

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LLAMAS  
(*Lama glama*) CH'AKU y CCARA DEL BANCO DE GERMOPLASMA  
DE ALPACAS DE COLOR Y LLAMAS DEL CENTRO  
EXPERIMENTAL ILLPA-INIA ANEXO QUIMSACHATA, USANDO  
MARCADORES MICROSATÉLITES”

Presentado por:

GABRIELA FABIOLA PAREDES ROJAS

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO

Lima - Perú

2013





## **DEDICATORIA**

A MIS PADRES Y ABUELOS,

COMO A MIS HERMANOS BRANDO Y SANDRA,

A LA MEMORIA DE MI PRIMO DANIEL Y MI AMIGO DIÓGENES

## **AGRADECIMIENTO**

- A mi familia por su apoyo incondicional durante el periodo de la tesis. Los amo mucho.
- A la Universidad Nacional Agraria La Molina, especialmente a la Facultad de CIENCIAS por haberme instruido y acogido durante mi tiempo de estudiante.
- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) por brindarme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica.
- Al Doctor Gustavo Gutiérrez, asesor de este trabajo, por su valioso apoyo y por todas las oportunidades académicas brindadas.
- Al Ingeniero Eudosio Veli por su apoyo constante, y por el gran aporte de conocimiento en el tema desarrollado.
- A la Bióloga Adriana Vallejo por compartir su vasta experiencia y conocimiento siempre con sencillez y mucha alegría.
- A la Bióloga Claudia Yalta por sus indicaciones, apuntes constantes y compartir su experiencia con paciencia y amistad.
- A todos mis amigos del laboratorio por hacer de él un lugar muy valioso de trabajo.
- A mis profesores de la UNALM, en especial a la profesora Patricia Moreno, porque ella me inculcó las ganas de ser Bióloga.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	16
II. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Los camélidos sudamericanos en la historia y actualidad del Perú	18
2.2 Las llamas	19
2.2.1 Tipos de llamas	20
2.3 Banco de Germoplasma de Alpacas y Llamas del Centro Experimental ILLPA-INIA, anexo Quimsachata	21
2.3.1. Antecedentes	21
2.3.2 Características del Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas	21
2.3.3 Importancia de la población de llamas del Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas	22
2.4 Análisis de la diversidad genética mediante marcadores moleculares	23
2.4.1 Marcadores microsatélites	24
2.4.2 Cebador universal M13	25
2.4.3 Estudios moleculares en llamas	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Fase de campo	30
3.2 Fase de laboratorio	32
3.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de sangre	32
3.2.2 Calidad y cuantificación del ADN extraído	34
3.2.3 Amplificación de ADN microsatélite	35
3.2.4 Uso del analizador genético para electroforesis capilar	41
3.2.5 Análisis de datos	43
3.3 Fase de análisis de parámetros genéticos poblacionales	44

3.3.1 Análisis de diversidad alélica	44
a. Frecuencias alélicas	44
b. Heterocigosidad esperada	44
c. Heterocigosidad observada	45
d. Contenido de información polimórfica	45
3.3.2 Equilibrio Hardy-Weinberg	45
3.3.3 Alelos nulos	46
3.3.4 Diversidad genética de NEI	47
3.3.5 Análisis de la estructura genética de las poblaciones	48
a. Estadísticos F de Wright	48
b. Análisis de Varianza Molecular	49
c. Análisis de la Estructura de la Población	49
3.3.6 Flujo génico	50
3.3.7 Análisis factorial de correspondencia	50

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Fase de análisis de parámetros genéticos poblacionales	51
4.1.1 Frecuencias alélicas	53
4.1.2 Heterocigosidad esperada y observada	62
4.1.3 Contenido de información polimórfica	64
4.1.4 Equilibrio Hardy-Weinberg	65
4.1.5 Alelos nulos	69
4.1.6 Diversidad genética	70
4.2 Diferenciación genética entre las llamas Ch'aku y Ccara	71
4.2.1 Estadísticos F de Wright	72
4.2.2 Análisis de varianza molecular	76
4.2.3 Análisis de la estructura de la población	77
4.3 Flujo génico	78
4.4 Análisis factorial de correspondencia	79

V. CONCLUSIONES	80
VI. RECOMENDACIONES	81
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
VIII. ANEXOS	91

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ficha de Campo	31
Cuadro 2. Los cebadores y la secuencia M13, usados para amplificar regiones microsatélite en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata	36
Cuadro 3. Combinaciones para reacciones en multiplex y simplex en PCR, rango (pb), marcaje y temperatura óptima de los microsatélites	37
Cuadro 4. Condiciones de Mezcla de amplificación del Grupo I (M1, S1 y M2)	38
Cuadro 5. Condiciones de Mezcla de amplificación del Grupo II (M3, M4 y S2)	39
Cuadro 6. Grupos asignados para el Analizador Genético según su fluorescencia y volumen usado en el Analizador de cada reacción Multiplex (M) y/o simplex (S)	42
Cuadro 7. Número de alelos por locus en cada población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata	52
Cuadro 8. Valores de He y Ho en cada población y en la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata	63
Cuadro 9. Contenido de Información Polimórfica de las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	64
Cuadro 10. Análisis de la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg global por marcador	66

Cuadro 11. Análisis de la desviación del equilibrio HW por marcador y por población, por medio de la Fis de Weir y Cockerhan y Robertson y Hill (1984). Score Test 5000 iteraciones	68
Cuadro 12. Frecuencia de alelos nulos por locus	69
Cuadro 13. Diferenciación genética entre las poblaciones de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata	72
Cuadro 14. Estadísticos F para todos los loci de la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata	73
Cuadro 15. Estadísticos F global de la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata	75
Cuadro 16. Valores de Fis promedio para ambas poblaciones	76
Cuadro 17. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) de las dos poblaciones del Banco de Germoplasma de Quimsachata	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fenotipos de llamas a) Ccara y b) Ch'aku	20
Figura 2. Vista de la sede de la Estación Experimental ILLPA-anexo Quimsachata	22
Figura 3. Población de llamas del Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas del anexo Quimsachata-INIA	23
Figura 4. Procedimiento de amplificación y marcaje del cebador universal M13 (modificado de Arruda <i>et al.</i> , 2010)	27
Figura 5. Mapa DIVA-GIS del Banco de Germoplasma de Alpacas de Color y Llamas de Quimsachata	30
Figura 6. a). Equipo Epoch para cuantificar ADN; b). Cargado de muestras para cuantificación.	34
Figura 7. a). Preparación de muestras para electroforesis capilar; b). Cargado de placa de en el Analizador Genético ABI 3130XL	41
Figura 8. Electroferograma de los marcadores amplificados	43
Figura 9. Frecuencias alélicas del marcador GLM4 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	53
Figura 10. Frecuencias alélicas del marcador LAB1 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	54
Figura 11. Frecuencias alélicas del marcador LCA54 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	54
Figura 12. Frecuencias alélicas del marcador LCA65 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	55
Figura 13. Frecuencias alélicas del marcador LCA77 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	56
Figura 14. Frecuencias alélicas del marcador LCA82 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	56

Figura 15. Frecuencias alélicas del marcador LCA83 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	57
Figura 16. Frecuencias alélicas del marcador LCA85 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	58
Figura 17. Frecuencias alélicas del marcador LGU76 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	58
Figura 18. Frecuencias alélicas del marcador YWLL08 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	59
Figura 19. Frecuencias alélicas del marcador YWLL44 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	60
Figura 20. Frecuencias alélicas del marcador YWLL59 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	61
Figura 21. Frecuencias alélicas del marcador VOLP03 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara	61
Figura 22. Diversidad genética por locus y por población	71
Figura 23. Análisis de la estructura de las dos poblaciones de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.	78
Figura 24. Representación tridimensional del Análisis Factorial de Correspondencia entre las dos poblaciones de llamas (Amarillo: Ch'aku y Azul: Ccara)	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO I. Datos de colecta de cada llama seleccionada del Banco de Germoplasma de Quimsachata	91
ANEXO II. Concentración y Calidad del ADN Stock	98
ANEXO III. Concentración y Calidad de Dilución del ADN.	114

## RESUMEN

En 1987, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) estableció en la Estación Experimental ILLPA (Puno), anexo Quimsachata “el Banco de Germoplasma de Alpacas y Llamas de color” orientado a la conservación de la diversidad genética de los camélidos domésticos de los departamentos de Puno y Cuzco. Sin embargo, hasta la fecha no se habían desarrollado trabajos de caracterización genética de la población de llamas, datos básicos para garantizar la conservación de este recurso natural del Perú.

El presente trabajo analizó la diversidad y el grado de diferenciación genética de 251 llamas (92 y 159 fenotipos Ch'aku y Ccara, respectivamente) del Banco de Germoplasma de Quimsachata, mediante la aplicación y análisis de 13 marcadores microsatélites específicos de camélidos sudamericanos, reportados internacionalmente, usando la metodología de marcaje fluorescente por medio del cebador universal M13. Los resultados reportaron altos niveles de polimorfismo en los marcadores, determinando alta diversidad genética. Se identificaron 157 alelos diferentes, un promedio de 12.08 alelos por marcador, heterocigosidad esperada promedio por marcador: 0.758 y PIC promedio por marcador: 0.723. La prueba del equilibrio Hardy-Weinberg demostró que, en general, los loci estuvieron en desequilibrio debido a un déficit de heterocigotos ( $F_{is}$  promedio: 0.063) y no se debió a alelos nulos. A pesar que las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara del Banco son manejadas por separado, la diferenciación genética entre ellas es muy baja ( $F_{ST} = 0.01$ ), esto indica una débil estructura genética, y existe un intenso flujo genético entre ambas poblaciones. Probablemente su mismo proceso de domesticación y el intercambio frecuente de reproductores en los rebaños de donde provienen, ha envuelto cruzamientos entre ambos fenotipos.

El presente trabajo puede contribuir a un mejor manejo del Banco en cuestión y el set de marcadores microsatélites utilizados son robustos para llevar a cabo estudios de diversidad genética en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata el cual presenta elevada diversidad genética.

**Palabras clave:** *Lama glama*, Banco de Germoplasma, diversidad genética, marcadores microsatélites.

## ABSTRACT

In 1987, the National Institute for Agrarian Innovation (INIA) established at the ILLPA-Experimental Station in Quimsachata (Puno) Peru “the Germplasm Bank of colored Alpacas and Llamas” created to conserve the genetic diversity of domestic camelids from the regions of Puno and Cuzco. Nevertheless, to this date there have not been developed genetic characterization studies of the llama population, essential data to guarantee the conservation of this natural resource from Peru.

Thirteen microsatellite loci, reported internationally and specific of South American camelids, were used to assess the genetic variability and genetic differentiation parameters of 251 llamas from the Germplasm Bank of Quimsachata (92 and 159 belonging to Ch’aku and Ccara phenotypes, respectively). The results reported high levels of polymorphism (a total of 157 different and average: number of alleles, expected heterozygosity, PIC across per marker: 12.08, 0.758 and 0.723, respectively). The Hardy-Weinberg equilibrium test showed that, in general, the loci microsatellite were in disequilibrium due to heterozygote deficits (average  $F_{IS}$ : 0.063) and not because of the presence of null alleles. Although the two llama populations, Ch’aku and Ccara, are managed separately. The genetic differentiation between them is very low ( $F_{ST}=0.01$ ), this indicates a weak genetic structure, and there is an intense gene flow between both populations. Probably, its domestication process and the frequent exchange of reproductive males in the herds where they come from, has involved breeding between both phenotypes.

The present study may contribute to improve the management of the Bank and the set of microsatellite markers utilized are informative to carry on studies of genetic diversity in the llama population of the Germplasm Bank of Quimsachata, which has high genetic diversity.

