G	.	T	.	G	.	G	C	C	G	.	T	.	.	T	.	3			
H_28	.	.	.	-	.	.	C	.	C	T	G	1		
H_29	.	.	.	-	C	1		

En la figura 11, se indica la distribución y frecuencia de los 29 haplotipos encontrados en las siete poblaciones estudiadas. Los haplotipos del H_1 al H_5, H_8 y H_11 son frecuentes y ampliamente distribuidos en las cuatro agrupaciones consideradas (Quimsachata, Puno Sur, Puno Norte y Cuzco).

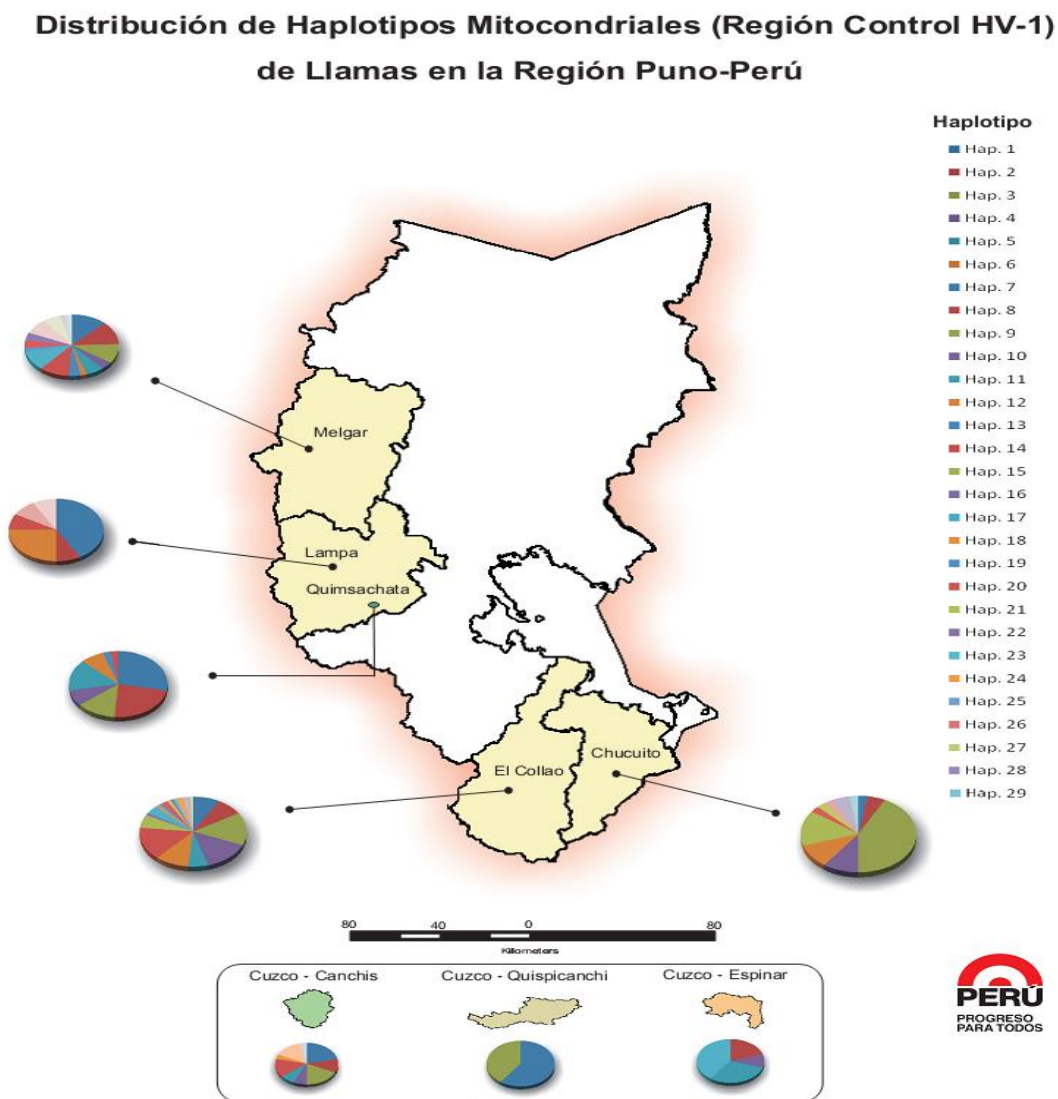


Figura 11. Distribución de frecuencias haplotípicas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de llamas (*Lama glama*), por provincia muestreada de la Región Puno, Cuzco.

Los haplotipos restringidos a cada grupo se indican a continuación: Cuzco tiene los H_24 y H_25; Puno Norte tiene los H_7, H_26, H_27, H_28 y H_29; y finalmente la Puno Sur tiene a los H_9, H_10, H_15, H_17, H_18, H_19, H_21, H_22 y H_23. La población de Puno Sur es la que evidencia gran cantidad de haplotipos únicos.

También se evaluó las frecuencias de cada haplotipo dentro de las tres variedades de llamas involucradas en el estudio (Figura 12). En este caso solo se evaluaron 268 secuencias, ya que para las catorce restantes no se tenían registradas sus variedades correspondientes, todas las muestras excluidas pertenecen a la población de Quimsachata.

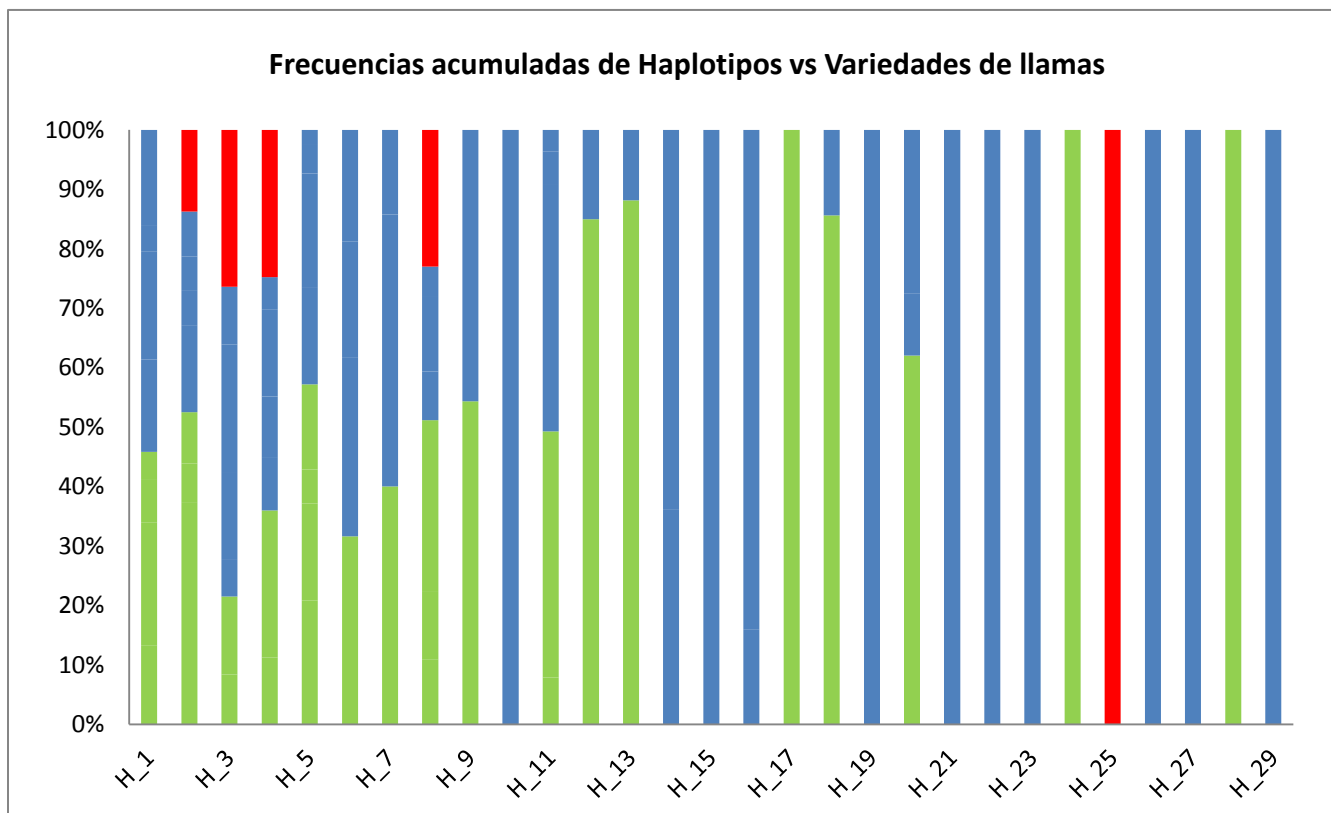


Figura 12. Distribución de frecuencias haplotípicas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de *Lama glama*, según la variedad de llama muestreada de la Región Puno, Cuzco. El color azul corresponde a la variedad Ccara, el verde a la variedad Chaku y el rojo a la variedad Suri.

Se puede apreciar la existencia de haplotipos restringidos a cada variedad de llama: Ccara tiene a los H_10, H_14, H_15, H_16, 19, H_21, H_22, H_23, H_26, H_27 y H_29; el Chaku tiene a H_17, H_24 y H_28; Suri presenta al H_25. Los haplotipos restantes se encuentran distribuidos en diferentes frecuencias en todas las variedades de llamas.

5.3. Patrones Demográficos

Para hallar los diferentes índices de diversidad genética se emplearon las 282 secuencias, para el análisis de *L. glama* de las regiones de Puno y Cuzco. El análisis se realizó en el software DnaSP v5. La población total presenta 29 haplotipos, con 37 sitios polimórficos y un *singleton*; y además, la diversidad haplotípica y la nucleotídica son altas (0.90768 ± 0.006 y 0.01472 ± 0.00078 respectivamente) (tabla 6). También se realizó el *mismatch distribution* (figura 13), el cual es una tabulación del número de diferencias entre pares de secuencias de ADN en la muestra (Schneider y Excoffier 1999).

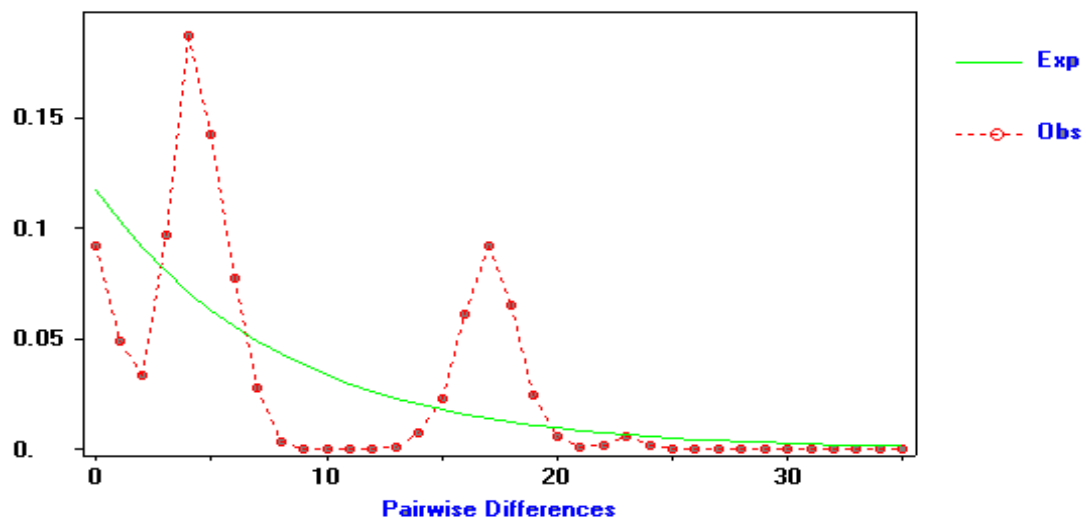


Figura 13. *Mismatch Distribution* de las 282 secuencias del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de *Lama glama*, de las Regiones de Puno y Cuzco. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. La línea continua representa el modelo demográfico de cuello de botella genético seguido por crecimiento poblacional y expansión súbita, lo cual no corresponde a los datos observados.

La curva observada (obs) sigue una distribución bimodal, y es diferente a la curva esperada (Exp), el modelo demográfico de cuello de botella genético seguido por crecimiento poblacional y expansión súbita. Se observan dos picos en la curva observada, el primer pico de 4 a 7 pares de base de diferencia presentes en mayor frecuencia y el segundo pico de 16 a 19 pares de base de diferencia presentes en menor frecuencia. Además, se utilizó el estadístico F_s de Fu para obtener soporte para la hipótesis de expansión poblacional, el estadístico $F_s = -0.206$ (con el valor $p > 0.05$, valor no significativo).

Tabla 6. Resumen de los diferentes índices de diversidad encontrados en los cuatro grupos de *L. glama* analizadas usando el dominio hipervariable I de la región control del ADNmt. N = número poblacional, #Hap = número haplotipos diferentes en la población.

Población	N	# Haplotipos	Diversidad Haplotípica (S.D)	Diversidad Nucleotídica Pi (S.D)	Sitios Polimorficos	Singleton Variable sites	Promedio número de diferencias nucleotídicas (K)
Quimsachata	39	8	0.83536 ± 0.030	0.01085 ± 0.00186	24	3	
Puno Norte	61	17	0.92514 ± 0.014	0.01652 ± 0.00152	28	2	
Puno Sur	139	22	0.89365 ± 0.013	0.01613 ± 0.00107	35	1	
Cuzco	43	10	0.89147 ± 0.019	0.00876 ± 0.00125	26	13	
TOTAL	282	29	0.90768 ± 0.006	0.01472 ± 0.00078	37	1	7.5492

Por otro lado, el análisis por grupos encontramos (tabla 6): Quimsachata presenta diversidad haplotípica y nucleotídica (0.83536 ± 0.030 y 0.01085 ± 0.00186 respectivamente) más baja con respecto al resto de grupos, tres *singletons* y además el menor número de sitios polimórficos. Los grupos de Puno Sur y Cuzco comparten similar diversidad haplotípica (0.89 ± 0.013); sin embargo, Puno Sur presenta la mayor cantidad de haplotipos (22) y sitios polimórficos (35), además, su diversidad nucleotídica (0.01613 ± 0.00107) supera a Cuzco (0.00876 ± 0.00125), el cual presenta la menor diversidad nucleotídica de los grupos estudiados. Sin embargo, Cuzco tiene diez haplotipos, 13 *singletons* y 26 sitios polimórficos.

Puno Norte tiene la mayor diversidad haplotípica (0.92514 ± 0.014), similar diversidad nucleotídica con Puno Sur (0.0165 ± 0.00152), 28 sitios polimórficos y dos *singletons*. Es muy probable que las medidas de diversidad haplotípica así como la nucleotídica sean similares en algunos casos debido al tamaño poblacional.

Para consolidar la información brindada por los índices de diversidad, se analizó la diferenciación genética existente entre las poblaciones calculando distancias genéticas con el *software* MEGA v5. Los parámetros para hallar la distancia fueron: La varianza se estimó mediante el método de *bootstrap* con 10000 repeticiones, el modelo de sustitución nucleotídica empleado fue Tamura y Nei (1993), la tasa de cambio entre sitios se ajustó a la distribución Gamma. Y finalmente con los datos de las distancias se generaron los árboles mediante los métodos de *Neighbor Joining* (NJ) y UPGMA.

Los árboles generados por NJ y UPGMA en base a las distancias genéticas, tienen la misma topología, pero las relaciones existentes entre las poblaciones no concuerdan con la cercanía geográfica de las poblaciones (provincias) analizadas. En general los valores de distancia son pequeños. El mayor valor encontrado es de 0.02073573, corresponde a la provincia de Lampa con Chucuito, y el menor es 0.00712464, corresponde a Espinar con Quispicanchi. Se puede observar dos grupos bien diferenciados (Región Cuzco y Región Puno). La Región Puno, está dividida como Puno Norte (Melgar y Lampa), Puno Sur (El Collao y Chucuito) y Quimsachata; sin embargo, se observa que Melgar y Lampa presentan mayor diferenciación genética (0.02018133) siendo colindantes.

Además, la diferencia genética entre Quimsachata y Lampa es 0.01919616, aunque la E.E. Quimsachata se encuentre dentro de la provincia de Lampa (figuras 14 a 17).

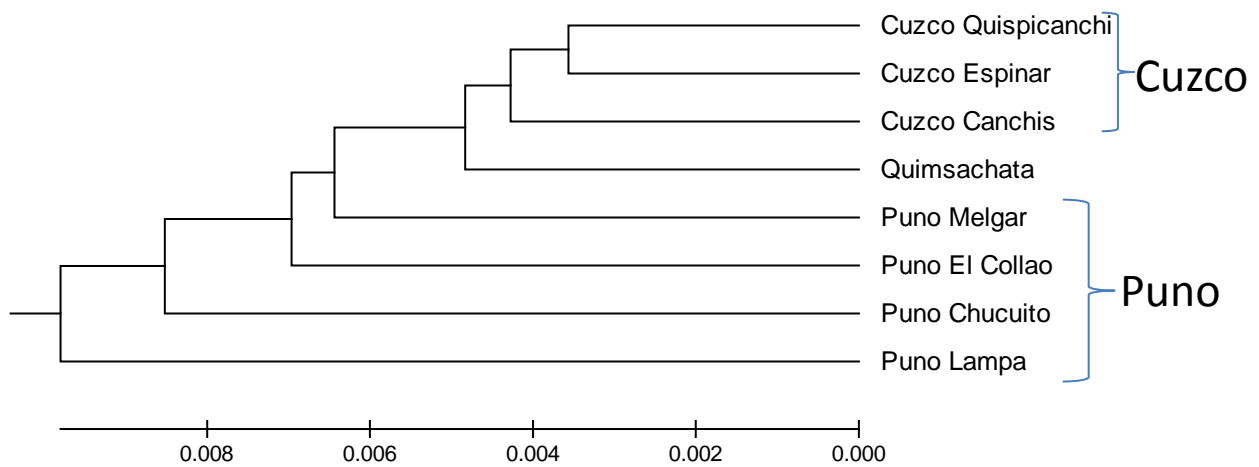


Figura 14. UPGMA usando las distancias genéticas por poblaciones (provincias), dentro de dos regiones, obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.

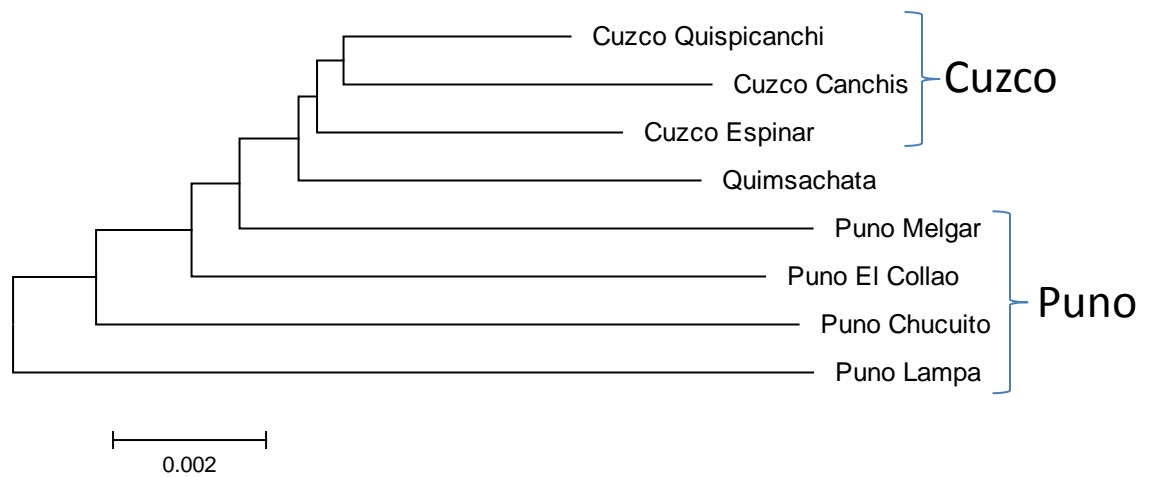


Figura 15. Neighbor Joining usando las distancias genéticas entre provincias, obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.

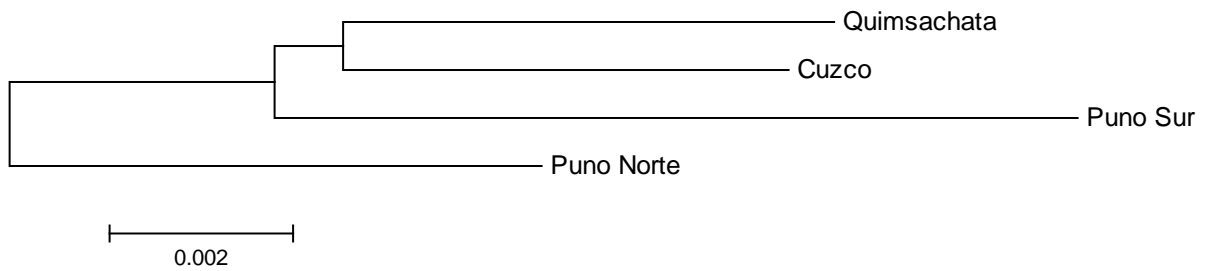


Figura 16. Neighbor Joining usando las distancias genéticas entre los grupos designados *a priori*, obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.

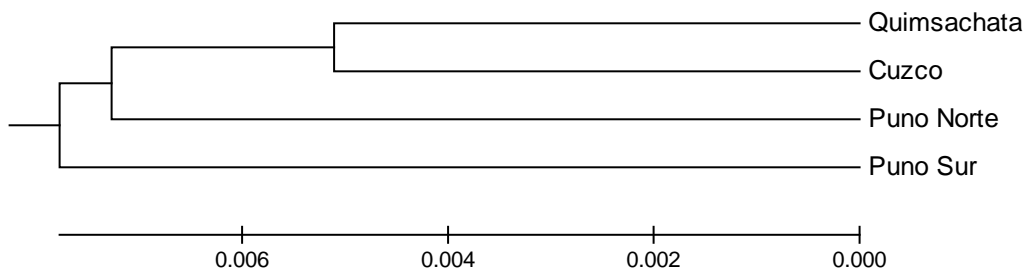


Figura 17. UPGMA usando las distancias genéticas entre grupos designados *a priori*, obtenidas del dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial.

En el árbol podemos observar dos clados bien diferenciados y con un soporte de *bootstrap* de 99 para ambos casos (figura 18). El clado B está conformado por los haplotipos: H_6, H_9, H_15, H_19, H_20, H_23, H_27, H_25 y H_26, y haplotipos que en su gran mayoría se presentan con frecuencias menores a 5 individuos en la población analizada total, a excepción del H_6 y H_9.

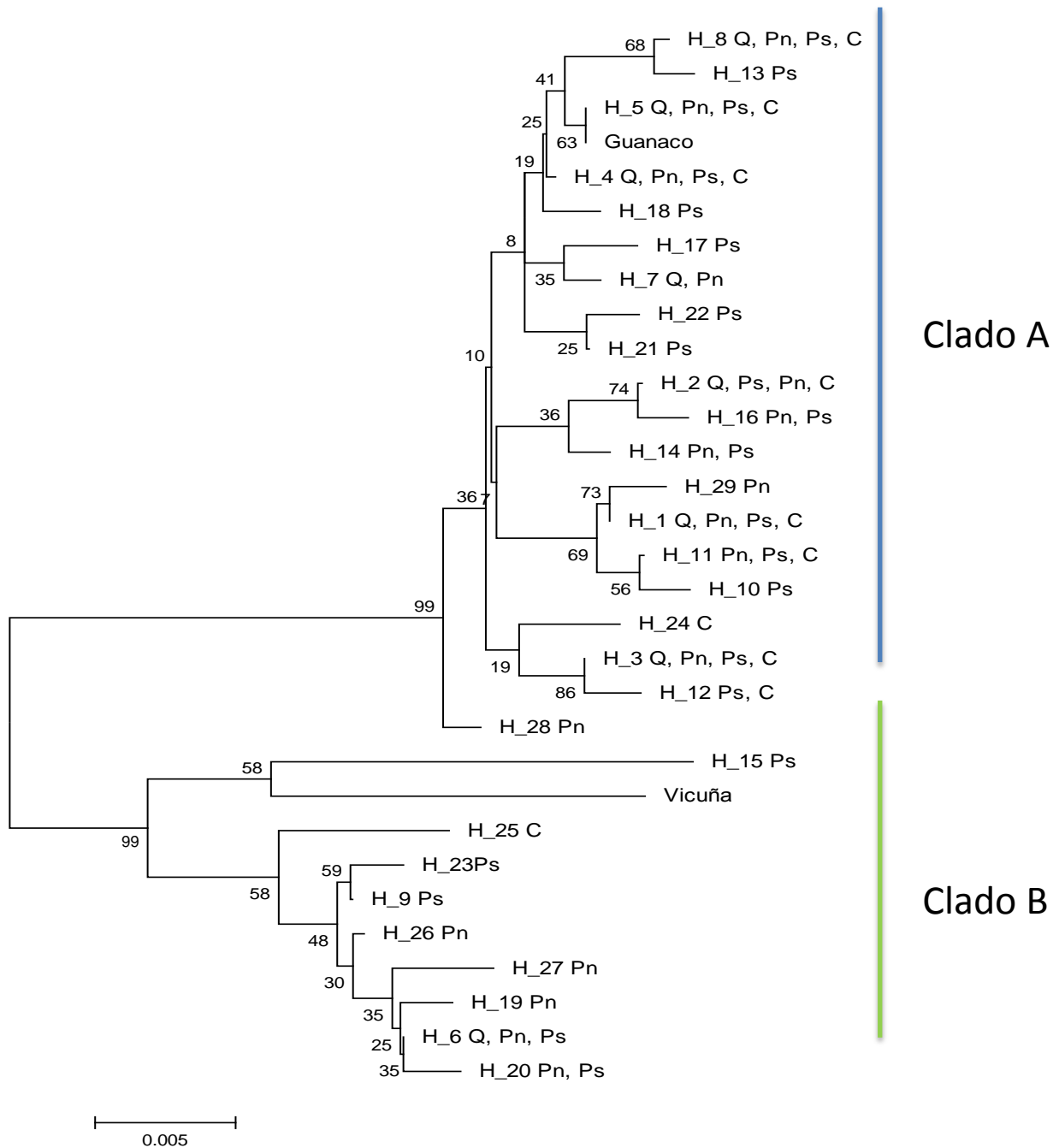


Figura 18. *Árbol filogenético* usando *Neighbor Joining* de los 29 haplotipos pertenecientes al dominio hipervariable I de la región control de ADNmt de las Regiones Puno y Cuzco. Los números sobre las ramas indican el porcentaje de *bootstrap*. Se hace referencia a los grupos estudiados Quimsachata (Q), Pn (Puno Norte), Ps (Puno Sur) y C (Cuzco) y se observan dos clados bien soportados (Clado A= haplogrupo guanaco y Clado B= haplogrupo vicuña). Están incluidas dos secuencias del *GenBank* JX678590.1 (guanaco) y AY856341.1 (Vicugna) para mayor detalle.