**Key words:** *Lama glama*, Germplasm bank, genetic diversity, microsatellite markers.

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es el centro más importante de camélidos sudamericanos (CSA) y su crianza constituye una de las actividades de mayor impacto socio económico para los pobladores alto andinos de nuestro país (Revista Agroinnova, 2011). La llama, *Lama glama*, es el camélido sudamericano doméstico más grande y mejor adaptado a un amplio rango de condiciones medioambientales (Bustamante et al., 2006) y presenta dos variedades o fenotipos: Ccara o Pelada y Ch'aku o Lanuda.

La industria textil nacional e internacional ha mostrado una especial predilección por las fibras de color blanca a razón de su versatilidad al teñido. Esta situación originó que muchos rebaños de alpacas del país inicien un intenso proceso de blanqueo, disminuyendo las poblaciones de alpacas de color, al igual que se incrementó la saca de llamas para reemplazarlas por alpacas blancas (Enríquez, 2003).

Ante el blanqueo inminente de los rebaños de camélidos domésticos del Perú y por ende la pérdida de su diversidad genética, y teniendo en cuenta que en el departamento de Puno se encuentra la mayor población de CSA domésticos del Perú; en 1987, con el apoyo técnico, financiero del Proyecto Alpacas (PAL), Convenio de Cooperación Técnica del Gobierno Suizo COTESU-INIA, se estableció en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), en la Estación Experimental Illpa, anexo Quimsachata, un Banco de Germoplasma de Alpacas y Llamas orientado a la recuperación y conservación de alpacas de color, y llamas en sus dos fenotipos Ch'aku y Ccara (Huanca, 2007).

La conservación de razas y/o poblaciones ha tomado un gran auge ya que se desea evitar la pérdida de los reservorios únicos de recursos genéticos valiosos que pueden ser usados para lograr un desarrollo sostenible. En el caso de las poblaciones de llamas, *Lama glama*, Ch'aku y Ccara ubicadas en el Banco de Germoplasma de Quimsachata, su biodiversidad simboliza patrimonio natural, económico, cultural e histórico del departamento de Puno y Cuzco, y debe presentar una elevada diversidad genética para ser considerada un adecuado stock genético que pueda contribuir a garantizar la conservación de este recurso y a aumentar la viabilidad y productividad de las poblaciones de llamas en ambos departamentos. Además, la caracterización genética del Banco puede contribuir a implementar futuras estrategias para un manejo efectivo y evaluar posibles pérdidas en la diversidad genética.

Los marcadores de ADN microsatélite (SSR) se han convertido en la principal fuente de marcadores genéticos, ya que son abundantes, están distribuidos regularmente en el genoma, se heredan de forma codominante y poseen un elevado grado de variabilidad en las poblaciones. Debido a ello, son herramientas de uso corriente para evaluar la diversidad y estructura genética de las poblaciones (Weber y May, 1989).

Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivos analizar la diversidad genética y determinar el grado de diferenciación genética entre los dos fenotipos de llamas, Ch'aku y Ccara del Banco de Germoplasma de Alpacas y Llamas de Color del INIA mediante la aplicación y análisis de 13 loci microsatélites reportados internacionalmente en CSA usando el cebador universal M13.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS EN LA HISTORIA Y ACTUALIDAD DEL PERÚ

Los Camélidos Sudamericanos (CSA) representan un elemento natural que está relacionado de un modo muy íntimo con la sociedad, historia y economía del Perú; derivan de especies prehistóricas originadas en Norteamérica que desaparecieron de esa región hace más de 11 millones de años. Antes de su desaparición algunos camélidos ancestrales migraron hacia el sur del continente para evolucionar en los CSA actuales que incluyen dos especies domésticas: llama (*Lama glama*) y alpaca (*Vicugna pacos*) y dos especies silvestres: guanaco (*Lama guanicoe*) y vicuña (*Vicugna vicugna*). Estudios de ADN mitocondrial sugieren que la vicuña y el guanaco fueron los antecesores de las alpacas y las llamas, respectivamente, en un proceso de domesticación que comenzó en los Andes Centrales de Sudamérica hace 6000 años (Kadwell et al., 2001; Marin et al., 2007).

Desde tiempos ancestrales los camélidos domesticados, llamas y alpacas, fueron de gran importancia en los Andes, representando estatus, riqueza y proveyendo un amplio rango de bienes y servicios, incluyendo sacrificios religiosos, transporte y medicina (Shimada et al., 1985). El uso textil de sus fibras se inició con la Cultura Huaca Prieta hace 2500 años (Wheeler et al., 2004), tuvo un desarrollo evidente en la Cultura Paracas y posteriormente alcanzó niveles de excelencia en la Cultura Mochica (Wing, 1977). Después de la conquista, se redujo su número y distribución geográfica y también su significancia económica ya que muchos de sus roles fueron usurpados por animales provenientes de Europa (ovejas, cerdos y burros).

La crianza de alpacas y llamas es una actividad económica relevante para las regiones andinas, destacando la producción de fibra fundamentalmente la de alpaca que posee una alta valoración en los mercados internacionales por su fina textura. La carne en forma contraria, tanto de llama como de alpaca, posee un consumo muy bajo en los medios urbanos, pese a sus extraordinarias cualidades nutritivas, como lo son el bajo porcentaje de grasa y un nivel de proteína más alto en relación a otras especies, características adecuadas para los perfiles nutricionales de las sociedades modernas (FAO, 2005).

## **2.2 LAS LLAMAS**

La llama, *Lama glama*, es el CSA doméstico más grande y mejor adaptado a un amplio rango de condiciones medioambientales (Bustamante et al., 2006). Se asemeja en muchos aspectos morfológicos y comportamentales a su progenitor silvestre, el guanaco (Wheeler, 1995) y su hábitat se circunscribe al medio ecológico alto andino, entre los 2300 a 4000 m s n m., donde existen pastos escasos y fibrosos de bajo valor nutricional. Se le clasifica en el orden Artiodactyla, suborden Tylopoda, familia Camelidae y tribu Lamini (Wheeler et al., 2004). Las fibras crecen entre 10 y 20 centímetros por año y no es tan fina como la de las alpacas ya que tienen un grosor de 26 y 28 micrones en promedio. Son seleccionadas por el peso de su vellón, más que por la uniformidad de su color o la finura de su fibra. Por lo tanto, a diferencia de las alpacas, la presión de selección para colores blancos ha sido menor para ellas y los colores de sus prendas van desde un rango de blanco al negro, con sombras de beige, marrón y rojo (Vila, 2004).

En el Perú, especialmente en el departamento de Puno, el cuál alberga la mayor población de llamas; estas son uno de los animales más útiles e importantes para la economía local, debido principalmente a que: se consume su carne, son animales de carga, su fibra se usa para tejer abrigos y ocasionalmente sus intestinos son usados para hacer cuerdas y tambores y su excremento es usado como combustible (Wilson y Reeder, 2005).

En cuanto a su crianza, las llamas se manejan y producen en sistemas de producción pequeños y por productores de escasos recursos económicos. Los sistemas explotan la pradera nativa

comunitariamente aunque con cargas animales que sobrepasan su capacidad productiva, y en aquellos sistemas donde la producción de llama es un componente central, el pastoreo sigue una rotación estacional, más notoria en zonas de producción extensiva. En algunos sistemas los machos se incluyen en rebaños separados de las hembras para ser pastoreados por la comunidad en lugares alejados, y luego reunidos durante la época de monta que coincide con las lluvias de enero y marzo (Quispe et al., 2009).

### 2.2.1 TIPOS DE LLAMAS

Se reconocen dos fenotipos de llamas: Ccara o Pelada y Ch'aku o Lanuda (Figura 1). Los tipos Ccara, son reconocidos por sus cuerpos delgados y largos y su pelaje corto, son más pesadas que las lanudas y poseen mayor aptitud para la producción de carne pero menor rendimiento en vellón y menor calidad de fibra (Iñiguez et al., 1998). Por el contrario, las llamas Ch'aku son compactas con cuerpos más cortos y tienen mayor potencial para la producción de fibras, las cuales son más finas que las Ccara (Maquera, 1991). Estos fenotipos tienen carácter hereditario y se identifican en el rebaño como fenotipos extremos; sin embargo, existen los intermedios de difícil categorización (Iñiguez et al., 1998).



**Figura 1.** Fenotipos de llamas a) Ccara y b) Ch'aku.

## **2.3 BANCO DE GERMOPLASMA DE ALPACAS Y LLAMAS DEL CENTRO EXPERIMENTAL ILLPA- INIA, ANEXO QUIMSACHATA**

### **2.3.1 ANTECEDENTES**

La industria textil nacional e internacional ha mostrado una especial predilección por las fibras de color blanca a razón de su versatilidad al teñido. Esta situación originó que muchos rebaños de alpacas del país inicien un intenso proceso de blanqueo, donde la proporción de alpacas de color disminuyó considerablemente, al igual que se incrementó la saca de llamas para reemplazarlas por alpacas blancas. Este hecho en la opinión de los criadores de camélidos, se resume en la siguiente expresión: “las alpacas de color sólo existen como lunares dentro de nuestros rebaños de alpacas blancas” (Enríquez, 2003).

Ante el blanqueo inminente de los rebaños de camélidos domésticos del Perú y por ende la pérdida de su diversidad genética, en 1987, con el apoyo técnico y financiero del Proyecto Alpacas (PAL), Convenio de Cooperación Técnica del Gobierno Suizo COTESU INIA, se estableció en la Estación Experimental Illpa Puno, anexo Quimsachata, un Banco de Germoplasma de Alpacas y Llamas orientado inicialmente a la recuperación y conservación de alpacas de color y llamas en sus dos ecotipos Ch'aku y Ccara (Huanca, 2007).

### **2.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE ALPACAS DE COLOR Y LLAMAS**

El Banco de Germoplasma de alpacas de color y llamas es propiedad del INIA y se ubica en la estación experimental ILLPA-anexo Quimsachata, sobre los 4,100 m s n m., entre los distritos de Cabanillas y Santa Lucía, y las provincias de San Román y Lampa, en la región Puno. Su principal objetivo es contribuir al incremento de los niveles de producción y productividad de la crianza de camélidos, generando alternativas tecnológicas para impulsar la crianza sostenible y la conservación de la diversidad genética de este recurso natural del Perú (Revista Agroinnova, 2011).

Pertenece a la zona agroecológica de Puna Seca ambiente árido, extremadamente frío con precipitación pluvial de 450 a 600 mm, disminuyendo a niveles de 353 mm en años secos. La temperatura fluctúa entre 3°C de Mayo a Julio y 15°C entre setiembre y diciembre; siendo el promedio de 7.8°C. Su principal recurso agroecológico son las gramíneas y en menor grado las compuestas, ciperáceas, juncáceas y leguminosas.



**Figura 2.** Vista de la sede de la Estación Experimental ILLPA-anexo Quimsachata.

### **2.3.3 IMPORTANCIA DE LA POBLACIÓN DE LLAMAS DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE ALPACAS DE COLOR Y LLAMAS**

En los últimos años la conservación de razas y/o poblaciones de distintas especies ha cobrado gran auge porque se desea evitar la pérdida de la diversidad genética pues disminuye la capacidad de recuperar especies amenazadas y mantener y mejorar el rendimiento de otras incluidas en el circuito productivo (Aranguren-Méndez et al., 2001).

En el caso de la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata, su biodiversidad simboliza patrimonio natural, cultural, histórico y económico ya que representa una fuente importante para el sustento y la vida de los productores alto andinos. Por lo tanto el país tiene el deber de proteger este recurso genético valioso y único.



**Figura 3.** Población de llamas del Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas del anexo Quimsachata-INIA.

#### **2.4 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES**

El estudio de diversidad genética de las poblaciones se ha enfocado en los patrones de diversidad del genoma de los individuos haciendo uso de marcadores moleculares con el fin de evaluar el estado genético de las poblaciones y así proponer medidas para preservar la diversidad genética. Sin embargo, la aplicación de los marcadores moleculares en conservación no se limita a esto, sino que ésta también pueden contribuir de manera fundamental al entendimiento de la historia evolutiva, la demografía y la ecología de las especies y poblaciones (Godoy, 2009). Eventualmente estos datos pueden ser utilizados como referencia empírica en la elaboración de programas de conservación de especies catalogadas como vulnerables o en peligro de extinción (Moritz, 1999).

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que permiten identificar o diferenciar genotipos, cuya transmisión de una generación a otra es posible de seguir. Estos pueden ser genes o segmentos de ADN cuyo producto no se conoce, pero que se transmiten de manera mendeliana y generan patrones polimórficos y monomórficos. Los polimórficos mayormente

identifican diferencias intra poblacionales y los monomórficos diferencian especies o géneros debido a que son zonas altamente conservadas. Se caracterizan por tener una locación cromosómica fija y poder presentar diferentes variantes o alelos que determina su elevado polimorfismo, además se deben identificar de una manera sencilla, rápida y económica. Se han convertido en la herramienta más utilizada para estudios filogenéticos, análisis de variabilidad genética en poblaciones, establecimiento de mapas genómicos, así como el diagnóstico de determinadas enfermedades hereditarias (Klug, 2005).

Son numerosos los marcadores moleculares descritos como: los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) o AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), todos ellos caracterizados por no precisar conocimientos previos del genoma a analizar. En estudios poblacionales los marcadores más utilizados son los microsatélites, por sus características ventajosas, y de más reciente aparición los polimorfismos de un sólo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism o SNPs) (Cortés, 2008).

#### **2.4.1 MARCADORES MICROSATÉLITES**

Los microsatélites, también conocidos como secuencias simples repetidas (SSR) por sus siglas en inglés, o pequeñas repeticiones en tándem (STR), son regiones de ADN no codificante compuestas de pequeños motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem los cuales están ampliamente distribuidos en el genoma de eucariotas y procariotas (Tóth et al., 2000).

En base al tipo de microsatélite se pueden clasificar en tres familias: perfectos, compuesta por una simple repetición de “n” veces de la secuencia base; imperfectos, compuesta entera por una secuencia repetida intercalada entre las repeticiones; y compuestos, constituidos por dos o más tramos de motivos repetidos diferentes (Weber y May 1989).

Entre las ventajas que presentan los microsatélites están: su abundancia y distribución en el genoma, alto nivel de polimorfismo y herencia codominante (Litt et al., 1989), son

comparativamente fáciles de automatizar, con la amplificación múltiple de hasta cinco sitios posibles en una sola reacción de PCR. Además el análisis de los microsátélites por medio de *software* es comparativamente fácil y posible. Todas estas ventajas indican la posibilidad de rastrear la demografía, movimientos, y la estructura social de poblaciones sin necesitar entrar en el contacto directo con los animales (Goldstein et al., 1999).

La desventaja de su utilización está en la necesidad del conocimiento previo de la secuencia para poder analizar el polimorfismo (Frankham et al., 2002). Además de la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para el clonamiento y secuenciamiento de los loci SSR. Por otro lado, limitaciones con menor frecuencia, se darían en el caso que mutaciones, ocurridas en el sitio de apareamiento de los iniciadores, tendrían como resultado alelos nulos (Yañez, 2002).

A partir de la demostración de la existencia de variabilidad genética en estas regiones y la posibilidad de su detección mediante amplificación por PCR (Weber y May, 1989), los microsátélites se han convertido en la principal fuente de marcadores genéticos y están adquiriendo una importancia creciente en los últimos años en estudios sobre análisis de variabilidad genética y relaciones entre especies y razas, controles de paternidad o identificación de muestras (Marklund et al., 1994), estudio de las poblaciones y la posibilidad que presentan de conocer la historia evolutiva de estas especies (Hoelzel, 1998).

Los microsátélites, también se han utilizado para detectar situaciones de “cuello de botella” consanguinidad, migración, filogenia, hibridación entre poblaciones o, tamaño efectivo de las poblaciones, selección asistida por marcadores y la generación de mapas cromosómicos (Darío, 2008).

#### **2.4.2 CEBADOR UNIVERSAL M13**

Diversas metodologías son usadas para determinar los alelos generados por los microsátélites. Por ejemplo, los sistemas de láser automatizados usan fragmentos con marcación fluorescente obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten

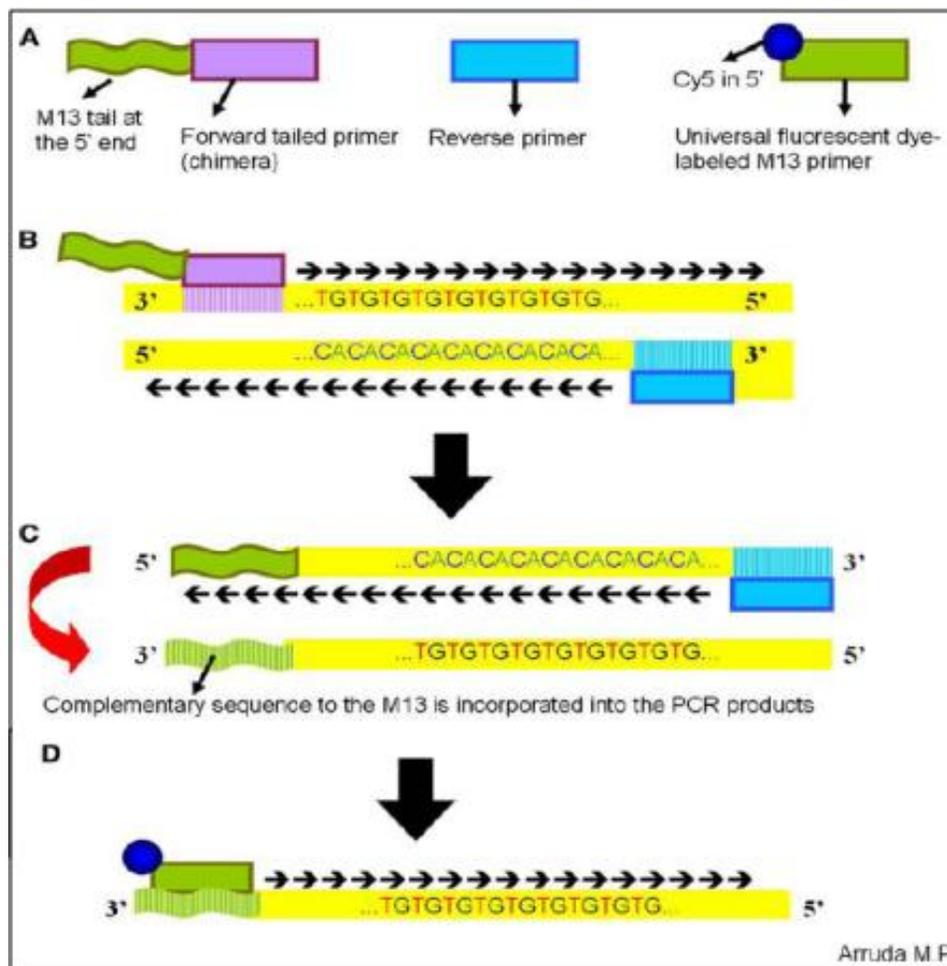
una visualización exitosa de los alelos (Bonin et al., 2004; Hoffman et al., 2005) y la rápida selección de secuencias polimórficas de múltiples loci genómicos. Sin embargo, el costo de producir un nuevo cebador marcado fluorescentemente para cada uno de los miles de loci potencialmente informativos, es un factor limitante para muchos laboratorios, ya que su costo presenta un incremento de entre cinco y diez veces más que los no marcados. Además, tales cebadores son frecuentemente necesarios para genotipar solo unas decenas o cientos de muestras, y son luego almacenados por cantidades variables de tiempo durante los cuales la fluorescencia puede decaer rápidamente (Missiaggia et al., 2006).

Por lo tanto, con el fin de reducir este costo de genotipificación con microsatélites marcados fluorescentemente, Oetting et al., (1995) propusieron una estrategia de PCR llamada multiplex, la cual emplea un cebador *forward* con una extensión adicional de 18 pb en su extremo 5' idéntica a la secuencia del cebador M13 (*TGTAACAACGACGGCCAGT*), un cebador regular *reverse* y un tercer cebador universal M13 marcado con fluorescencia.

El cebador universal M13 es una secuencia derivada de un vector bacterial (David et al., 1993) que no presenta homología con alguna secuencia conocida en la base de datos de los genomas de mamíferos, por lo que reduce la cantidad de amplificaciones inespecíficas que pueden resultar en interpretaciones erróneas de los resultados (Arruda et al., 2010).

La descripción de la técnica se indica en la figura 4 (modificada de Arruda, 2010). El cebador unido a la "cola" M13 provee una secuencia complementaria del cebador universal fluorescente (M13 unido a un fluorescente) desde el tercer ciclo de PCR, generando un producto que puede ser detectado en un secuenciador automático de ADN, el cuál separa las bandas de microsatélites con paneles compuestos de cuatro colores, un color cada uno; donde cada panel permite realizar reacciones de amplificación en múltiplex, ya que en él es posible combinar 4 cebadores o más de un mismo colorante fluorescente optimizando las temperaturas de alineamiento en PCR y los tamaños de los productos de PCR (Neilan, 1997), todas estas combinaciones son evaluadas a través de un único capilar con una separación del tamaño estándar, permitiendo estimados del tamaño de la banda.

Por lo tanto la elección de esta técnica, en vez del marcaje directo de los colorantes con los cebadores, presenta gran cantidad de ventajas: primero los costo se reducen entre 540-720\$ por locus si se usan 6 microsatélites (Schuelke, 2000), evitando la necesidad de usar diversas secuencias para el proceso de marcaje fluorescente. Además, por la considerable reducción en el tiempo, esta técnica es indicada cuando grandes cantidades de datos deben ser analizados en el mismo tiempo (Oblessuc et al., 2009). Sin embargo, aunque la mayoría de estos estudios usan la secuencia M13 como secuencia de cola, cualquier otra secuencia que no tenga una secuencia complementaria en el genoma objetivo bajo estudio podría potencialmente ser usada (Neilan et al., 1997).



**Figura 4.** Procedimiento de amplificación y marcaje del cebador universal M13 (modificado de Arruda *et al.*, 2010).

### 2.4.3 ESTUDIOS MOLECULARES EN LLAMAS

Los estudios moleculares han permitido entre muchas cosas, conocer acerca del origen y biodiversidad de especies y/o poblaciones. Kadwell et al., (2001) realizaron análisis genéticos con ADN mitocondrial (ADNmt) y microsatélites con el fin de elucidar el origen de los CSA domésticos (alpacas y llamas); revelando fuertes similitudes entre la distribución del tamaño de alelos entre alpaca y vicuña, y entre llama y guanaco; afianzando la hipótesis que la alpaca proviene de la vicuña y el guanaco es el ancestro silvestre de la llama. Un análisis posterior de ADNmt (Barreta et al., 2012) confirma estas relaciones filogenéticas; sin embargo, pone de manifiesto que el proceso de domesticación de llamas y alpacas no ha ocurrido en una única población de camélidos salvajes, ni en una sola localización geográfica, sino que presenta un mayor grado de complejidad que el inicialmente descrito.

Diversos estudios han determinado marcadores polimórficos de tipo microsatélite en llamas: Lang et al., (1996), estudiaron 20 llamas y 20 alpacas, obteniendo información para 15 loci microsatélite, mostrando una probabilidad de exclusión de paternidad de 99.996%. Así mismo, Penedo et al., (1999a, b), analizaron 155 llamas, 155 alpacas, y 102 guanacos, obteniendo información para 26 loci microsatélites. Sarno et al., (2000) trabajaron con llamas y guanacos analizando 6 loci microsatélites y reportaron probabilidades de exclusión acumuladas de 0.993 y 0.998 en llama y guanaco, respectivamente, valores que permiten su uso en pruebas de paternidad en ambas especies. Evdotchenko et al., (2003) reportaron 19 loci microsatélite en llama que también pueden ser aplicados en las diferentes especies de la familia Camelidae.