Sin embargo el soporte de *bootstrap* de los nodos internos de este primer Clado no es significativo ya que son menores a 75% *bootstrap*. El Clado A está conformado por los haplotipos: H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_7, H_8, H_10, H_11, H_12, H_13, H_14, H_16, H_17, H_18, H_21, H_22, H_24, H_28 y H_29; en este clado hay haplotipos con frecuencias muy altas en las poblaciones. Se hace evidente que en un estudio de individuos cercanamente relacionados, como es el caso, donde se evalúan relaciones de secuencias dentro de una misma especie, la construcción de árboles filogenéticos no es de gran ayuda, se precisa la construcción de las redes haplotípicas (Bandelt *et al.* 1999).

5.4. Redes haplotípicas (*Networks*)

A nivel general, observamos claramente dos clústeres bien diferenciados y separados por 13 mutaciones (figura 19), donde se han generado *median vectors* (mv2 y mv5) para unir estos dos clústeres. Ninguno de ellos presenta topología en estrella indicadora de posibles cuellos de botella y expansión súbita reciente.

Primero, el clúster de la derecha (figura 19) está compuesto por nueve haplotipos: El H_6 (f = 21) presente en Quimsachata, Puno Norte y Puno Sur, H_9 (f = 12), H_19 (f = 1) y H_23 (f = 1) están presentes en Puno Sur, H_26 (f = 25), H_27 (f = 3) distribuido en Puno Norte y el H_20 (f = 3) está distribuido en Puno Sur y Puno Norte, son haplotipos cercanamente relacionados, separados por solo una mutación en la gran mayoría de los casos; también, el H_15 (f = 2) se encuentra en Puno Sur y H_25 (f = 1) pertenece a Cuzco. Estos dos últimos haplotipos pertenecen a este primer clúster, sin embargo están separados por 6 mutaciones en el caso del H_25 y en el caso del H_15 por quince pasos mutacionales, muy probablemente represente un linaje muy antiguo. Además se generaron *median vectors* (mv3 y mv4) para unir los H_15 y H_25 con el primer clúster.

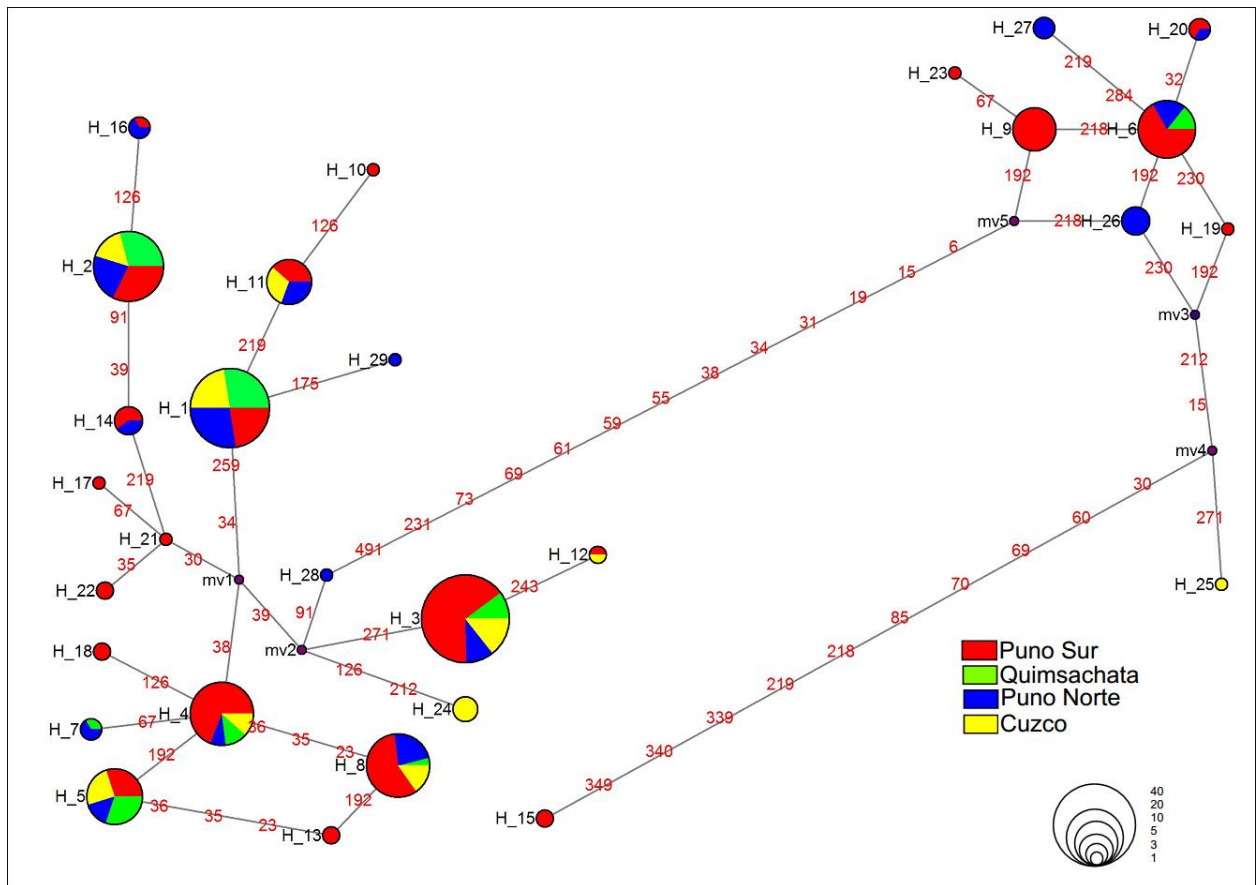


Figura 19. Median Joining Network de los 29 haplotipos pertenecientes a las Regiones de Puno y Cuzco, del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt. Los colores son las agrupaciones de acuerdo a la ecorregión. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia.

El clúster de la izquierda (figura 19) contiene los 20 haplotipos restantes, estos haplotipos están distribuidos en cuatro subgrupos bien diferenciados dentro del clúster: El primer subgrupo conformado por el H_3 (f = 49) distribuido en Quimsachata, Puno Norte, Puno Sur y Cuzco; el H_28 (f = 1) pertenece a Puno Norte; el H_24 (f = 4) pertenece a Cuzco y H_12 (f = 2) está distribuido tanto en Puno Sur y Cuzco. El segundo subgrupo tiene a los H_4 (f = 26), H_8 (f = 26) y H_5 (f = 20) distribuidos en Quimsachata, Puno Sur, Puno Norte y Cuzco; Los H_18 (f = 2) y H_13 (f = 2) pertenecen a Puno Norte y el H_7 (f = 3) presente en Quimsachata y Puno Norte. El tercer subgrupo el H_21 (f = 1), H_22 (f = 2) y H_17 (f = 1) distribuidos solo en Puno Sur, los H_14 (f = 5) y H_16 (f = 3) se encuentran en Puno Sur y Norte, y el H_2 (f = 31) en

Quimsachata, Puno Norte, Puno Sur y Cuzco. Finalmente el cuarto subgrupo con los H_1 (f = 40) y H_11 (f = 13) distribuidos en Quimsachata (excepto H_11), Puno Sur, Puno Norte y Cuzco; el H_29 (f = 1) presente en Puno Norte y el H_10 (f = 1) pertenece a Puno Sur.

Ahora, en el análisis por variedades (Figura 20), la variedad Chaku tiene a los H_17, H_28 y H_24 únicos; la variedad Ccara presenta a los H_10, H_14, H_15, H_16, H_19, H_21, H_22, H_23, H_26, H_27 y el H_29 únicos; y finalmente la variedad llama Suri tiene al H_25 como único. Los haplotipos restantes están compartidos en su gran mayoría por la variedad Chaku y Ccara, a excepción de los H_2, H_3, H_4 y H_8 por las tres variedades de llamas evaluadas. Además, coincidentemente este último grupo de haplotipos están ampliamente distribuidos y se encuentran con mayor frecuencia en la población analizada.

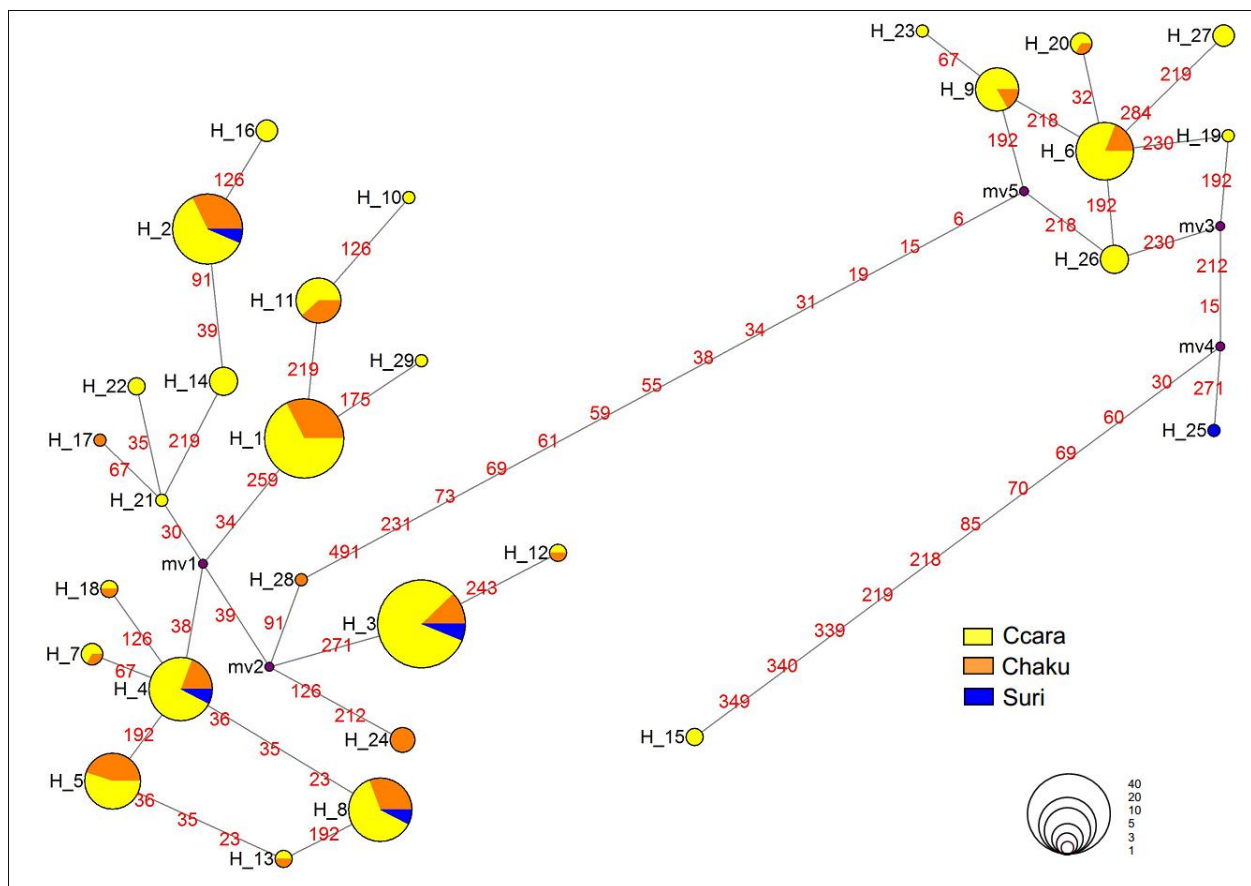


Figura 20. Median Joining Network de los 29 haplotipos pertenecientes a las Regiones de Puno y Cuzco, del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt. Los colores representan las variedades de llamas estudiadas. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia.

5.5. Análisis de Coordenadas Principales

Las poblaciones de Melgar y El Collao son las más similares en su composición genética; la población de Quimsachata se encuentra en un punto medio entre las poblaciones de Espinar, Canchis, Melgar y el Collao, aunque geográficamente pertenece a Lampa. Por el lado de Cuzco, las poblaciones de Quispicanchi y Canchis son más similares en cuanto a su composición genética y la población de Espinar es completamente diferente. Las poblaciones de Lampa y Chucuito son diferentes en su composición genética respecto a las poblaciones de Cuzco; sin embargo, también son bastante diferentes de Quimsachata, El Collao y Melgar, aunque se encuentre geográficamente colindante respecto a estas tres últimas (figura 21).

Si observamos las figuras 14 y 15 nuevamente, veremos que el análisis de coordenadas principales confirma la distribución encontrada en los cladogramas construidos a partir de las distancias genéticas usando los métodos de NJ y UPGMA.