En Argentina, Bustamante et al., (2002), estudiaron la diversidad genética de una población de llamas y dos de guanaco mediante el análisis de 6 loci microsatélite derivados de llama, calcularon parámetros genético poblacionales tales como: tamaño de los alelos, heterocigosidad promedio, equilibrio Hardy-Weinberg y distancias genéticas; demostrando la diferenciación entre llamas y guanacos de Argentina y reportando altos valores de diversidad genética. También aislaron y caracterizaron 5 marcadores microsatélites di nucleótidos polimórficos de llama y 5 de guanaco (Bustamante et al., 2003) y por último analizaron la variabilidad genética de tres poblaciones de llamas del noroeste argentino, afectadas a la producción de fibra, mediante amplificación por PCR de 12 loci microsatélite con cebadores

específicos de llama, observando nuevamente alta variabilidad genética (Bustamante et al., 2006)

En Bolivia, Barreta et al., (2012) utilizaron 42 marcadores microsatélites para analizar la diversidad y estructura genética de 394 llamas distribuidas en 12 grupos regionales; encontrando altos niveles de: polimorfismo, de alelos y de heterocigosidades; y reportaron una débil diferenciación genética entre las poblaciones de llamas estudiadas. Así mismo, este estudio fue el primer trabajo a nivel molecular, que estimó la diferenciación genética entre los fenotipos de llamas Ch'aku y Ccara indicando que esta es muy baja ( $F_{ST} = 0.003$ ).

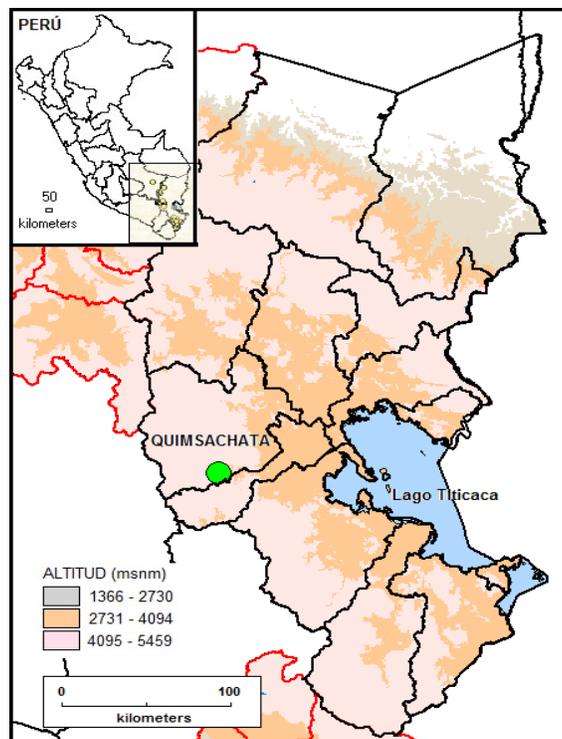
En el Perú, la mayoría de estudios moleculares realizados en camélidos son especialmente en alpacas y vicuñas (Wheeler, 1995; Vallejo et al., 2008) y son escasos aquellos en llamas y en guanacos. Los estudios genéticos en llamas son básicamente limitados al análisis de parámetros cuantitativos de rasgos relacionados con el crecimiento y la fibra (Cristofanelli et al., 2005; Quispe et al., 2009). En el departamento de Junín; se estudió 50 llamas Ccara de fenotipo guanaco de Marcapomacocha, mediante análisis de ADN mitocondrial, revelando que las llamas tenían el haplotipo ancestral guanaco (Cano et al., 2012).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

El plan de trabajo consistió en tres fases: Fase de Campo, Fase de Laboratorio y Fase de Cálculo de Parámetros Genéticos.

#### 3.1 FASE DE CAMPO

Las muestras de sangre de llamas Ch'aku y Ccara fueron tomadas de la estación experimental ILLPA-INIA, anexo Quimsachata, donde se localiza el Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas, a una latitud 15 49' 23" y longitud 70 39' 51", en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa, departamento de Puno. La ubicación está ilustrada usando el *software* DIVA-GIS versión 7.2.1 (Figura 5)



**Figura 5.** Mapa DIVA-GIS del Banco de Germoplasma de Alpacas de Color y Llamas de Quimsachata.

Las muestras de sangre de llamas provinieron de dos rebaños separados geográficamente: Callacallani y Huayatani. Ambos conforman la población total de llamas de tipo Ch'aku y Ccara de Quimsachata. Callacallani está ubicado en la latitud 15° 48' 26" y longitud 70° 39' 34" a una elevación de 4166 m s n m., y presenta solamente llamas machos en ambos fenotipos. Mientras que Huayatani está ubicado en la latitud 15° 49' 23" y longitud 70° 39' 51" a una elevación de 4180 m s n m., y presenta solamente llamas hembras también de ambos fenotipos.

El proceso de colecta de las muestras se describe a continuación:

1. Los animales fueron seleccionados al azar, y de cada uno se colectó 7 ml de sangre periférica a nivel del cuello en tubos Vacutainer con EDTA al 2.5 % (anticoagulante). En total se obtuvieron 251 muestras de sangre de llamas: 92 Ch'aku (67 hembras y 25 machos) y 159 de llamas Ccara (109 hembras y 50 machos).
2. Se tomaron los datos de cada animal elegido: número de arete o código del animal, sexo (macho o hembra), color, fenotipo (Ch'aku o Ccara), se registró el número de foto y observaciones, como se muestra en el Cuadro 1 (Anexo 1).
3. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y alejadas de la luz solar, para evitar la lisis de los glóbulos rojos, hasta su llegada al laboratorio de Biología Molecular y Genómica en la sede central del INIA en Lima, donde fueron refrigeradas a 4°C hasta su uso en la extracción del ADN.

**Cuadro 1.** Ficha de Campo.

<b>Proyecto: "USO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS"</b>							
<b>RESPONSABLES DE LA COLECTA:</b> Eudosio Veli, Claudia Yalta, Gabriela Paredes.					FECHA: 24/08/2011		
<b>REBAÑO:</b> CALLACALLANI/ HUAYATANI			<b>DISTRITO:</b> SANTA LUCÍA	<b>PROVINCIA:</b> LAMPA		<b>REGIÓN:</b> PUNO	
<b>LATITUD:</b> _____			<b>LONGITUD:</b> _____		<b>ALTURA:</b> _____		
<b>N°</b>	<b>CÓDIGO MUESTRA LABORATORIO</b>	<b>NÚMERO DE ARETE</b>	<b>SEXO</b>	<b>COLOR</b>	<b>FENOTIPO</b>	<b>N° FOTO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>

## **3.2 FASE DE LABORATORIO**

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

### **3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE SANGRE**

El procedimiento de extracción de ADN a partir de las muestras de sangre de llamas Ch'aku y Ccara (Figura 6), se llevó a cabo mediante el protocolo establecido por Sambrook y Russell (2001), este fue modificado por el laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA. Para cada muestra se realizó lo siguiente:

#### a) Aislamiento de glóbulos blancos

1. El aislamiento de los glóbulos blancos se logró mediante lavados repetitivos y centrifugados con la solución de lisis Buffer Tris EDTA 20:5 v/v, (pH 8,0). Este proceso se repite hasta que el pellet este limpio.
2. El pellet de glóbulos blancos se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se realice el protocolo de aislamiento de ADN.

#### b) Lisis de glóbulos blancos

1. Se añadió 750  $\mu\text{L}$  de Buffer TE 20:5 a los glóbulos blancos aislados. Se agitó hasta disolver el pellet.
2. Se añadió 50  $\mu\text{L}$  de detergente SDS al 10% y 12  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K, se mezcló suavemente por inversión para homogenizar, y luego se incubó en el Termobloque a  $56^{\circ}\text{C}$  por 3 horas.
3. Pasada las 3 h, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de acetato de K 3M, se refrigeró por 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

4. Se centrifugó por 20 minutos a 14000rpm. El sobrenadante se separó en dos tubos que contenían isopropanol. Se invirtió suavemente para visualizar el pellet. Se centrifugó por 7 minutos a 14000rpm, y se eliminó el sobrenadante.
5. Se añadió 200  $\mu$ L de etanol helado y las muestras fueron guardadas toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### c) Extracción orgánica

1. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 14000rpm y el sobrenadante fue descartado.
2. Se añadió 300  $\mu$ L de buffer TE 20:5 y 400  $\mu$ L de la mezcla de solventes orgánicos cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. La mezcla se agitó y centrifugó por 15 minutos a 14000rpm.
3. Se generan tres fases, de las cuales se recuperó solamente la fase superior que contiene el ADN resuspendido. Este sobrenadante fue trasladado a otro tubo de micro centrífuga de 1.5ml.

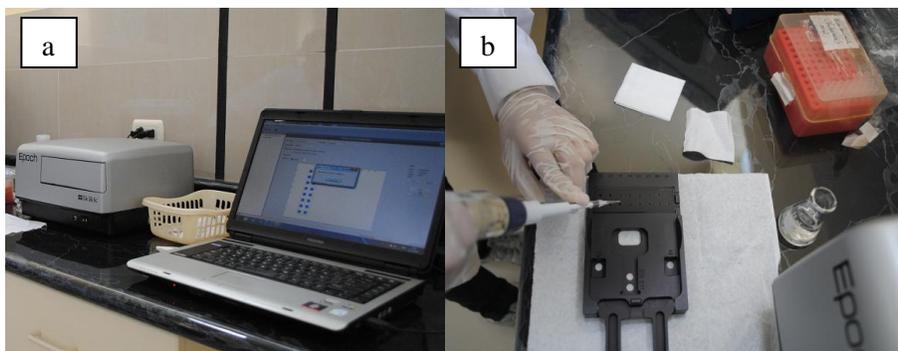
#### d) Precipitación y lavado del ADN

1. Se agregó 200  $\mu$ L de acetato de K 3M y luego 800  $\mu$ L de etanol absoluto, los tubos se invierten suavemente para luego ser refrigerados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
2. Luego se centrifugan por 5 minutos a 14000 rpm, el sobrenadante es eliminado y se debe tener cuidado de no botar el pellet.
3. Se añadió 200  $\mu$ L de buffer TE 20:5, 8  $\mu$ L de NaCl 5M y 415  $\mu$ L de etanol absoluto. Se mezcló suavemente por inversión.
4. Se centrifugó por 5 minutos a 14000rpm y se eliminó el sobrenadante, luego se agregó 300  $\mu$ L de etanol al 70% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), nuevamente se mezclan, centrifugan y el sobrenadante se elimina. Se agregó 200  $\mu$ L de etanol absoluto, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar a  $T^{\circ}$  ambiente.

- Finalmente, el precipitado se resuspendió en Buffer TE 10:1 (Tris-HCl 10Mm, EDTA 1.0Mm, pH 8.0).

### 3.2.2 CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

La cuantificación del ADN extraído se realizó por medio del equipo Epoch (Figura 6), de donde se obtiene la concentración de ADN expresada en ng/ $\mu$ l y la pureza del mismo por medio de la relación de absorbancia a 260nm sobre 280nm (260/280), dicha relación debe estar en un rango de 1.8-2.0 la cual indica que el ADN tiene una óptima calidad. El procedimiento consiste en adicionar, de cada muestra, 2  $\mu$ l del ADN extraído a la placa del equipo, el cual permite la lectura de 15 muestras por placa y un blanco (buffer TE 10:1) para la calibración del equipo.



**Figura 6.** a). Equipo Epoch para cuantificar ADN; b). Cargado de muestras para cuantificación.

Luego de la cuantificación del ADN stock y de las diluciones (Anexo 2 y 3 respectivamente), se rectificó la calidad del ADN mediante electroforesis con geles de agarosa, usando 0.4g de agarosa con 40mL de buffer TE10X (Tris base, ácido bórico, EDTA 0.5M pH 8.0 y agua mili Q). A cada pocillo del gel se agrega una mezcla de 6  $\mu$ l de buffer de carga Sal B (colorante azul de bromofenol, xilencianol, naranja G, sucrosa y agua mili Q) y 2  $\mu$ l de ADN. De la misma manera se preparó el marcador de peso molecular, agregando en un tubo Eppendorf 3  $\mu$ l de tampón de carga y 5  $\mu$ l del marcador 100 pb ADN Ladder (Invitrogen). La corrida electroforética fue a 100 voltios por 20 minutos.

### 3.2.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN MICROSATÉLITE

Se utilizó un panel de trece marcadores microsatélites específicos de llamas y alpacas, elegidos por presentar alto contenido de información polimórfica (PIC), elevada heterocigosidad y diversidad genética en los estudios originales. El nombre de cada cebador seleccionado y sus características respectivas están detalladas en el Cuadro 2.

La obtención de los fragmentos deseados de ADN, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual replica de manera exponencial un segmento específico de ADN con el uso de una enzima termo-estable, Taq polimerasa (Mullis, 1990). Las muestras de ADN fueron amplificadas, con 13 marcadores microsatélite reportados internacionales y específicos para CSA; estos fueron elegidos por su alto valor de polimorfismo (PIC). El cebador *forward* presentó una secuencia adicional en su extremo 5' de 19 pb, que pertenece al cebador M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC), mientras que el *reverse* permaneció inalterado; asimismo se utilizó el cebador M13 marcado con fluoró cromos: FAM, HEX y NED.

Para la optimización de la PCR se seleccionaron al azar 8 muestras de ADN de sangre. Primero los microsatélites fueron amplificados por separado y luego se analizó cuáles de ellos podrían ser amplificados en una sola reacción (multiplex PCR) de acuerdo a su tamaño (pb), a su temperatura de alineamiento y a su concentración de MgCl<sub>2</sub>. La reacción de PCR se realizó en un Termociclador Eppendorf (modelo Mastercycler). Las combinaciones de los 13 microsatélites en reacciones en multiplex y simplex se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Los cebadores y la secuencia M13, usados para amplificar regiones microsatélite en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.

MICROSATELITE	Secuencia del cebador (5'->3')	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de Alineamiento (°C)	Referencias
Cebador M13	CACGACGTTGTAAAACGAC	18	--	Packer et al., 2004
GLM4 F	M13-TGAAGGAATGCAGATGAGAAGC	181-205	58	Bustamante et al., 2003
R	TAGCTACAAACTTCCATGACAC			
LAB1 F	M13-AGAGGATCAATCCCTCTGAGAT	161-189	58	Bustamante et al., 2003
R	ATTAGAGGCCAGTATAACAATC			
LCA54 F	M13-CACGTATACTTAAGAAGGG	147-157	58	Penedo et al., 1999a
R	CTGCAAGTTCGGAGAGAAA			
LCA65 F	M13-TTTTTCCCTGTGGTTGAAT	165-191	58	Penedo et al., 1999a
R	AACCTCAGCTGTTGTCAGGGG			
LCA77 F	M13TGTTGACTAGAGCCTTTTCTTCTTT	233-263	58	Penedo et al., 1999a
R	GGGCAAGAGAGACTGACTGG			
LCA82 F	M13-CGTGACACCAGGCTAAGTGA	108-124	58	Penedo et al., 1999b
R	TTTCAGATGGTAGCTTTAAAAAATT			
LCA83 F	M13-A TTCACCTTGCAGTTCCTGG	191-221	58	Penedo et al., 1999b
R	GACTCCAAGCAGGACGAGAC			
LCA85 F	M13-CACGTATACAGACCAGAGAAGGG	194-210	58	Penedo et al., 1999b
R	CTGCAAGGGATTACGGAGAA			
LGU76 F	M13-TTCCTTCCATTGAAGCAGGT	233-261	58	Sarno et al., 2000
R	TGAGATGCACTGCTTTGGATA			
YWLL08 F	M13-ATCAAGTTTGAGGTGCTTTCC	126-188	58	Lang et al., 1996
R	CCATGGCATTGTGTTGAAGAC			
YWLL44 F	M13-CTCAACAATGCTAGACCTTGG	81-130	58	Lang et al., 1996
R	GAGAACACAGGCTGGTGAATA			
YWLL59 F	M13-TGTGCAGGAGTTAGGTGTA	96-136	58	Lang et al., 1996
R	CCATGTCTCTGAAGCTCTGGA			
VOLP03 F	M13-AGACGGTTGGGAAGGTGGTA	129-169	56	Obreque et al., 1998
R	CGACAGCAAGGCACAGGA			

**Cuadro 3.** Combinaciones para reacciones en multiplex y simplex en PCR, rango (pb), marcaje y temperatura óptima de los microsatélites.

Multiplex (M) Simplex (S)	MICROSATÉLITE	Rango (pb)	Fluorescencia	Temperatura óptima de alineamiento
M1	LCA82	108-124	FAM	58°C
	GLM4	147-157		58°C
	LCA54	181-205		58°C
	LGU76	233-261		58°C
S1	YWLL44	81-130	HEX	58°C
M2	YWLL59	96-136	NED	58°C
	LAB1	161-189		58°C
M3	YWLL08	126-188	FAM	58°C
	LCA85	194-210		58°C
	LCA77	233-263		58°C
M4	LCA65	165-191	HEX	58°C
	LCA83	191-221		58°C
S2	VOLP03	129-169	NED	56°C

Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo en reacciones de 10µL, el cual contenía 50ng de ADN. En los cuadros 4 y 5 se muestran las condiciones de la mezcla de amplificación de los cebadores. Las condiciones de PCR fueron: 95°C (5min), luego 35 ciclos a 95°C (30s)/ 58°C o 56°C (1'30s)/ 72°C (1'), seguido por una extensión final a 72°C por 30 minutos y luego a 4°C (∞).

**Cuadro 4.** Condiciones de Mezcla de amplificación del Grupo I (M1, S1 y M2).

<b>MULTIPLEX 1.</b> Cebadores: LCA82, GLM4, Lgu 76, LCA54			
Reactivos	[ ] Stock	[ ] Final	1 Rx
H2O			5.2525
Buffer	10X	1X	1
dNTPs	2.5mM	0.2mM	0.8
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2.5mM	0.5
LCA 82 F	20uM	0.025uM	0.0125
LCA 82 R	20uM	0.05uM	0.025
GLM 4 F	20uM	0.02uM	0.0125
GLM 4 R	20uM	0.04uM	0.025
Lgu 76 F	20uM	0.02uM	0.0125
Lgu 76 R	20uM	0.04uM	0.025
LCA54 F	20uM	0.1uM	0.05
LCA54 R	20uM	0.2uM	0.1
M13-FAM	20uM	0.2uM	0.1
Taq Pol	5U/ml	0.25U/ml	0.1
ADN	35ng/UI	50ng	2
Vol. Final			10

<b>SIMPLEX 1.</b> Cebadores: YWLL44			
Reactivos	[ ] Stock	[ ] Final	1 Rx
H2O			5.52
Buffer	10X	1X	1
dNTPs	2.5mM	0.2mM	0.8
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2.5mM	0.5
YWLL44F	20uM	0.02uM	0.01
YWLL44R	20uM	0.04uM	0.02
M13-HEX	20uM	0.1uM	0.05
Taq Pol	5U/ml	0.25U/ml	0.1
ADN	35ng/UI	50ng	2
Vol. Final			10

<b>MULTIPLEX 2.</b> Cebadores: YWLL59, LAB1			
Reactivos	[ ] Stock	[ ] Final	1 Rx
H2O			5
Buffer	10X	1X	1
dNTPs	2.5mM	0.2mM	0.8
MgCl2	50mM	2.5mM	0.5
YWLL59F	20uM	0.1uM	0.05
YWLL59R	20uM	0.2uM	0.1
LAB1F	20uM	0.1uM	0.05
LAB1R	20uM	0.2uM	0.1
M13-NED	20uM	0.2uM	0.1
Taq Pol	5U/ml	0.25U/ml	0.3
ADN	35ng/UI	50ng	2
Vol. Final			10

**Cuadro 5.** Condiciones de Mezcla de amplificación del Grupo II (M3, M4 y S2)

<b>MULTIPLEX 3.</b> Cebadores: YWLL08, LCA85, LCA77			
Reactivos	[ ] Stock	[ ] Final	1 Rx
H2O			5.41
Buffer	10X	1X	1
dNTPs	2.5mM	0.2mM	0.8
MgCl2	50mM	3.0mM	0.6
YWLL08 F	20uM	0.02uM	0.01
YWLL08 R	20uM	0.04uM	0.02
LCA85 4 F	20uM	0.02uM	0.01
LCA85 R	20uM	0.04uM	0.02
LCA77 F	20uM	0.02uM	0.01
LCA77 R	20uM	0.04uM	0.02
M13-FAM	20uM	0.2uM	0.1
Taq Pol	5U/ml	0.25U/ml	0.1
ADN	35ng/UI	50ng	2
Vol. Final			10

---

**MULTIPLEX 4.** Cebadores: LCA65, LCA83

---

Reactivos	[ ] Stock	[ ] Final	1 Rx
H2O			5.44
Buffer	10X	1X	1
dNTPs	2.5mM	0.2mM	0.8
MgCl2	50mM	3.0mM	0.6
LCA65F	20uM	0.02uM	0.01
LCA65R	20uM	0.04uM	0.02
LCA83F	20uM	0.02uM	0.01
LCA83R	20uM	0.04uM	0.02
M13- <b>HEX</b>	20uM	0.2uM	0.1
Taq Pol	5U/ml	0.25U/ml	0.1
ADN	35ng/Ul	50ng	2
Vol. Final			10

---

---

**SIMPLEX 2.** Cebador: VOLP03

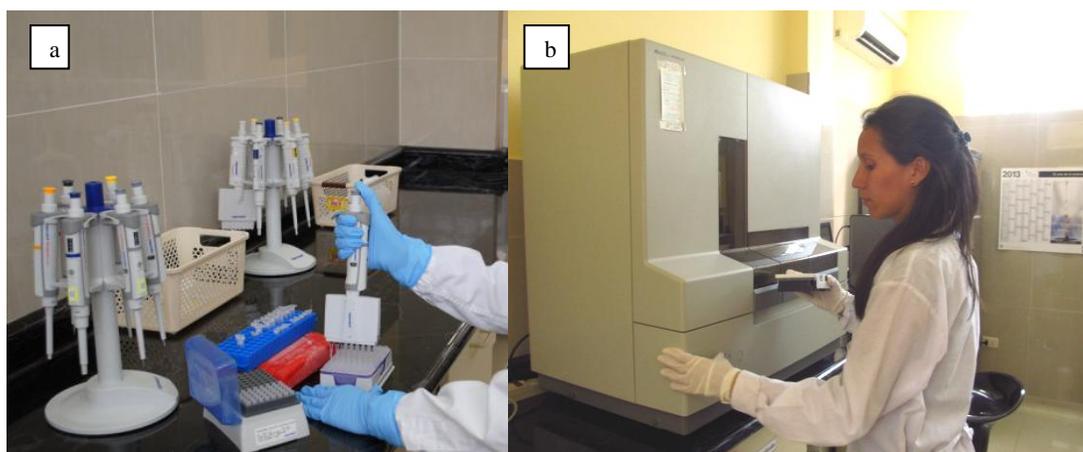
---

Reactivos	[ ] Stock	[ ] Final	1 Rx
H2O			5.37
Buffer	10X	1X	1.1
dNTPs	2.5mM	0.2mM	0.88
MgCl2	50mM	1.5mM	0.33
VOLP03F	20uM	0.02uM	0.055
VOLP03R	20uM	0.04uM	0.11
M13- <b>NED</b>	20uM	0.2uM	0.055
Taq Pol	5U/ml	0.25U/ml	0.1
ADN	35ng/Ul	50ng	3
Vol. Final			10

---

### 3.2.4 USO DEL ANALIZADOR GENÉTICO PARA ELECTROFORÉISIS CAPILAR

Una vez obtenidos todos los productos amplificados se realizó una electroforesis capilar en un secuenciador automático *ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer® (Applied Biosystem)* (Figura 7). Para ello, previamente se determinó dos paneles o grupos de marcadores: GI (7 marcadores SSR) y GII (6 marcadores SSR), en función de la combinación de los fluoró cromos: FAM (azul), HEX (verde) y NED (amarillo) (Cuadro 6), estos grupos corrieron por separado en el Analizador Genético. Cada panel está compuesto de tres colores lo que permite ordenar los marcadores de acuerdo al tamaño del fragmento para evitar solapamiento de las bandas al analizarlos con el secuenciador.