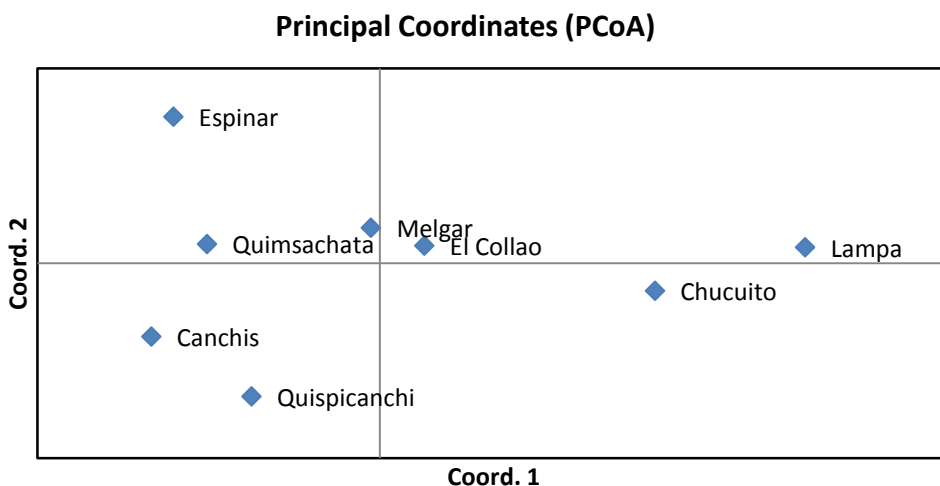


Figura 21. Análisis de Coordenadas Principales. Se evaluó usando los parámetros estadísticos de las varianzas (V_{AP} es la varianza entre las poblaciones y V_{WP} varianza dentro de las poblaciones), estas varianzas son relacionadas bajo la distancia Φ_{PT} (Φ_{PT}). Las secuencias corresponden al dominio hipervariable I de la región control del ADNmt de las ocho poblaciones pertenecientes a las Regiones de Puno y Cuzco.

5.6. Análisis de Varianza Molecular

En el análisis se observó que la variación se encuentra dentro de las poblaciones y, además, un valor de significancia importante para este índice (p -valor < 0.05) (tabla 7) se obtuvo asumiendo el agrupamiento: Quimsachata (población E.E. Quimsachata Puno), Puno Sur (Población El Collao y Chucuito), Puno Norte (Población Melgar y Lampa) y Cuzco (Población Quispicanchi, Canchis y Espinar).

Tabla 7. AMOVA fue estructurado con cuatro grupos conformados por las poblaciones en paréntesis: Quimsachata (población E.E. Quimsachata Puno), Puno Sur (Población El Collao y Chucuito), Puno Norte (Población Melgar y Lampa) y Cuzco (Población Quispicanchi, Canchis y Espinar), usando el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial de las poblaciones de las Regiones de Puno y Cuzco.

AMOVA				
Fuente de Variación	grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de Variación
Entre Grupos	3	3.520	-0.00852	0.18
Entre Poblaciones Dentro de los Grupos	5	5.332	0.03088	4.78
Dentro de las Poblaciones	273	118.677	0.43471	95.03
Total	281	127.528	0.45708	
Indicé de Fijación				
Φ_{SC} :	0.04793	(p – valor = 0.00128)		
Φ_{ST} :	0.04969	(p – valor = 0.00049)		
Φ_{CT} :	0.00185	(p – valor = 0.31275)		

El análisis revela que la estructuración genética entre los grupos es muy baja (0.18%), y el nivel de significancia de p es no significativo (p -value > 0.05). Asimismo, la variación tampoco se ubica entre las poblaciones dentro de los grupos estudiados donde se observa un porcentaje de variación de 4.78%, el valor de significancia de este estadístico es significativo. Por último,

se aprecia que el mayor porcentaje de variación (95.03%) se presenta entre individuos, y el valor de significancia del estadístico es significativo (p -valor < 0.05).

Por otro lado, se realizó un AMOVA adicional para ver si existía estructuración genética entre las variedades de las llamas estudiadas (tabla 8). El análisis muestra que la variación se encuentra dentro de las diversas variedades de llamas, con un valor de significancia (p -valor < 0.05). Se asumió el agrupamiento *a priori* por variedades: Ccara, Chaku y Suri.

Tabla 8. AMOVA fue estructurado con cinco grupos conformados por las variedades de llamas: Ccara (Puno), Chaku (Puno), Ccara (Cuzco), Chaku (Cuzco) y Suri (Cuzco).

AMOVA				
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de Variación
Entre Grupos	2	15.787	.000503	1.80
Entre Poblaciones Dentro de los Grupos	9	59.551	0.16258	2.90
Dentro de las Poblaciones	256	974.613	3.80708	95.29
Total	267	1049.951	3.97469	
Indicé de Fijación				
Φ_{SC} :	0.04096	(p – valor = 0.00851)		
Φ_{ST} :	0.042117	(p – valor = 0.01257)		
Φ_{CT} :	0.00126	(p – valor = 0.32594)		

El análisis revela que no hay estructuración genética entre las variedades (1.3%), y el nivel de significancia de p es no significativo (p valor > 0.05). Asimismo, la variación entre las poblaciones de cada variedad (4.09%) es muy baja y el valor de significancia (p -valor > 0.05).

Sin embargo, el 95.29% de la variación se encuentra entre los individuos de cada variedad y el valor de significancia de este estadístico es significativo (p -valor <0.05).

5.7. Test de Mantel

Mediante el test de Mantel se evidencia que las llamas aquí estudiadas no presentan una estructuración geográfica, es decir, la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas de los rebaños en las Regiones de Puno y Cuzco, la línea de tendencia presenta un R^2 no significativo ($R^2 < 0.5$) (figura 22).

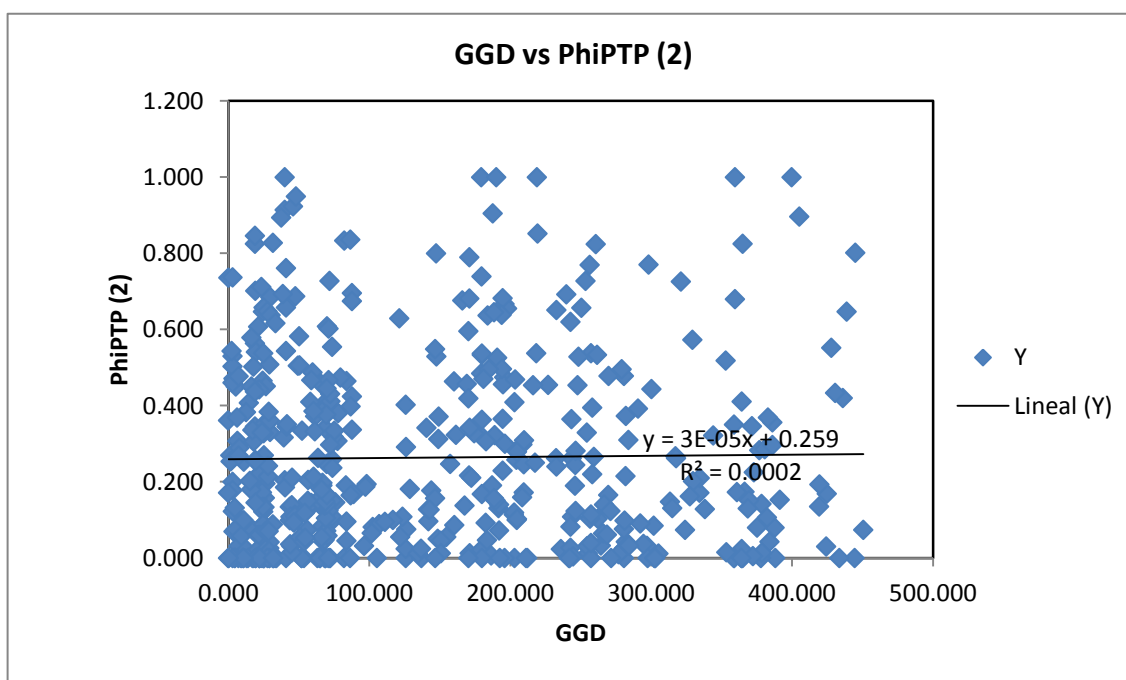


Figura 22. Test de Mantel. En el eje X se encuentran las distancias geográficas (GGD) y en el eje Y las varianzas moleculares (PhiPTP) entre rebaños de las Regiones de Puno y Cuzco. En la figura se observa la línea de tendencia y el ajuste del R^2 el cual es no significativo.

5.8. Análisis de los haplotipos de llama contra los de guanaco, vicuña y alpaca.

El total de 270 secuencias obtenidas del GenBank correspondiente a guanaco, vicuña, alpaca y llamas (anexo 2), junto con los 29 haplotipos de llama obtenidos en el presente estudio, colapsaron en 113 haplotipos. Varios de los haplotipos obtenidos en el presente estudio resultaron ser idénticos a algunos haplotipos de los otros tres camélidos sudamericanos, guanaco, vicuña y alpaca (figura 23 y figura 24).

Al comparar las secuencias se encontraron secuencias compartidas con los guanacos y otras llamas (Haplogrupo Guanaco): Son el H_2 es compartido con otra *L. glama* de variedad Chaku del norte de Chile; H_8 corresponde a *L. glama* de variedad Ccara del norte de Chile y dos *L. g. huanacus*; el H_1 es compartido con dos *L. glama* de variedad Chaku; el H_13 es compartido con trece *L. guanicoe*; el H_5 es compartido con cinco *L. guanicoe*; el H_28 se comparte con dos *L. g. huanacus*; el H_11 se comparte con un *L. g. huanacus*; el H_4 es compartido con *L. g. cacsilensis*. Además, existen haplotipos compartidos con vicuñas y alpacas: El H_6 es compartido con seis *L. pacos*, seis *V. v. vicugna* y veinte *V. v. mensalis*; el H_27 es compartido con un *L. pacos*; el H_26 lo comparten tres *L. pacos* y 3 *V. v. mensalis*; el H_15 es compartido con *V. v. vicugna*; y el H_19 es compartido con dos *V. v. mensalis*. Sin embargo tenemos linajes maternos únicos que no habían sido reportadas en la base de datos del *GenBank* con anterioridad; ellos son H_9, H_10, H_12, H_14, H_16, H_17, H_18, H_20, H_21, H_22, H_23, H_24, H_25 y H_29 hallados en nuestro análisis poblacional de las Regiones Puno y Cuzco.

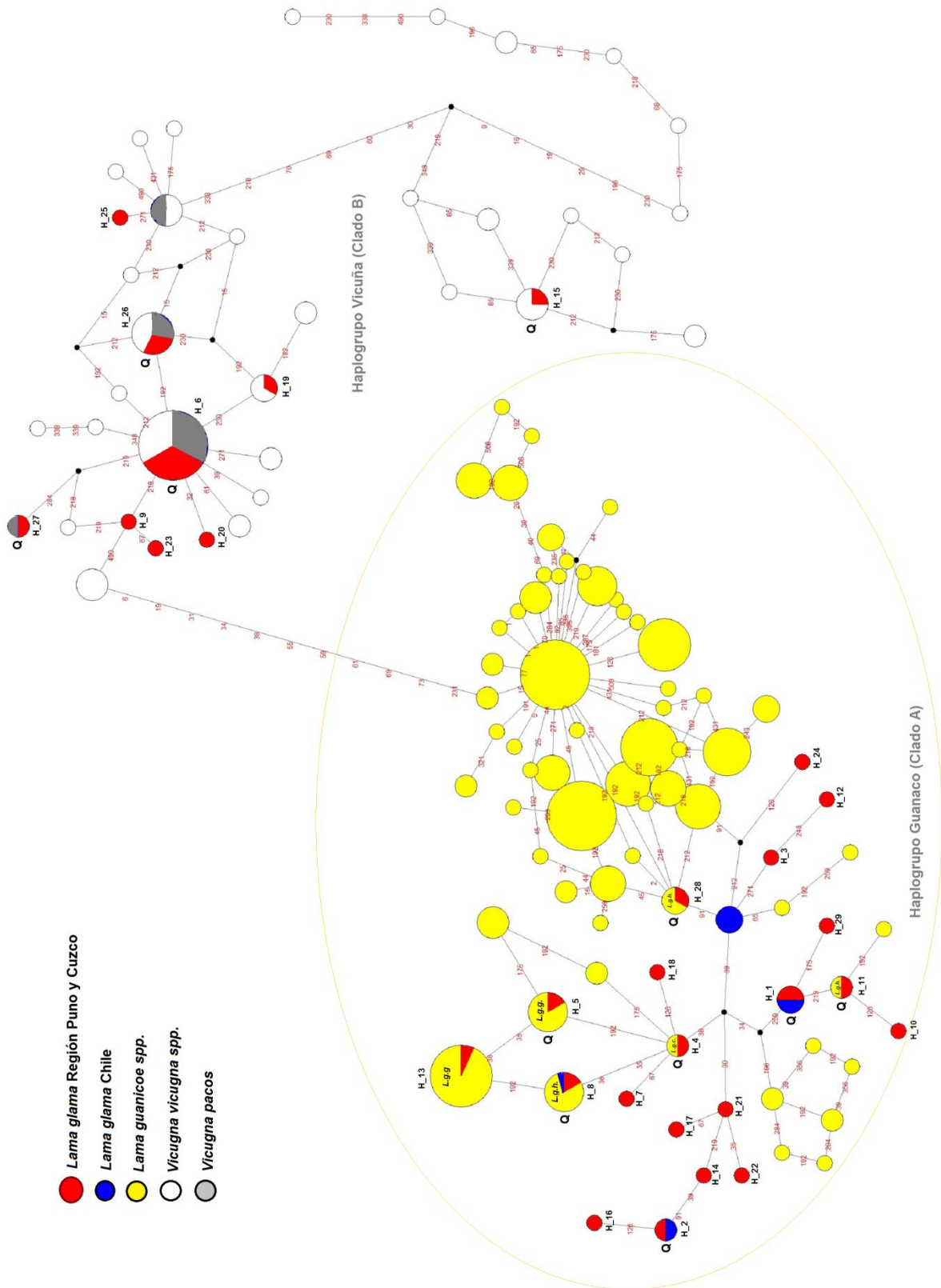


Figura 23. Red de haplotipos mitocondriales. Se comparan los 29 haplotipos (H_) encontrados en las Regiones Puno y Cuzco, con los haplotipos de Guanacos, Vicuñas y Alpacas reportados hasta el momento en el GenBank. Q = Estación Experimental Quimsachata. H_3 es el más frecuente en las Regiones Puno y Cuzco. L. g. huanacus (L.g.h.), L. g. cacsilensis (L.g.c.) y L. g. guanicoe (L.g.g.).