**Figura 7.** a). Preparación de muestras para electroforesis capilar; b). Cargado de placa de en el Analizador Genético ABI 3130XL.

Para el proceso de detección de las muestras en el *ABI 3130XL* se utilizó placas de 96 pozos donde se combinaron 2 $\mu$ L de cada producto amplificado (multiplex o simplex) con 9.7 $\mu$ L de Formamida doblemente desionizada (Hi-Di) y 0.3 $\mu$ L del marcador estándar de tamaño ROX (*Applied Biosystems*), para un volumen final de 16  $\mu$ l por reacción de cada grupo.

La muestra en la placa se desnaturalizó a 94°C durante tres minutos y luego colocadas a -20°C por 3 minutos, para que finalmente fuese leída por capilaridad, donde la exposición de los fragmentos a un láser provoca la emisión de fluorescencia que es captada por una cámara

digital transformando la imagen en picos de fluorescencia y analizados con el *software* GeneMapper v.3.7.

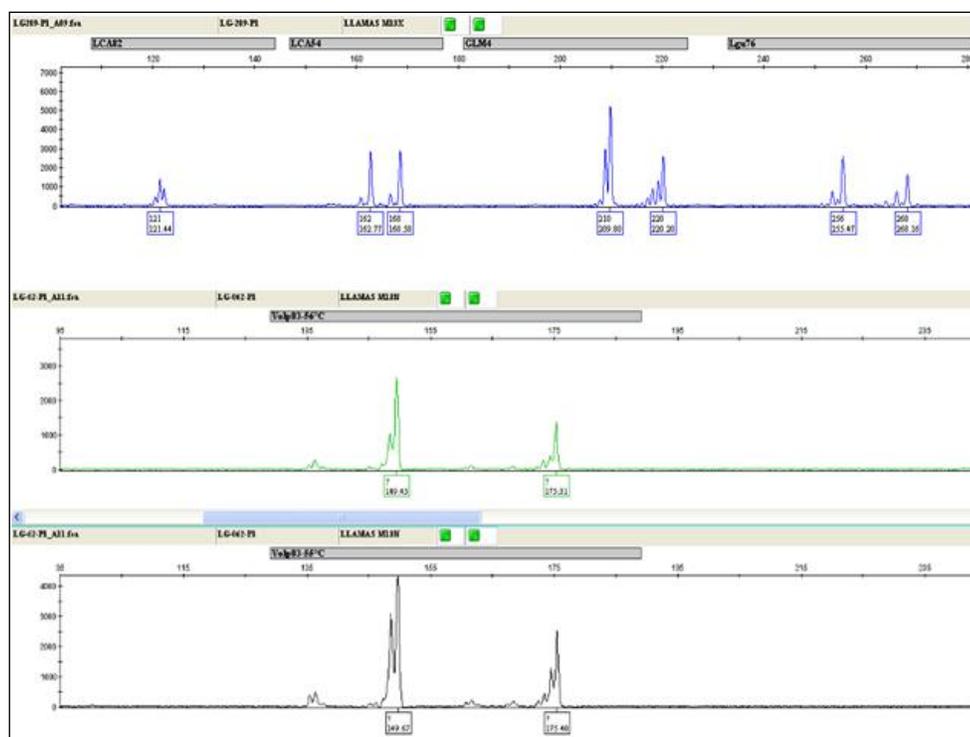
El medio de electroforesis fue el polímero: Performance Optimized Polymer 7 (POP-7) (*Applied Biosystems*), compuesto por dimetilacrilamida, urea 8M, 2-pirrolidinona al 5% y EDTA 1Mm, que establece un entorno altamente desnaturalizante para las muestras de ADN a temperatura de 60°C a la que se llevó a cabo la electroforesis.

**Cuadro 6.** Grupos asignados para el Analizador Genético según su fluorescencia y volumen usado en el Analizador de cada reacción Multiplex (M) y/o simplex (S).

Grupo en el Analizador Genético	Multiplex(M)/ Simplex (S)	Marcador	Fluorescencia	Volumen de carga (µL)
GI	M1	LCA82	FAM	2
		GLM4		
		LCA54		
		LGU76		
	S1	YWLL44	HEX	2
	M2	YWLL59	NED	2
LAB1				
GII	M3	YWLL08	FAM	2
		LCA85		
		LCA77		
	M4	LCA65	HEX	2
		LCA83		
	S2	VOLP03	NED	2

### 3.2.5 ANÁLISIS DE DATOS

La visualización de los picos obtenidos a partir de los marcadores microsatélites marcados con el cebador M13 fluorescente, el análisis de los fragmentos y la obtención de la información del tamaño de los alelos estudiados en pares de bases, fue llevado a cabo mediante el *software* GeneMapper v 4.0 (*Applied Biosystems*) (Figura 8) el cuál muestra picos del color correspondiente a cada uno de los marcadores: azul (FAM), verde (HEX) y amarillo (NED) que se observa de color negro para una mejor definición. El *software* GeneMapper determina el tamaño de los fragmentos generados en la PCR comparando los picos de fluorescencia generados con el estándar de tamaño ROX. La altura de cada pico es proporcional a la cantidad de fluorescencia detectada, que en cierto modo, reflejaba la cantidad del fragmento de ADN presente en la electroforésis. Para evitar errores de genotipado las muestras fueron repetidas. Después, el *software* GeneMapper permite descargar los datos de los alelos para cada genotipo en cada uno de los loci, organizándose en un archivo Excel Microsoft® office.



**Figura 8.** Electroferograma de los marcadores amplificados.

### 3.3 FASE DE ANÁLISIS DE PARÁMETROS GENÉTICOS POBLACIONALES

#### 3.3.1 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD ALÉLICA

A partir de los datos obtenidos de la genotipificación con el programa GeneMapper 4.0, se realizó el análisis de la diversidad alélica utilizando los programas estadísticos Cervus 3.0.3 (Marshall et al., 1998), Genepop 4.0.11 (Raymond y Rousset 1995) y Genetix 4.0.5 (Belkhir et al., 2003). Se calculó los parámetros estadísticos más empleados para cuantificar la variabilidad genética para los 13 marcadores microsatélites: número de individuos analizados, número de alelos encontrados por locus y sus frecuencias alélicas, número medio de alelos por locus, heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y contenido de información polimórfico (PIC) (Aranguren et al., 2001).

##### a. Frecuencias alélicas

Para el cálculo de las frecuencias alélicas de cada locus se ha utilizado el programa Cervus 3.0.3. Esta se refiere a la proporción de un determinado alelo en relación al total de alelos de la población. El cálculo de las frecuencias se hace por recuento directo de los alelos frecuentes, asumiendo que la observación de un solo alelo se corresponde con la condición de homocigosis (Estévez 2009).

##### b. Heterocigosidad esperada

La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura 1970) y es un indicador del nivel de información del locus. Por debajo de 0,5 esta se considera insuficiente (Fendri, 2008). Se calculó a partir de la frecuencia de cada uno de los alelos asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1978) que establece que la composición genética de una población natural permanece en equilibrio mientras no actúen la selección natural, ni ningún otro factor como la mutación o la deriva, con la siguiente fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Donde:  $x_i$ : frecuencia del alelo  $i$  y  $k$ : número de alelos

### **c. Heterocigosidad observada**

La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) es la proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional. Si se calcula a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los loci se denomina heterocigosidad media observada (Cruz, 2003).

### **d. Contenido de información polimórfica**

El Contenido de Información Polimórfica (PIC) fue calculado a partir del número de alelos y las frecuencias alélicas mediante el programa Cervus 3.0.3, según (Botstein et al., 1980). El PIC representa las posibles combinaciones entre los distintos alelos obtenidos y un índice de la capacidad informativa de cada uno de los microsatélites (Fendri, 2008). Los marcadores con valores de PIC superiores a 0.5 se consideran muy informativos, los que tienen valores entre 0.25 y 0.5 medianamente informativos y los que muestran valores inferiores a 0.25 poco informativos (Botstein et al., 1980).

## **3.3.2 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG**

En una población infinita donde los cruzamientos se producen de manera aleatoria en ausencia de mutación, migración y selección, las frecuencias alélicas y genotípicas no varían de generación en generación. Las poblaciones se encuentran en esta situación se dicen que están en equilibrio Hardy-Weinberg (Hardy, 1908).

Se realizó un análisis de la desviación con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg ya sea por exceso ó déficit de heterocigotos y homocigotos en la población total y dentro de cada población. Para llevar a cabo este análisis se obtuvieron dos estadísticos:  $F_{is}$  de Weir y Cockerham (1984) y los estadísticos  $F_{is}$  de Robertson y Hill (1984), mediante el programa Genepop 4.0.11 la prueba del  $F_{is}$  sobre 5000 permutaciones para todos los loci utilizados en las poblaciones.

En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en los loci estudiados. Puesto a que, cualquier desviación significativa indicará que la población está subdividida, que existe una consanguinidad

significativa o que existe un flujo de genes de otra población. Las desviaciones del equilibrio HW pueden producirse debido a varios factores (Darío, 2008):

- a. Los apareamientos no se producen al azar.
- b. Coancestros, antepasados comunes.
- c. Selección natural (ventaja de los heterocigotos).
- d. Migración o flujo de genes desde una población externa.
- e. Diferencias sexo-específicas en las frecuencias alélicas.
- f. Técnica de muestreo incorrecta.
- g. Presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente.

### **3.3.3 ALELOS NULOS**

La frecuencia de los alelos nulos es una de las principales causas de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Pemberton et al., 1995). Su presencia puede deberse a que uno o ambos sitios de unión de los iniciadores han sufrido mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de fragmentos de ADN, lo que impide la amplificación; para confirmar que se trata de alelos nulos la estrategia sugerida es el diseño de nuevos iniciadores que reconozcan secuencias alternativas cercanas al microsatélite (Callen y Thompson, 1993). Esto produce errores en el genotipado de los individuos al considerar individuos homocigotos como heterocigotos, lo que altera los análisis posteriores que se realicen.

La frecuencia de alelos nulos ( $F_0$ ) es un indicador importante de la garantía de los resultados del análisis de microsatélites, sobre todo en estudios genéticos de una población y fue calculada mediante el programa Cervus 3.0.3. Cuando la heterocigosidad esperada es inferior o igual a la heterocigosidad observada, la frecuencia de alelos nulos es entonces negativa o cero. En este caso, se puede concluir que el análisis realizado refleja realmente la variabilidad de la población, en caso contrario la presencia de alelos nulos disminuye la heterocigosidad esperada y en consecuencia resulta en una sobreestimación del nivel de homocigosidad. De esta forma, al observar un individuo homocigoto no se sabe si es homocigoto realmente o si se trata de heterocigoto para un alelo nulo (Fendri, 2008).

### 3.3.4 DIVERSIDAD GENÉTICA DE NEI

Utilizando el programa Fstat v 2.9.3.2 (Goudet 1995), se calculó la diversidad genética de Nei para cada una de las poblaciones utilizando los 13 marcadores microsatélites analizados. La diversidad genética de Nei (1973), generalmente se obtiene a partir de  $\zeta = 1 - \sum p_i^2$  donde,  $\zeta$  es la heterocigosidad esperada, y  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ th alelo de un locus en una población y  $x_i$  es la frecuencia alélica correspondiente de la muestra extraída de la población (Vallejo, 2008).

Sin embargo, este procedimiento sería el más adecuado si la muestra poblacional fuera realmente grande. Debido a esto, el análisis utilizado es el de Nei (1978) ya que mide los niveles de diversidad genética por medio de un procedimiento insesgado a partir de la heterocigosidad esperada el cual permite hacer análisis de muestras que no presentan un gran tamaño:

$$h = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

Donde  $n$  es el número de individuos de la muestra y  $x$  es la frecuencia del alelo  $i$  en dicha muestra. De acuerdo a esto, se obtuvo la heterocigosidad genética insesgada de la población:

$$\hat{H} = \sum h_k / r$$

Donde  $h_k$  es el valor de  $h$  para el  $k$ th locus y  $r$  son los loci analizados en la población.

### 3.3.5 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES

#### a. Estadísticos F de Wright

Los índices de fijación de Wright (1978):  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  permiten conocer la estructura poblacional tanto en situaciones en las que exista selección como en aquellas en que no haya porque los términos se encuentran definidos por las frecuencias alélicas y genotípicas de la población en un momento concreto (Nei, 1973). Los estadísticos de diferenciación poblacional fueron obtenidos por medio del programa Fstat v 2.9.3.2.

- **$F_{IS}$** : Índice que mide la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en las subpoblaciones respecto a las esperadas considerando equilibrio HW.
- **$F_{ST}$** : Índice que mide el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones, su interpretación es sencilla: si es de 0, indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, no ha habido diferenciación. El máximo posible es de 1, cuando cada población está fija en alelos diferentes (Piñero, 2008). Wright (1978) sugirió unas pautas generales para la interpretación del  $F_{ST}$ , de acuerdo con las cuales:

$0 \leq F_{ST} < 0.05$  indicaría poca diferenciación genética.

$0.05 \leq F_{ST} < 0.15$  indicaría una diferenciación moderada.

$0.15 \leq F_{ST} < 0.25$  indicaría una gran diferenciación.

$0.25 \leq F_{ST}$  indicaría una diferenciación muy grande.

- **$F_{IT}$** : coeficiente de endogamia, mide el déficit de heterocigosidad global y la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total con respecto a las esperadas considerando el equilibrio HW.

## **b. Análisis de varianza molecular**

La variabilidad genética total se debe a la contribución de diferentes fuentes, el análisis de varianza molecular (AMOVA) nos permite cuantificar de qué manera cada una contribuye a la variabilidad total (Cortes, 2008). Se analizó la varianza molecular entre individuos, entre poblaciones y dentro de las poblaciones utilizando el programa Arlequín 3.1 (Excoffier et al., 2005).

Los componentes de varianza ( $\sigma_i^2$ ) son utilizados para calcular los índices de fijación, análogos a los estadísticos F definidos originalmente por Wright (1965), que reflejan la correlación de la diversidad a diferente niveles jerárquicos de división (Slatkin, 1995). La varianza molecular total ( $\sigma^2$ ) es la suma de los componentes de varianza debido a diferencias entre haplotipos dentro de una población ( $\sigma_c^2$ ), el componente de varianza debidos a diferencias entre haplotipos en diferentes poblaciones dentro de un grupo ( $\sigma_b^2$ ) y el componente de varianza debido a diferencias entre los haplotipos de los diferentes grupos ( $\sigma_a^2$ ) (Cortes, 2008).

## **c. Análisis de la estructura de población**

La estructura genética de la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata fue analizada mediante el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Con este programa se hace un análisis de agrupamiento de los individuos estudiados en un diferente número de clusters (K) que representarían el número de poblaciones asumidas utilizando un modelo de mezcla en el cual cada individuo podría contener en su genoma porcentajes variables de las poblaciones ancestrales de las que proviene (Estévez, 2009).

Formalmente, el método consiste en utilizar la información molecular de los individuos analizados. Se espera que individuos de una misma raza o población tengan una composición similar de su genoma en cuanto a proporción de origen en los distintos clusters. El programa permite obtener una representación grafica de estas composiciones, de forma que se puedan apreciar parecidos o diferencias entre individuos dentro de una misma población o entre distintas poblaciones (Cortes, 2008).

### 3.3.6 FLUJO GÉNICO

El flujo génico o migración se refiere a todos los mecanismos que resultan en el movimiento de genes de una población a otra. Es un importante componente de la estructura poblacional, ya que sus patrones y niveles determinan hasta qué grado cada población de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin 1995). Una medida que resulta fácil de calcular y conceptualmente útil es el Número de Migrantes ( $Nm$ ). Si  $Nm$  es mayor que 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si  $Nm$  es menor que 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones, y si es mayor de 4 entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica (Piñero, 2008).

### 3.3.7 ANÁLISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIA

Genetix v 4.05 cuenta con una herramienta que permite establecer un análisis factorial de correspondencias (AFC). Este procedimiento describe la asociación de variables cualitativas, en la que cada individuo está representado sólo una vez por el valor de cada modalidad (*locus*) y variable (alelos para cada *locus*).

En este caso, los individuos analizados vienen de poblaciones y están representados por los valores propios de sus frecuencias alélicas; los valores de inercia en cada eje pueden ser interpretados como combinaciones lineales de los valores  $F_{ST}$  (varianza de frecuencias alélicas entre poblaciones).

Los resultados son mostrados como gráficas bidimensionales o tridimensionales en las que los individuos se ven como nubes de puntos en el hiperespacio, que tiene tantas dimensiones como modalidades (alelos) haya en todas las variables (alelos en los diferentes loci) y la relación que guarda con respecto a los demás individuos está en función de la distancia que existe entre ellos (Belkhir et al., 2003).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **4.1 FASE DE ANÁLISIS DE PARÁMETROS GENÉTICOS POBLACIONALES**

Se ha realizado la caracterización genética de las llamas Ch'aku y Ccara del Banco de Germoplasma de Alpacas color y Llamas del ILLPA- INIA anexo Quimsachata, mediante los resultados del análisis de trece marcadores microsatélites con la metodología del cebador universal M13, en una muestra de 251 animales. Esta metodología ha permitido visualizar un tamaño preciso de los alelos y es una buena herramienta para la genotipificación y el análisis de la diversidad genética. Además es más económica comparando con la metodología de cebadores marcados directamente con fluorescencia.

El análisis de diversidad alélica realizado con el programa Cervus 3.0.3 y corroborado con los programas Genepop 4.0.11 y Genetix 4.0.5, mostró que el número de alelos por locus fue similar en ambas poblaciones. Se observó un total 157 alelos diferentes en los 13 loci tipificados y un promedio de 12.08 alelos por locus, lo que representa una diversidad alélica elevada. Los marcadores LCA54, LCA83 y LCA85 (Penedo et al., 1999a, b) presentaron el menor número de alelos: 8. Mientras que los marcadores YWLL08 y YWLL59 (Lang et al. 1998) presentaron el mayor número de alelos: 19. Se observó 137 alelos en la población de llamas Ch'aku y 142 alelos en la población de llamas Ccara (Cuadro 7).

En la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata, se encontró alelos no reportados anteriormente. Por ejemplo, Lang et al., (1996), identificaron en los marcadores YWLL08, YWLL44 y YWLL59: 13, 11 y 10 alelos respectivamente; mientras que en el presente estudio se encontró 19, 17 y 19 alelos respectivamente. Así mismo, Penedo et al., (1999a, b), encontraron en los marcadores LCA82 y LCA83: 5 y 7 alelos respectivamente.

Sin embargo para los marcadores LCA65 y LCA77 reportaron 14 y 15 alelos respectivamente, más de lo reportado en el presente estudio. Al igual que Penedo, el marcador LCA85 reportó 8 alelos en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.

Sarno (2000) identificó 8 alelos en el marcador Lgu76, pero en el presente estudio se encontró 15. En Argentina, Bustamante et al., (2006) encontraron en total en tres poblaciones de llamas, 10 alelos para el marcador LCA77 y 9 alelos para LCA65. En cuanto a los marcadores LAB1 y GLM4, reportaron 9 alelos para cada marcador.

Barreta et al., (2012), analizaron 394 llamas con 42 marcadores microsatélites entre ellos los marcadores microsatélite: LCA77, LCA83, LCA85, YWLL08 y YWLL44 con una cantidad en el número de alelos de: 12, 11, 10, 28 y 20 alelos respectivamente.

**Cuadro 7.** Número de alelos por locus en cada población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.

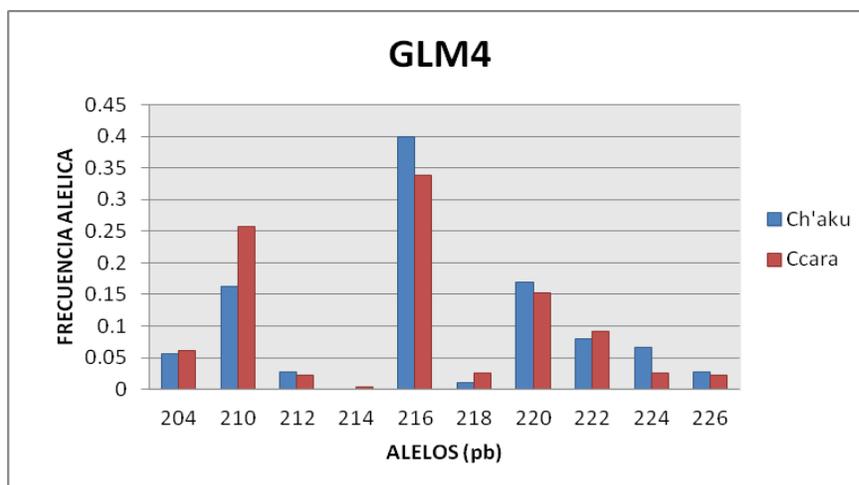
Locus	N	POBLACIÓN		A
		CH'AKU	CCARA	
GLM4	246	9	10	10
LAB1	245	13	13	14
LCA54	247	4	8	8
LCA65	236	8	8	9
LCA77	241	8	10	11
LCA82	246	9	7	9
LCA83	237	8	7	8
LCA85	240	8	7	8
LGU76	246	14	14	15
YWLL08	239	17	17	19
YWLL44	225	15	16	17
YWLL59	246	15	17	19
VOLP03	227	9	8	10
Media	240.077	10.54	10.92	12.08
TOTAL	251	137	142	157

#### 4.1.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS

Los siguientes histogramas representan las frecuencias alélicas de cada alelo de los 13 loci microsatélites estudiados, por población. Mediante el programa Cervus 3.0.3 se calculó el porcentaje de homocigotos de cada población.