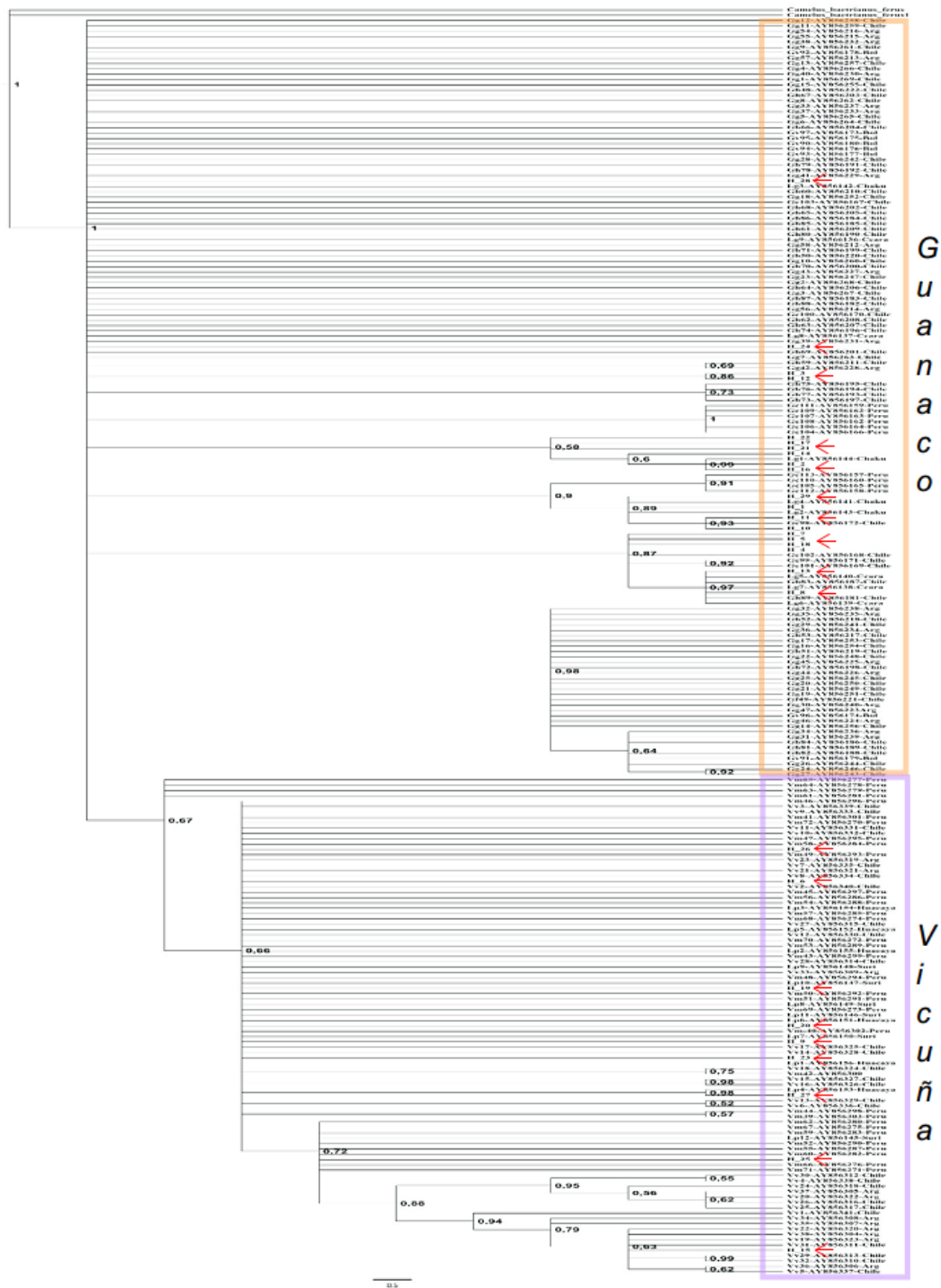


Figura 24. Filogenia construida usando Inferencia Bayesiana, en los nodos se indica la probabilidad posterior. Se usó la región control del ADN mitocondrial de los 29 haplotipos encontrados en las Regiones Puno y Cuzco (señalados con la flecha), y los haplotipos unicos de guanacos, vicuñas, alpacas y llamas reportados hasta el momento en el *GenBank* a fin de esclarecer las relaciones evolutivas de las llamas. Gc (*L. g. cacsilensis*), Gh (*L. g. huanacus*), Gg (*L. g. guanicoe*), Gv (*L. g. voglii*), Vm (*V. v. mensalis*), Vv (*V. v. vicugna*), Lp (*L. pacos*) y las H y Lg (*L. glama*). Los números que acompañan a los acrónimos corresponden al código del *GenBank*. El rectángulo naranja encierra al haplogrupo guanaco y el rectángulo violeta corresponde al haplogrupo vicuña.

6. DISCUSIÓN

6.1. Del Análisis Molecular

Para evaluar las diferencias genéticas a nivel poblacional de *L. glama*, en las Regiones Puno y Cuzco, originados hace cinco mil años por procesos complejos de domesticación, se evaluó el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial, el cual, ha sido utilizado exitosamente en estudios genético poblacionales de camélidos.

La composición nucleotídica en las 282 secuencias fue de 27.7% (T), 26.6% (C), 27.9 % (A) y 17.8% (G), y concuerda con el patrón general del ADN mitocondrial región control de mamíferos, donde $(A+T) > (C+G)$ (Sbisà *et al.* 1997); Además, valores obtenidos en guanacos de 27.6% (T), 26.5% (C), 28.0% (A) y 17.9% (G) (Marín *et al.* 2008), son muy similares.

La proporción (ratio) promedio de ts/tv encontrado fue $R = 15.52$, mucho más alto al reportado en estudios previos en guanacos $R = 2.5 - 7$ (Di Rocco *et al.* 2010). Esto tal vez sea consecuencia del método de sustitución nucleotídica utilizado, ya que las tasas de sustituciones nucleotídicas de transición y transversión son muy altas en esta región, y varía extensamente entre los diferentes sitios del dominio hipervariable I, y las observaciones sugieren que el segmento 5' presenta un ratio de transición / transversión más elevada que el segmento 3' (Tamura y Nei 1993); sin embargo, en las secuencias analizadas no existe diferencia estadística significativa.

Di Rocco (*et al.* 2010) reportaron la existencia de *numts*, copias nucleares de origen mitocondrial, en guanacos, cuyo patrón de composición nucleotídica es $(C+G) > (A+T)$ y tasas de sustitución ts/tv muy bajas. Este hecho es de especial interés ante un estudio que analiza diversidad genética y haplotipos mitocondriales, por influenciar directamente en sobreestimados de la diversidad. Sin embargo, con las características antes mencionadas, queda descartada en las 282 secuencias analizadas, la presencia de *numts*.

Las 282 secuencias alineadas tienen una longitud de 515 nucleótidos, este número no concordaba con las secuencias de 514 nucleótidos reportados en el NCBI en los camélidos sudamericanos. Esto se debió a dos hechos: primero por una inserción de T en la posición 23 en el 9.9% de las secuencias (presente en los H_1 y H_2); esta inserción fue descrita en llamas (hasta el 30% de las llamas analizadas) y guanacos (Marín 2004; Marín *et al.* 2007a y Barreta *et al.* 2012). Segundo, debido a una delección en la posición 329, y se debe a que el alineamiento se realizó con la secuencia completa del ADN mitocondrial de llama, accesión AP003426.1 del NCBI; sin embargo, esta delección no ha sido registrada en ninguna otra secuencia de camélido sudamericano analizado hasta la fecha.

En las 282 secuencias analizadas se encontró 38 mutaciones, 37 sitios polimórficos (con 35 son sitios informativos de parsimonia) y 1 *singleton*. En secuencias de llamas Bolivianas (109 individuos) se encontraron 30 sitios polimórficos y 3 *singletons* (Barreta *et al.* 2012). En secuencias de guanacos (176 individuos) fueron encontrados 38 sitios polimórficos, de los cuales solo 8 son sitios informativos de parsimonia, y en vicuñas (261 individuos) un total de 28 sitios polimórficos (Marín *et al.* 2007b; Marín *et al.* 2008).

Por lo tanto, las secuencias obtenidas de llamas de las Regiones Puno y Cuzco, con respecto a las poblaciones de llamas Bolivianas, tienen mayor variación nucleotídica. Por otro lado, el polimorfismo en la posición 23 fue propuesto como evidencia clara de más de un centro de domesticación en llamas, y es reportado para el norte de Chile (Marín *et al.* 2007a, Marín *et al.* 2013), en tal sentido las Regiones Puno y Cuzco podrían haber sido otro potencial escenario de tan importante hecho de domesticación, generado aún por las tribus colectoras y cazadoras distribuidas por el área.

Además, el grupo Puno Sur tiene 35 sitios polimórficos, Puno Norte 28 sitios polimórficos, Cuzco 26 sitios polimórficos y finalmente Quimsachata 24 sitios polimórficos. Esto nos hace

evidente la gran variación nucleotídica contenida dentro de cada grupo, sin embargo Puno Sur alberga mayor variación.

6.2. Del número de Haplotipos Mitocondriales

En Perú se han descrito 20 haplotipos para alpacas en poblaciones de Puno, Arequipa y Cuzco (Melo *et al.* 2012), sin embargo, estos datos no han sido publicados a detalle. En el primer estudio genético poblacional de llamas se encontraron 33 haplotipos para poblaciones Bolivianas (Barreta *et al.* 2012), pero no se detalla el hallazgo de haplotipos nuevos. En estudios relacionados donde se evaluó el mismo segmento mitocondrial se han reportado: 77 haplotipos para revelar las relaciones filogenéticas entre las especies de camélidos, dentro de ellos 6 haplotipos pertenecieron a llamas (Marín *et al.* 2007b); se describieron 38 haplotipos en guanacos para estudios filogeográficos, que abarcaron toda la distribución de la especie (Marín *et al.* 2008 y Marín *et al.* 2013); en vicuñas se reportan tres haplotipos en poblaciones bolivianas y 34 haplotipos en poblaciones de Chile, Argentina y Perú (Barreta *et al.* 2012 y Marín *et al.* 2007a); y finalmente, se reportaron 2 haplotipos ancestrales pertenecientes a vicuñas del Pleistoceno encontrados al sureste de Chile (Weinstock *et al.* 2009).

En las 282 secuencias analizadas del dominio hipervariable I de la región control del ADNmt para *L. glama*, se encontraron 29 haplotipos. Por lo tanto los 29 haplotipos encontrados dan señales de la alta diversidad, y la importancia de plantear planes de manejo y conservación en las Regiones de Puno y Cuzco.

Además, respecto a la gran cantidad de haplotipos encontrados en Puno (# Hap = 19), creemos que Quimsachata (# H = 8) debe jugar un rol más protagónico si es que se intenta conservar la mayor variación genética dentro de la E.E. Quimsachata. Y además, sería de gran utilidad movilizar animales representativos de otras regiones como es el caso de Cuzco.

6.3. De los Patrones Demográficos

En las 282 secuencias del dominio hipervariable I del ADN mitocondrial (población total), comparamos sus índices de diversidad entre los estudios reportados hasta la fecha en las cuatro especies de camélidos sudamericanos (tabla 9). Primero: es evidente que la población analizada es representativa para la Zona Sur del Perú debido al gran número de individuos analizados, además Puno tiene la mayor cantidad de llamas. Segundo: la cantidad de haplotipos encontrados es alta. Tercero: los índices de diversidad nos indican que es una población estable. Cuarto: si comparamos la población Perú (Puno y Cuzco) con la población Bolivia, en ambos casos se estudiaron *L. glama*, observamos en la población Boliviana menor número de animales muestreados, y tiene más haplotipos encontrados, mayor diversidad haplotípica y nucleotídica respecto a la población Peruana donde se ha analizado más del doble de animales. Esto probablemente se debe a que la presión ejercida en los rebaños de llamas, ocurrida en Perú durante la colonización española y los siguientes años, ha causado una pérdida significativa en el número de poblaciones y consecuentemente en la diversidad genética de la especie (Kadwell *et al.* 2001; Mengoni y Guillermo 2008). Además, Bolivia tiene el mayor número de llamas en Sudamérica y están sometidas a fuertes procesos de selección artificial; y en el Perú las poblaciones de llamas han sufrido y sufren continuos procesos de extinción, por el reemplazo de poblaciones de alpacas, las cuales son productivamente más rentables por la producción de fibra.

Si comparamos las 282 secuencias de llamas con las poblaciones de guanacos, su ancestro más probable, encontramos que los guanacos presentan mayor número de haplotipos, pero sus índices de diversidad nucleotídica son mucho menores al de las llamas; este patrón es muy común entre especies domésticas y sus ancestros silvestres, cuando se analizan especies sometidas bajo selección artificial (Bruford *et al.* 2003; Van Asch *et al.* 2011). Además, sabemos que el 40% de llamas y el 80% de alpacas son híbridos resultados del cruce de las

cuatro especies de camélidos sudamericanos (Wheeler 2012), muy probablemente debido al mismo proceso de domesticación o a los procesos de erosión genética que viene atravesando la especie producto de la hibridización y mal manejo (ver tabla 2). Por lo tanto, los análisis sugieren que estamos frente a un importante acervo genético para Sudamérica y para el Perú.

Los datos demográficos sugieren que la población analizada, permaneció estable en el tiempo por largos periodos, muy posiblemente debido al tipo de manejo no direccionado que emplean los campesinos y pequeños productores, ya que no existe un fenotipo claro para la selección, en algunos casos buscan seleccionar animales con gran resistencia y fortaleza.

Tabla 9. Se han recopilado los datos de número poblacional (N), número de haplotipos (# Hap), diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π), sitios polimórficos (s) de estudios poblacionales que han usado el dominio hipervariable I de la región control del ADN mitocondrial para las diferentes especies de camélidos sudamericanos. * Distribución Perú, Bolivia y norte de Chile. ** Distribución Chile Sur, Argentina. – Falta de datos.

Población	N	# Hap	h	π	s	Autor	Especie
Perú (Puno y Cuzco)	282	29	0.908	0.0147	37	Presente estudio	<i>Lama glama</i>
Bolivia	109	33	0.938	0.0117	30	Barreta <i>et al.</i> 2012	<i>Lama glama</i>
Perú y Chile	30	6	-	-	-	Marín <i>et al.</i> 2007a	<i>Lama glama</i>
Perú, Chile, Argentina, Bolivia	176	38	0.89	0.0063	38	Marín <i>et al.</i> 2008	<i>L. guanicoe spp.</i>
Noroeste* sureste**	306	17 20	0.87 0.33	0.0079 0.0008	39	Marín <i>et al.</i> 2013	<i>L. guanicoe spp.</i>
Puno, Arequipa, Cuzco	44	20	0.944	0.0296	-	Melo <i>et al.</i> 2012	<i>Vicugna pacos</i>
Chile, Argentina Perú	261	34	0.7663	0.0199	28	Marín <i>et al.</i> 2007b	<i>V. vicugna spp.</i>
Bolivia	35	3	0.211	0.0025	19	Barreta <i>et al.</i> 2012	<i>Vicugna v. mensalis</i>

Este hecho se hace mucho más claro en el *mismatch distribution*, donde observamos una distribución bimodal de las diferencias de a pares con respecto a su frecuencia, los picos entre

15 – 20 pares de secuencia, representan a las mutaciones más ancestrales y un grupo de secuencias muy reciente con diferencias muy pequeñas pero presentes en mayor frecuencia; en general aquellas poblaciones con una distribución gaussiana de las diferencias por parejas del mtDNA han experimentado un período de crecimiento demográfico rápido a partir de una o unas pocas variantes. Por el contrario, una distribución asimétrica de las diferencias por parejas es indicadora de una población con una historia demográfica estable (Rogers y Harpending 1992). Por otro lado, los valores obtenidos de la F_s de F_u son negativos y sin significancia estadística, pero igual estos valores negativos en la mayoría de los casos implican expansión poblacional (Fu 1997).

La mayor diversidad nucleotídica, la mayor cantidad de sitios polimórficos, y la mayor cantidad de diferencias a pares indican una población más estable (Frankham *et al.* 2002). Entonces, en los grupos tenemos: Puno Sur tiene la mayor cantidad de haplotipos ($\# H = 22$), pero su diversidad haplotípica y nucleotídica no es la mayor. Por el contrario, Puno Norte presenta los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica más altos, pero el número de haplotipos presentes en la población no es el mayor ($\# H = 17$). Esta diferencia notable probablemente se debe al tamaño poblacional muestreado para cada población $N= 139$ y $N= 61$ (Puno Sur y Puno Norte respectivamente). Adicionalmente, Puno Sur es una zona andina donde la calidad de los pastos va de regular a mala (Bravo y Huanca 2012), y las comunidades de pastores de llamas presentes en esta zona son de muy bajos recursos, no practican en ningún caso mejoramiento o selección alguna y adquieren sus animales del Norte de Puno. En Puno Norte encontramos mejor calidad de pastos, y la presencia de bofedales; además, en estas zonas se practica selección de reproductores, pero en gran mayoría se crían alpacas, no llamas. Cuzco presenta la diversidad nucleotídica más baja (0.00876), pero su diversidad haplotípica es considerable (0.89147). Sin embargo, la población de la E.E. Quimsachata es la que presenta la diversidad haplotípica más baja (0.83536) de los cuatro grupos asignados y su diversidad

nucleotídica es bastante baja (0.01085), aun encontrándose entre dos zonas donde la diversidad haplotípica y nucleotídica son bastante altas.

Las distancias genéticas obtenidas entre las poblaciones son pequeñas, y esta medida es la diferenciación genética entre las poblaciones (Nei 1987). Sin embargo, observamos a las regiones de Cuzco y Puno bien diferenciadas una de la otra; las poblaciones de Cuzco presentan poca diferenciación genética entre ellas, y presentan poca diferencia genética con la población de la E.E. Quimsachata, la cual está ubicada en Puno y geográficamente se ubica en Lampa. Por otro lado, las poblaciones de Puno no presentan diferenciación genética concordante con su cercanía geográfica. Melgar y El Collao tienen menor diferenciación genética; sin embargo, Lampa tiene mayor diferenciación genética a Melgar, aunque geográficamente sea colindante. Esto muy probablemente sea por la mayor cantidad de alpacas que tienen los campesinos de Lampa, además predomina la crianza de vacunos y los pocos rebaños de llamas son de número reducido; asimismo, la adquisición de animales por los campesinos debe ser aleatoria en la gran mayoría de los casos, ya que en las llamas no se tiene muy claro el fenotipo ideal para su crianza. Esto estaría ocasionando que los campesinos adquieran animales de diferentes productores y diferentes localidades.

Por otro lado, Chucuito presenta poca diferenciación genética respecto al Collao, su diferenciación genética es mucho mayor con Melgar y extrañamente presenta el menor valor al compararse con Lampa (figura 14 y 15). Se podría explicar de la siguiente manera, ya que en Chucuito existe pobreza elevada, los rebaños de llamas son de números pequeños (entre 10 y 20 animales), existe poco intercambio de animales y sus rebaños en la gran mayoría de casos son de animales viejos, criados en su mayoría por ser herencia familiar del poblador Puneño. Esta misma tendencia se observa en los grupos que asumimos *a priori* (figura 16 y 17), pero con la diferencia del NJ, donde Puno Norte es más distante genéticamente al resto de los

grupos, y usando el método de UPGMA, Puno Sur es el que tiene mayor distancia genética. Esto se puede deber a la ambigüedad que dan sus distancias genéticas muy similares.

Las distancias genéticas esquematizan poblaciones con poca diferencia genética; sin embargo, se evidencia el gran intercambio de animales que ocurrió, en algún momento de la historia, y los efectos posteriores de diferenciación poblacional que están surgiendo de manera paulatina en cada rebaño, producto del aislamiento y ausencia de un verdadero plan de manejo para esta especie.

Por último, en el árbol filogenético construido usando *Neighbor Joining* con el modelo de JC69, para los 29 haplotipos junto con las secuencias de guanaco y vicuña, evidenciamos dos clados bien diferenciados y están soportados por un *bootstrap* de 99 porciento. Estos dos clados están asociados a los guancos (clado A) y las vicuñas (clado B). Sin embargo, las distancias entre los haplotipos entre los clados es pequeña lo que resulta en *bootstrap* débil.

6.4. De las Redes Haplotípicas

En la presente discusión asumimos *a priori*, para discutir las evidencias de las relaciones y distribución de los haplotipos por tratarse de especies domésticas: primero, no existen barreras geográficas que limiten la distribución de los haplotipos; segundo, todos los haplotipos tienen la misma probabilidad de permanecer en la población a través del tiempo, ya que no existe un tipo de llama ideal a nivel productivo; tercero, las hembras son movilizadas con baja frecuencia. Y, adicionalmente, los *cluster* hallados en la red haplotípica están formados por los mismos haplotipos que forman los clados identificados por el árbol filogenético hallado por el método de *Neighbor Joining*, por lo tanto se explicará usando el término clado A y clado B (figura 18 y 19).

En el clado A encontramos los haplotipos H_2, H_3, H_1, H_11, H_4, H_5 y H_8, los cuales están ampliamente distribuidos y son los más frecuentes en los cuatro grupos propuestos (Quimsachata, Puno sur, Puno norte y Cuzco). Resulta interesante que todos ellos están

presentes en la E.E. Quimsachata, banco de germoplasma que ha sido creado hace 25 años y no se ha renovado el núcleo fundador de esta población desde su creación (Huanca *et al.* 2007). Por lo tanto, estos haplotipos más frecuentes son muy comunes y han permanecido bien conservados a lo largo del tiempo en las poblaciones de llamas de las Regiones Puno y Cuzco.

Los H_7, H_14 y H_16 son únicos de la Región Puno; el H_7 se originó muy probablemente del H_4 por una mutación en la posición 7, muy probablemente su origen sea reciente; el H_16 se ha originado del H_2, cuyo origen también es reciente. Por otro lado, el H_14, originó al H_2 presumiblemente un haplotipo más antiguo y éste a su vez originó al H_16, en consecuencia el H_14, H_2 y H_16 pertenecen a un mismo linaje materno; sin embargo, las frecuencias de los tres haplotipos descritos es baja y están presentes tanto en Puno Norte como en Puno Sur, a excepción del H_7 presente en Puno Norte. Los H_10, H_13, H_17, H_18, H_21 y H_22 son únicos de Puno Sur, y son originados de diferentes linajes, a excepción de los H_22 y H_17 que se han originado del H_21 y representan a otro linaje, el cual también origina al H_14. Este linaje materno tuvo origen muy probablemente al Sur de Puno, en las poblaciones del Collao en la frontera con la región de Tacna. El H_28 y H_29 son únicos de Puno Norte, pero el H_28 es mediante el cual se unen ambos clados, es el haplotipo del cual se deriva el resto de haplotipos que encontramos en el clado A; el H_24 es único de Cuzco originado del H_28.

Un caso especial del Clado A es la existencia del H_12 distribuido en Cuzco y Puno Sur y de muy baja frecuencia, además es derivado del H_3 ampliamente distribuido y muy frecuente. Por lo tanto, existen tres posibilidades para esta distribución: la primera es que pudo originarse independientemente en cada zona por evolución paralela; la segunda podría tratarse de un haplotipo de amplia distribución que ha sido eliminado casi completamente por los campesinos y productores de Puno Norte; y finalmente podría ser el resultado del movimiento propio que sufren las especies domésticas. Esta última explicación sería la hipótesis más aceptada dentro

de esta especie doméstica, ya que el comercio de animales en la gran mayoría de los casos ocurre de Norte a Sur.

En el clado B, en su gran mayoría se encuentran haplotipos de baja frecuencia y distribución restringida como ya se ha mencionado con anterioridad. Las relaciones de parentesco entre los haplotipos son concordantes, ya que el H_6 como antes mencionamos, es el más ancestral por ser el de mayor frecuencia y estar ampliamente distribuido, además también forma parte de la E.E. Quimsachata. El H_25 se encuentra estrechamente relacionado a este clado, pero con presencia en Cuzco; es evidente que las relaciones son producto de la formación de dos *median vectors*, probables haplotipos extintos o no encontrados en nuestra muestra, de tal manera que su formación es muy difícil de interpretar. Y aún más difícil de interpretar es el origen del H_15 distribuido en Puno Sur, para ser más exactos en la población del Collao.

Adicionalmente, se pretendió evaluar la distribución de los haplotipos por variedades de llamas (figura 20). Y se encontró que en su mayoría los haplotipos más frecuentes y ampliamente distribuidos están presentes en las tres variedades de llamas sin importar el clado al que pertenecen.

Es evidente, que ningún clado presenta topología en estrella indicadora de posibles cuellos de botella y expansión súbita reciente, por lo que probablemente la población ha permanecido largos periodos con un tamaño poblacional relativamente grande, sin que la diversidad genética se vea afectada por procesos estocásticos, y además el flujo genético artificial producto del intercambio de animales por comercio e intercambio de reproductores es la principal causante de esta estructura. Todo lo encontrado es concordante con los datos demográficos, que nos indican poblaciones estables, principalmente las pertenecientes a la región Puno. Sin embargo, en el Banco de Germoplasma Quimsachata encontramos que se han logrado conservar los

haplotipos más importantes, ya que se encuentran ampliamente distribuidos y de frecuencias elevadas en las poblaciones.

6.5. Del Análisis de Estructura Poblacional

El análisis de varianza molecular nos dice que la variación genética de los grupos propuestos se encuentra en un 95.03% dentro de cada población, con un δ_{ST} : 0.04969 muy bajo, con el valor p significativo; en otras palabras, no existe estructuración geográfica en las poblaciones analizadas, y la diversidad se encuentra homogéneamente distribuida entre las poblaciones.

Para tener un mejor panorama sobre las distancias genéticas analizadas, se realizó el análisis de coordenadas principales, usando las distancias de las varianzas moleculares entre poblaciones. Encontramos que se repite lo antes descrito según los datos demográficos. Melgar y El Collao son genéticamente más similares, aunque geográficamente no tengan contacto y ecológicamente sean muy diferentes; Chucuito y Lampa son dos poblaciones independientes no muy relacionadas por sus distancias genéticas ni geográficas; las poblaciones de Cuzco son muy diferentes a las de Puno. Y finalmente Quimsachata está formando un acervo genético ubicado en el centro de las poblaciones de Puno y Cuzco (figura 14, 15 y 21). Para reforzar lo antes mencionado, nos sirve el test de Mantel (figura 22), donde se encontró que la composición genética de cada población no guarda relación con su proximidad geográfica.

Finalmente, el AMOVA agrupado por variedades de llamas (tabla 8), nos dice que no existe estructuración por variedades de llamas y la variación genética se encuentra en un 95.29% dentro de las poblaciones, con un Φ_{ST} : 0.04706 muy bajo, y el valor de p significativo. En otras palabras, que las variedades de llamas son producto de cruces aleatorios y no existe estructuración genética. Deducimos que las poblaciones de Puno y Cuzco presentan composición genética parecida.

6.6. Del análisis de los haplotipos de llama contra los de guanaco, vicuña y alpaca.

La construcción de la red haplotípica y del árbol filogenético usando secuencias de las cuatro especies existentes de camélidos reportadas hasta la fecha en el Centro Internacional de Biotecnología e Informática (NCBI) y los 29 haplotipos encontrados en el presente estudio, reveló la presencia de linajes maternos correspondientes al Haplogrupo Guanaco y al Haplogrupo Vicuña (Stanley *et al.* 1994) en las llamas de Puno y Cuzco.

Dentro del haplogrupo guanaco, encontramos distribuidos veinte haplotipos de llamas de las Regiones Puno y Cuzco, estos haplotipos no conservan el mismo patrón de topología en estrella observado en el haplogrupo guanaco, ya descrito por Marin *et al.* (2013). La topología en estrella es la firma de un modelo demográfico histórico: cuello de botella genético seguido por crecimiento y expansión súbita (Bandelt *et al.* 1995; Bandelt *et al.* 1999; Marin *et al.* 2008). Entonces la población ancestral de guanacos ha pasado cambios climáticos drásticos que disminuyeron su número efectivo de población y consecuentemente su diversidad genética (Gonzalez *et al.* 2006 y Marín *et al.* 2013). El mismo patrón de topología en estrella es observado en los haplotipos vicuñas (Wheeler *et al.* 2006 y Barreta *et al.* 2012) (figura 23).

En relación a las subespecies de guanaco descritas por sus características morfológicas externas (Gonzalez *et al.* 2006), *L. g. cacsilensis* es la subespecie predominante en las Punas Peruanas. La subespecie *L. g. guanicoe* se distribuye al sur de Chile y Argentina. Las otras dos subespecies, *L. g. huanacus* se encuentra principalmente en Chile y ha sido reportada también para Puno, y *L. g. volgliei*, se encuentran en el norte de Argentina y sur de Bolivia. Sin embargo, molecularmente todas ellas excepto *L. g. cacsilensis* son una unidad genética (Marín *et al.* 2013). Entonces, como consecuencia, nuestros resultados estarían mostrando parte la historia ancestral de los guanacos ya que en su acervo se encuentran haplotipos de tres de las subespecies, faltando la entidad que encuentra al norte de Argentina, *L. g. volgliei*. Un caso

similar fue observado para las llamas bolivianas las que fueron encontradas emparentadas con *L. g. cacsilensis*, *L. g. huanacus* y *L.g. volglia* (Barreta *et al.* 2012).

Con este análisis de haplotipos combinados podemos entender mejor lo arrojado por el *mismatch distribution* de los haplotipos de llama obtenidos en el presente estudio que daba a entender que provendría de una población ancestral de tamaño estable. Más bien, sería el resultado del origen mixto de la llama, donde encontramos haplotipos que provienen de diversas subespecies del guanaco y vicuña (figura 23 y 24), diferenciadas con apenas una o dos mutaciones en los guancos, así como los que proceden de vicuña, pero entre estos grupos guanaco y vicuña hay distancias mayores (11 mutaciones).

Por lo tanto, este hecho nos permite evidenciar de que el proceso de domesticación de las llamas no fue un evento local ni único que ha ocurrido en algún lugar privilegiado de Sudamérica, es más un evento muy dinámico, el cual suponemos que aún está en marcha. En tal sentido, existen importantes acervos genéticos que dieron origen a la aparición de las llamas en las regiones de Puno y Cuzco. Ello debe ser tomado en cuenta para la incorporación de nuevos planes de manejo en esta importante especie de la Puna Peruana.

Entre las localidades trabajadas se encuentra el área de conservación *in situ* Quimsachata, creada hace 25 años, que viene conservando la misma proporción de haplotipos que encontramos en las poblaciones naturales de llamas, es decir principalmente los haplotipos del tipo guanaco y en menor cantidad los del tipo vicuña. Sin embargo, no es claro el origen del H_3 (tabla 5 y figura 23), que es el haplotipo más frecuente y ampliamente distribuido en las llamas (este estudio); pudo haber surgido producto de la selección artificial en algún momento del proceso de domesticación, por presentar caracteres adaptativos muy importantes para la crianza de las llamas o ser la herencia de un linaje ya extinto.

No hay que olvidar a los H_9, H_10, H_12, H_14, H_16, H_17, H_18, H_20, H_21, H_22, H_23, H_24, H_25 y H_29 que son menos frecuentes y de distribución restringida, son linajes haplotípicos nuevos en su mayoría son derivados de los haplotipos guanaco para las llamas.

7. CONCLUSIONES

- La diversidad genética y haplotípica de las poblaciones de llamas de las regiones de Puno y Cuzco es alta.
- Los linajes maternos que encontramos en las regiones Puno y Cuzco son linajes maternos provenientes de guanacos y vicuñas que son la evidencia del proceso de domesticación que dio origen a las llamas. Además encontramos catorce nuevos linajes maternos para las llamas en estas regiones, los cuales se encuentran presentes en menor frecuencia en las poblaciones.
- Los linajes maternos que están siendo conservados de manera *in situ* en la Estación Experimental de Quimsachata son linajes provenientes de guanacos y vicuñas que se encuentran ampliamente distribuidos y son muy frecuentes en las poblaciones de llamas de las regiones de Puno y Cuzco.
- La conservación y los planes de manejo en las regiones de Puno y Cuzco debe ser orientada de forma exclusiva para esta zona que alberga alta diversidad genética y haplotípica con linajes maternos de importancia biológica ya que en ellos se evidencian los procesos históricos que han dado forma a estas poblaciones.
- Además, se evidencia una fuerte hibridación entre las tres variedades de llamas estudiadas en todas las poblaciones de las regiones de Puno y Cuzco.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios del cromosoma Y, a fin de ampliar y entender mejor la información obtenida del ADN mitocondrial.

Son necesarios los muestreos en otros departamentos del Perú, y aplicar herramientas moleculares similares para poder conocer el acervo genético y valorar mejor la producción de llamas en Perú.

Es recomendable usar otros marcadores moleculares como es el caso de microsatélites, ya que a partir del ADN mitocondrial solo conocemos una parte de la historia, los linajes maternos.

En Quimsachata se viene conservando haplotipos que representan la mayor diversidad de las llamas de la Región Puno y Cuzco. No obstante, se recomienda introducir a la estación los nuevos linajes encontrados en el presente estudio.

Es necesario implementar registros genealógicos orientados a la selección de animales de gran rendimiento, de tal manera que pueda ser complementario usar marcadores moleculares involucrados con la producción de fibra, de carne, de leche para poder realizar verdadera selección artificial orientada a la producción.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames, B N, M K Shigenaga, y T M Hagen. 1993. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging». Proceedings of the National Academy of Sciences: 7915-7922.
- Bandelt , H. J. , P. Forster , and A. Rohi. 1999 . Median joining net-work for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution: 37 – 48.
- Bandelt, H. J., P. Forster, B. C. Sykes, and M. B. Richards. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. Genetics:743–753.
- Barreta, J., B. Gutiérrez-Gil, V. Iñiguez, V. Saavedra, R. Chiri, E. Latorre, y J. J. Arranz. 2012. Analysis of Mitochondrial DNA in Bolivian Llama, Alpaca and Vicuna Populations: a Contribution to the Phylogeny of the South American Camelids. Animal Genetics: 1–11.
- Barreta, Julia, Volga Iñiguez, Vladimir Saavedra, Fernando Romero, Ana María Callisaya, JoelyEchalar, Beatriz Gutiérrez-Gil, y Juan-José Arranz. 2012. Genetic diversity and population structure of Bolivian alpacas. Small Ruminant Research: 97–104.
- Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends in Ecology and Evolution, 16, 314–321.
- Boore, J L. 1999. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Research: 1767-1780.
- Bravo, P. Walter y Huanca Wilfredo. 2012. Aspectos técnicos, culturales, y científicos de la crianza de llamas y alpacas en Sudamérica. In: Resúmenes y Trabajos VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. 107-110.
- Bruford, Michael W., Daniel G. Bradley, y Gordon Luikart. 2003. DNA Markers Reveal the Complexity of Livestock Domestication. Nature Reviews Genetics: 900-910.

- Bustamante, A.V, A Zambelli, D.A De Lamo, J von Thungen, y L Vidal-Rioja. 2002. Genetic variability of guanaco and llama populations in Argentina. *Small Ruminant Research*: 97–101.
- Bustamante, Ana V, María L Maté, Hugo E Lamas, Guillermo Giovambattista, Andrés Zambelli, y Lidia Vidal-Rioja. 2006. Análisis de diversidad genética en tres poblaciones de llamas (*Lama glama*) del noroeste argentino. *Revista chilena de historia natural*: 175–184.
- Cann, Rebecca L., Mark Stoneking, y Allan C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature*: 31-36.
- Calderón, W.; S. Fernández-Baca. 1972. Peso vivo y rendimiento de carnaza de alpaca. *Rev. Inv. Pec. IVITA* 1(1): 5-9.
- Coates, Wayne, y Ricardo Ayerza. 2004. Comparison of llama fiber obtained from two production regions of Argentina. *Journal of Arid Environments*: 513-524.
- Cristofanelli, S., Antonini, M., Torres, D., Polidori, P., Renieri, C. 2004. Meat and carcass quality from peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat Sci.* 589–593.
- Cristofanelli, S., M. Antonini, D. Torres, P. Polidori, y C. Renieri. 2005. Carcass characteristics of peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) reared in the Andean highlands. *Small Ruminant Research*: 219-222.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 772.
- Di Rocco, Florencia, Andrés Zambelli, Laura Maté, y Lidia Vidal-Rioja. 2010. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Guanaco (*Lama Guanicoe*): Comparative Analysis with the Vicuña (*Vicugna Vicugna*) Genome. *Genetica*: 813-818.

- Excoffier, Laurent, Guillaume Laval, y Stefan Schneider. 2007. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*: 47–50.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, y J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*: 479–491.
- Farris, J. S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.*19:83–92.
- Fernández-Baca. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TRP/RLA/2914. Perú: FAO.
- Frank, E.N., M.V.H. Hick, C.D. Gauna, H.E. Lamas, C. Renieri, y M. Antonini. 2006. Phenotypic and genetic description of fibre traits in South American domestic camelids (llamas and alpacas). *Small Ruminant Research*: 113-129.
- Frank E.N., Wehbe V.E. 1994. Primer informe de avance del componente camélidos domésticos. Acuerdo República Argentina-Unión Europea para el Programa de Apoyo para la Mejora en la Producción de Pelos Finos de Camélidos Argentinos.
- Frankham Richard, David Anthony Briscoe, and Jonathan D. Ballou. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Franklin William L, Natasha K. Drufke, and Kelly J. Powell. 2012. guard llamas: their use and effectiveness in north America for: protecting sheep, goats, cattle, and poultry against canid predators. VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. 21-34.
- Fu, Y. 1997. Statistical neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Galtier, N., B. Nabholz, S. Glémin, y G. D. D. Hurst. 2009. Mitochondrial DNA as a Marker of Molecular Diversity: a Reappraisal. *Molecular Ecology* : 4541–4550.

García V, Wilber; San Martín H., Felipe; Novoa M., César; Franco LL., Enrique. 2002. Engorde de llamas bajo diferentes regímenes alimenticios. *Rev Inv Vet Perú*: 1 – 9.

Gonzalez, Benito A., R. Eduardo Palma, Beatriz Zapata, y Juan C. Marín. 2006. Taxonomic and biogeographical status of guanaco *Lama guanicoe* (Artiodactyla, Camelidae) . *Mammal Review* : 157–178.

Harris, J. M., Geraads Denis y Solounias Nikos. 2010. In: *Cenozoic Mammals of Africa*. Berkeley: University of California Press. 815 – 820.

Harrison, J. A. 1979. Revision of the Camelinae (Artiodactyla, Tylopoda) and description of the new genus *Alforjas*. *University of Kansas Paleontological Contributions* :1-20.

Henson, E. L. 1992. *In situ conservation of livestock and poultry*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Hijmans RJ, Guarino L, Bussink C et al. 2005b. *DIVA-GIS, version 5. Manual*. Available at <http://www.diva-gis.org/>.

Honey, J. G., J. A. Harrison, D. R. Prothero, and M. S. Stevens. 1998. in C. M. Janis, K. M. Scott, and 1. *Evolution of Tertiary Mammals of North America: Volume 1. Terrestrial Carnivores, Ungulates, and Ungulate-like Mammals Camelidae*; Jacobs (eds.), Cambridge University Press, New York. 439-462

Huanca, T., Apaza, N., y Gonzáles, M. 2007. Experiencias del INIA en el fortalecimiento del Banco de Germoplasma de camélidos domésticos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15. Grupo 5 Camélidos sudamericanos: 185–213.

Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference in phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 754–755.

Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2012. Censo Nacional Agropecuario. <http://proyectos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/?id=CensosNacionales>.

- Jordana, J., J. Marmi, y R. Avellanet. 2007. Análisis de la variabilidad de la región control del ADN mitocondrial en la raza ovina xisqueta. *Archivos de Zootecnia* : 429-434.
- Jukes TH and Cantor CR . 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York: 21-132.
- Julie A. M. 2003. A new species of *Hemiachenia* (Camelidae; Lamini) from the plio-pleistocene of florida. Thesis for Master degree at Universidad of Florida. 1-67.
- Kadwell, M, M Fernandez, H F Stanley, R Baldi, J C Wheeler, R Rosadio, y M W Bruford. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings. Biological Sciences, The Royal Society*: 2575–2584.
- Kruskal, J. B. 1956. On the shortest spanning subtree of the graph and the travelling salesman problem. *Proc. Amer.Math. Soc.*7:48–57.
- La Manna, Vincenzo, La Tereza, Antonietta, Ghezzi, Silvia, Saravanaperumal, Siva, Apaza, Norberto, Huanca, Teodosio, Bozzi, Ricardo, y Renieri, Carlos. 2011. Analysis of genetic distance between Peruvian Alpaca (*Vicugna pacos*) showing two distinct fleece phenotypes, Suri and Huacaya, by means of microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science* 10: 271–276.
- Larget, B. and D.L. Simon. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 750–759.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2947-2948.
- Lee, Hsin-Chen, y Yau-Huei Wei. 2005. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (4) (abril): 822-834.

- Librado, P., y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*: 1451–1452.
- Litt Michael and Luty Jeffrey A. 1989. A Hypervariable microsatellite revealed by In Vitro amplification of a dinucleotide repeat with the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*:397-401.
- Llacsca M., Javier, Urviola S., J. Martín, y Leyva V., Víctor. 2007. Evaluación de indicadores biométricos en llamas (*Lama glama*) de las variedades Ch'accu y K'ara. *Rev. Inv. Vet. Perú* 18: 1–10.
- Mamani-Linares, Willy, y Cayo R., Faustina. 2011. Características físico-químicas del charqui de llama. *Rev. Inv. Vet. Perú* 22. 4: 290-300.
- Mambo, Elizabeth, Xiangqun Gao, Yoram Cohen, Zhongmin Guo, Paul Talalay, y David Sidransky. 2003. Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* : 1838-1843.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* : 209-220.
- Margullis, L. & D. Sagan. 2001. Marvellous microbes. *Resurgence* 206: 10–12.
- Marín, Juan C, Beatriz Zapata, Benito A González, Cristian Bonacic, Jane C Wheeler, Ciara Casey, Michael W Bruford, et al. 2007a. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista chilena de historia natural* : 121-140.
- Marín J. C. 2004. Filogenia molecular, filogeografía y domesticación de camélidos sudamericanos (*Artiodactyla: Camelidae*). Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- Marín, J. C., Angel E. Spotorno, Benito A. González, Cristian Bonacic, Jane C. Wheeler, Ciara S. Casey, Michael W. Bruford, R. Eduardo Palma, y Elie Poulin. 2008. Mitochondrial DNA Variation and Systematics of the Guanaco (*Lama guanicoe*, Artiodactyla: Camelidae). *Journal of Mammalogy* : 269-281.
- Marin, J. C, Benito A González, Elie Poulin, Ciara S Casey, y Warren E Johnson. 2013. The Influence of the Arid Andean High Plateau on the Phylogeography and Population Genetics of Guanaco (*Lama Guanicoe*) in South America. *Molecular Ecology* : 463-482.
- Marin, J C, C S Casey, M. Kadwell, K. Yaya, D. Hoces, J. Olazabal, R. Rosadio, et al. 2007b. Mitochondrial Phylogeography and Demographic History of the Vicuña: Implications for Conservation. *Heredity* : 70-80.
- Marín, J.C., Spotorno, A.E., Wheeler, J.C., 2006. Sistemática molecular y Filogeografía de camélidos sudamericanos: implicancias para su conservación y manejo. In: Vila', B. (Ed.), *Investigación, Conservación y Manejo de Vicuñas. Proyecto MACS-Argentina*, Buenos Aires. 85–100.
- Maté, M. L., F. Di Rocco, A. Zambelli, y L. Vidal-Rioja. 2004. Mitochondrial DNA Structure and Organization of the Control Region of South American Camelids. *Molecular Ecology Notes*: 765–767.
- Meachen, J. A. 2003. A New Species of *Hemiauchenia* (Camelidae; Lamini) from the Plio-Pleistocene of Florida (Doctoral dissertation, University of Florida).
- Melo, C., A. Manunza, M. Melo, L. Olivera, y M. Amills. 2012. Analysis of the Mitochondrial Diversity of Alpacas in Eight Farming Areas of the South of Peru. *En Fibre Production in South American Camelids and Other Fibre Animals*: 87-9.
- Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*: 56-65.
- Mengoni Goñalons y Guillermo Luis. 2008. Camelids in ancient Andean societies: A review of the zooarchaeological evidence. *Quaternary International*: 59-68.

- Nei, Masatoshi. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nei, Masatoshi. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Norambuena, M. Cecilia, y Marcos Paredes. 2003. Variabilidad y estructura genética en dos poblaciones de *Vicugna vicugna* (Camelidae) del norte de Chile. *Revista chilena de historia natural* : 99–104.
- Pakendorf, Brigitte, y Mark Stoneking. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* : 165-183.
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2537-2539.
- Pearson, K. 1901. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philosophical Magazine* : 559–572.
- Peng Cui, Rimutu Ji, Feng Ding, Dan Qi, HongweiGao, He Meng, Jun Yu, SongnianHu, y Heping Zhang. 2007. A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus*): an evolutionary history of camelidae». *BMC Genomics* : 10.
- Pérez, P., Maino, M., Guzmán, R., Vaquero, A., Kobrich, C., Pokniak, J. 2000. Carcass characteristics of llamas (*Lama glama*) reared in Central Chile. *Small Rumin. Res.* 37, 93–97.
- Pinto Jiménez, C.E., Martín Espada, C., y Cid Vázquez, M .D. 2010. Camélidos sudamericanos: Clasificación, Origen, Características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4: 23–36.
- Rambaut, A. 2009. FigTree v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

- Richter, C., J W Park, y B N Ames. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences* : 6465-6467.
- Renieri, C., Frank, E.N., Rosati, A.Y., y Antonini, M. 2009. Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources Information* : 45-54.
- Rogers, A & H. Harpending. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Bio. Evol.* :552-569.
- Rodríguez B., Jorge, Wheeler, Jane C., Dodd, Ciara S., Bruford, Michael W., y Rosadio A., Raúl. 2004. Determinación de parentesco en Alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN microsatélite. *Rev. Inv. Vet. Perú* 15: 113–119.
- Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sbisà, E, F Tanzariello, A Reyes, G Pesole, y C Saccone. 1997. Mammalian Mitochondrial D-loop Region Structural Analysis: Identification of New Conserved Sequences and Their Functional and Evolutionary Implications. *Gene* : 125-140.
- Schneider Stefan and Excoffier Laurent. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial dna. *Genetics* :1079-1089.
- Segura-Correa José C., Montes-Pérez Rubén C. 2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Rev Biomed.* 196 – 206.
- Shadel, Gerald S. y David A. Clayton. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry* : 409-435.
- Stanley, Helen F, Miranda Kadwell, y Jane C Wheeler. 1994. Molecular Evolution of the Family Camelidae: A Mitochondrial DNA Study. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*: 123 -126

- Stoneking, M, L B Jorde, K Bhatia, y A C Wilson. 1990. Geographic Variation in Human Mitochondrial DNA from Papua New Guinea. *Genetics* : 717-733.
- Tamura, Koichiro, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei, y Sudhir Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tamura, K, y M Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* : 512-526.
- Van Asch, B, F Pereira, L S Santos, J Carneiro, N Santos, y A Amorim. 2011. Mitochondrial Lineages Reveal Intense Gene Flow Between Iberian Wild Boars and South Iberian Pig Breeds. *Animal Genetics* : 35-41.
- Vidal O. 1967. La crianza de la llama y algunas características de su fibra. Tesis, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
- Wan, Qiu-Hong, Hua Wu, Tsutomu Fujihara, y Sheng-Guo Fang. 2004. Which Genetic Marker for Which Conservation Genetics Issue?. *Electrophoresis* : 2165-2176.
- Watterson G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* : 256–276.
- Webb SD. 1974. Pleistocene mammals of Florida, Gainesville, University of Florida Press. 170-259.
- Wheeler, J. C. 1982. Aging llamas and alpacas by their teeth. In: *Llama World* 1 (2): 139 – 144.
- Wheeler, J.C., 2006. Historia natural de la vicuña. In: Vila, B. (Ed.), *Investigación, conservación y manejo de vicuñas*. Proyecto MACS-Argentina, Buenos Aires, 25–35.

- Wheeler, J. C. 1991. Origen, evolución y status actual. In: Fernández-Baca S, ed. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos Sudamericanos. Santiago; FAO, 11-48.
- Wheeler, J. C. 1995. Evolution and Present Situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*: 271–295.
- Wheeler, J. C. 2012. South American camelids – past, present and future. *Journal of Camelid Science*; Isocard : 1- 24.
- Wheeler, J. C., 1993. South American camelids: past, present and future. In: Proceedings of the First European Symposium on South American Camelids, Bonn, Germany. 13–28.
- Wheeler J.C., Chikhi L. & Bruford M.W. 2006. Genetic analysis of the origins of domestic South American camelids. The domestication of South American camelids: a view from the South Central Andes. In: Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms. University of California Press: Berkeley. 229–341.
- Wheeler, J. C., M Fernández., R Rosadio, D Hoces, M Kadwell & M Bruford. 2001. Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias*: 170–183.
- Wheeler, J. C., Russel A.J.F., y Hilary Redden. 1995. Llamas and Alpacas: Pre-conquest breeds and post-conquest hybrids. *Journal of Archaeological Science*: 833–840.
- Wheeler, J. .C., Russel A. J. F., y Stanley, H. F. 1992. A measure of loss: Prehispanic llama and Alpaca breeds. *Arch. Zootec* : 467–475.
- Weinstock, Jaco, Beth Shapiro, Alfredo Prieto, Juan Carlos Marín, Benito A. González, M. Thomas P. Gilbert, y Eske Willerslev. 2009. The Late Pleistocene distribution of vicuñas (*Vicugna vicugna*) and the “extinction” of the gracile llama (“*Lama gracilis*”): New molecular data. *Quaternary Science Reviews* 28 (15–16) (julio): 1369-1373.

Zea M., Otto, Leyva V., Víctor, García V., Wilber, y Falcón P., Néstor. 2007. Evaluación de las medidas de grupa y muslo de la cría y ubre de la madre como indicadores fenotípicos en la selección temprana de llamas (*Lama glama*) para carne. *Rev. Inv. Vet. Perú* : 40-50.

Zeder, Melinda A., Eve Emshwiller, Bruce D. Smith, y Daniel G. Bradley. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics* : 139-155.

10. ANEXOS

Anexo 1. Ficha de colecta de campo.

FICHA DE COLECTA DE LLAMAS (*Lama glama*)

Responsables: Adriana Vallejo T. y Orson Mestanza M.

Fecha: / /

Departamento: PUNO

I.- DEL ANIMAL

Color: Raza:
Código muestra: Sexo (Macho) (Hembra)
Arete: Clase: (Cría) (Tuis) (Capo) (Padre) (Madre)
Fecha de Nac.: Observaciones: (Estado fisiológico, denominación común, etc.)
Edad: años
Peso: kg.
Defectos:

II.- DEL PROPIETARIO

Nombre:
Localidad/Anexo/Comunidad:
Distrito:
Provincia:
Altitud: msnm Longitud: Latitud:

III. – CARACTERÍSTICAS DE FIBRA Y VELLÓN

Color de fibra: Suavidad: (Áspera) (Aterciopelada) (Suave)
Tipo de Mecha: (Piramidal) (Rectangular) (Trapezoidal)
Longitud de mecha: m. Brillo: (Brillante) (Mate)
Capa uniforme: (Blanca) (Negra) (Café) (Gris) (LF)
Capa compuesta:
Registro Fotográfico: Código

Anexo 2. Secuencias de haplotipos reportados en el *GenBank* hasta el 2013 de guanacos, vicuñas, alpacas y llamas. Fueron usadas en la construcción de los *networks* y los haplotipos únicos para el árbol de inferencia bayesiana.

Especie	<i>GenBank</i>	Referencia
<i>Lama glama</i>	AY856136.1 - AY856144.1	Marín <i>et al.</i> 2004*
<i>Lama pacos</i>	AY856145.1 - AY856156.1	Marín <i>et al.</i> 2004*
<i>Lama guanicoe guanicoe</i>	AY535217.1 - AY535248.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe guanicoe</i>	AY856223.1 - AY856269.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe guanicoe</i>	AY856212.1 - AY856216.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe huanacus</i>	AY535185.1 - AY535216.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe huanacus</i>	AY856217.1 - AY856222.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe huanacus</i>	AY856181.1 - AY856211.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe voglii</i>	AY535181.1 - AY535184.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe voglii</i>	AY856173.1 - AY856180.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe cacsilensis</i>	AY535173.1 - AY535180.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Lama guanicoe cacsilensis</i>	AY856157.1 - AY856172.1	Marín <i>et al.</i> 2008
<i>Vicugna vicugna vicugna</i>	AY856339.1 - AY856341.1	Marín <i>et al.</i> 2004*
<i>Vicugna vicugna vicugna</i>	AY856304.1 - AY856323.1	Marín <i>et al.</i> 2004*
<i>Vicugna vicugna mensalis</i>	AY856324.1 - AY856338.1	Marín <i>et al.</i> 2004*
<i>Vicugna vicugna mensalis</i>	AY856270.1 - AY856303.1	Marín <i>et al.</i> 2004*

*En el *GenBank* corresponde a un artículo aún no publicado del 2004, pero el artículo donde se hace referencia estas secuencias es Marín *et al.* (2006).