##### GLM4

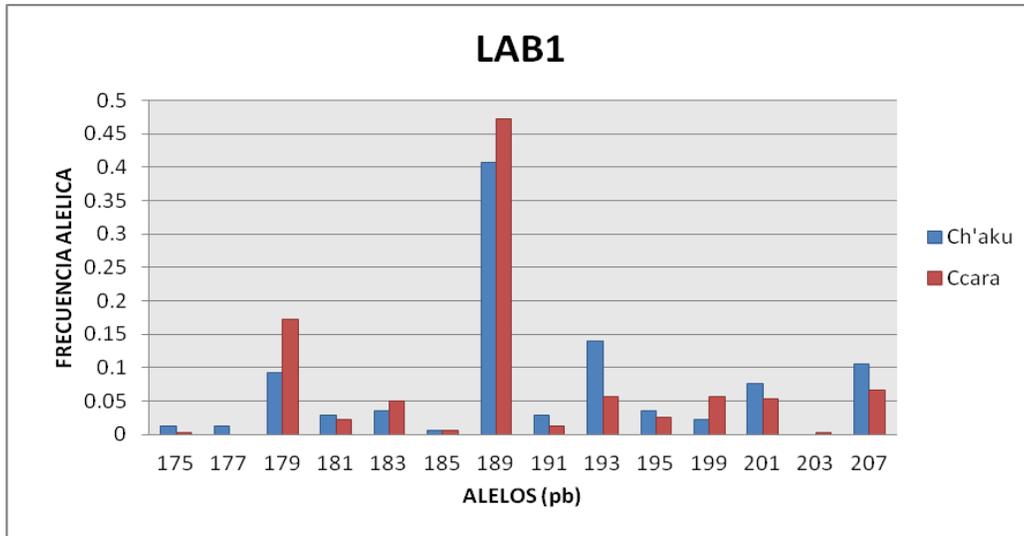
La Figura 9 indica las frecuencias alélicas del marcador GLM4, el cual presenta un número total de 10 alelos. El alelo con mayor frecuencia es el 216, en ambas poblaciones. La población de llamas Ccara presentó un alelo privado (214). En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue 33.71 por ciento, y en la población de llamas Ccara fue 24.20 por ciento.



**Figura 9.** Frecuencias alélicas del marcador GLM4 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

##### LAB1

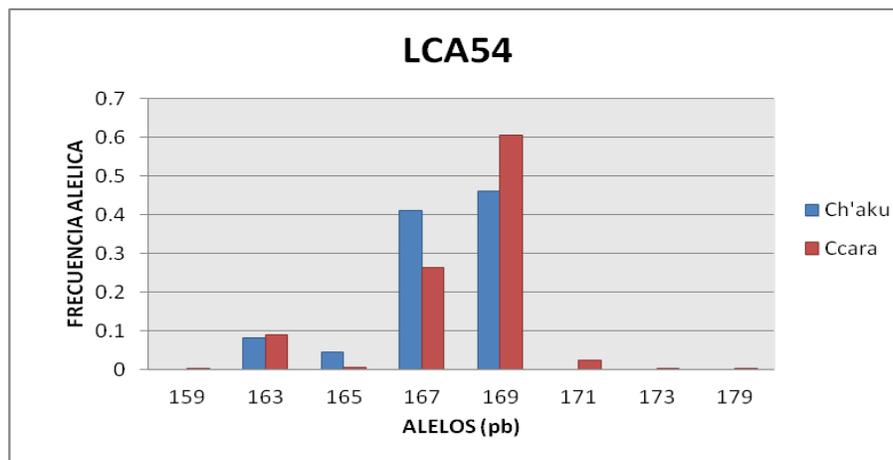
La Figura 10 indica las frecuencias alélicas del marcador LAB1, mostrando alta diversidad alélica: un total de 14 alelos diferentes. El alelo con mayor frecuencia en ambas poblaciones es el 189. Se observó la presencia de un alelo privado tanto en la población de llamas Ch'aku como en la población de llamas Ccara: alelo 177 y 203 respectivamente. En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue 27.91 por ciento, mientras que en la población de llamas Ccara fue de 29.56 por ciento.



**Figura 10.** Frecuencias alélicas del marcador LAB1 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LCA54

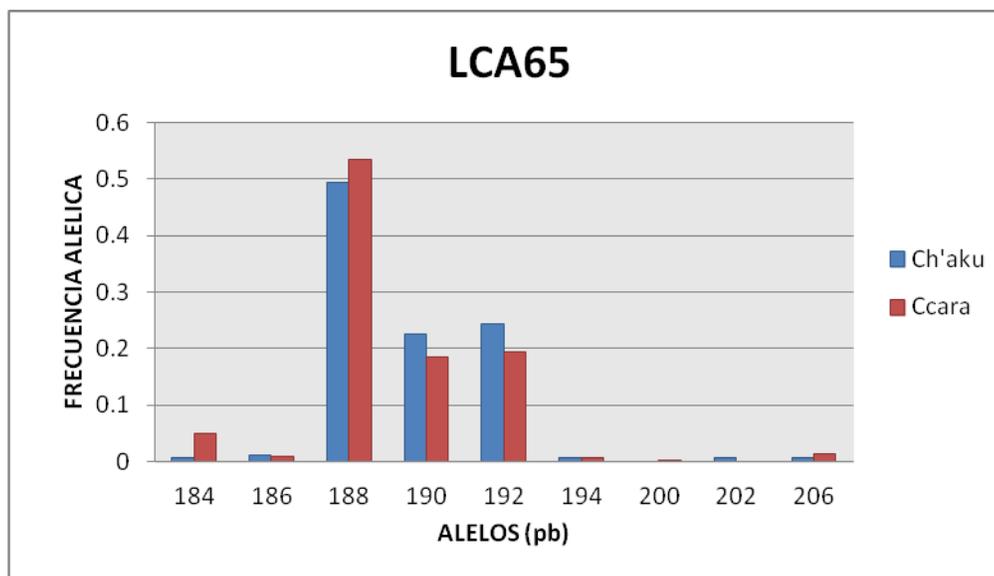
La Figura 11 indica las frecuencias alélicas del marcador LCA54, este es uno de los marcadores con la menor diversidad alélica en el Banco de Germoplasma de Quimsachata, ya que presenta un número total de 8 alelos, mostrando una mayor frecuencia de los alelos 167 y 169 en ambas poblaciones. La población de llamas Ccara presenta cuatro alelos privados (159, 171, 173 y 179). En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue elevado: 40 por ciento, al igual que en la población de llamas Ccara: 47.13 por ciento.



**Figura 11.** Frecuencias alélicas del marcador LCA54 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LCA65

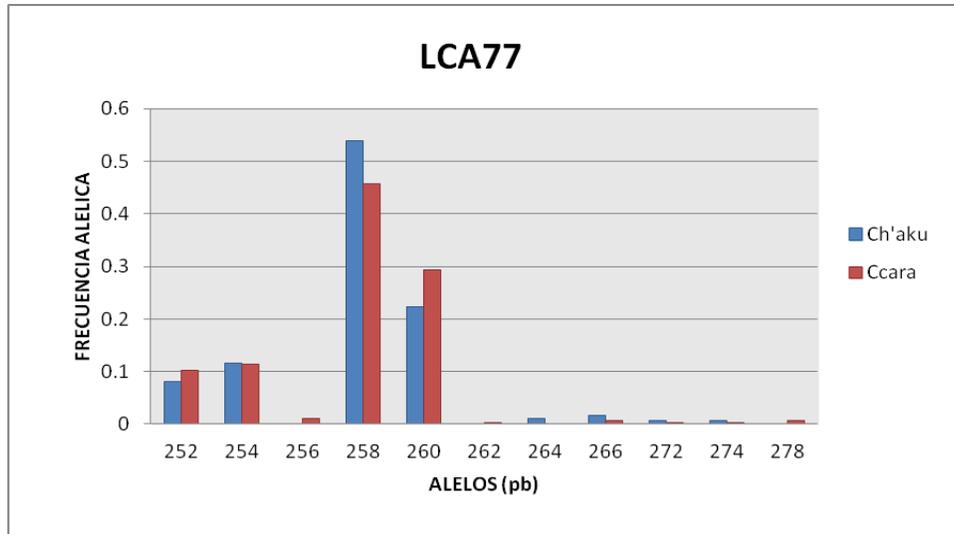
La Figura 12 indica las frecuencias alélicas del marcador LCA65. El cual presenta un número total de 9 alelos. Mostrando una mayor frecuencia del alelo 188. Cada una de las poblaciones presentó un alelo privado: Ch'aku (202) y Ccara (200). En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue 39.53 por ciento, mientras que en la población de llamas Ccara fue 39.07 por ciento.



**Figura 12.** Frecuencias alélicas del marcador LCA65 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LCA77

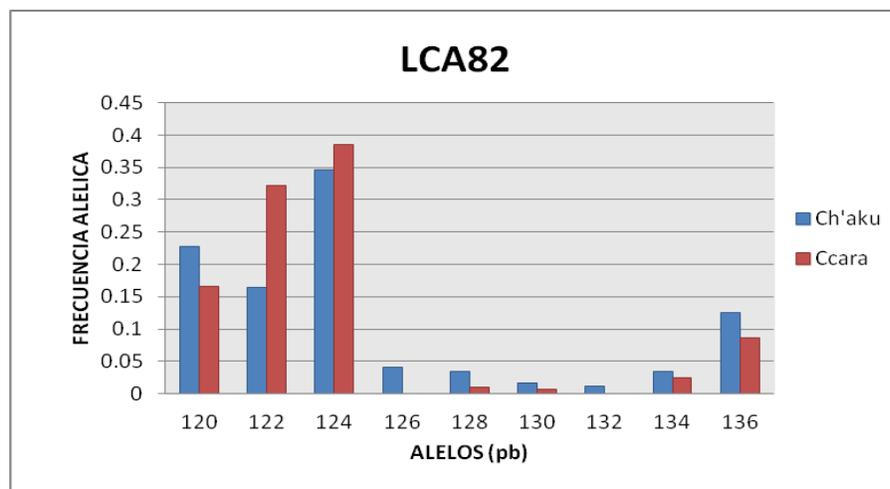
La Figura 13 indica las frecuencias alélicas del marcador LCA77. Este marcador presenta un número total de 11 alelos diferentes. Mostrando una mayor frecuencia del alelo 258 en ambas poblaciones. La población de llamas Ccara presenta tres alelos privados (256, 262 y 278) y uno en las llamas Ch'aku (264). En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue 34.48 por ciento mientras que en la población de llamas Ccara fue 32.90 por ciento.



**Figura 13.** Frecuencias alélicas del marcador LCA77 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LCA82

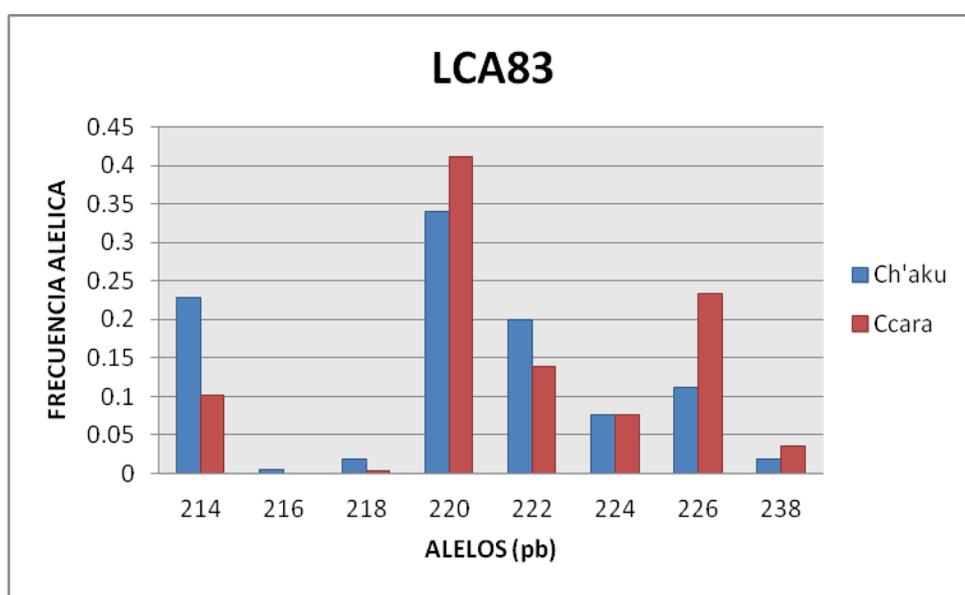
La Figura 14 indica las frecuencias alélicas para el locus LCA82, el cual presenta 9 alelos en total, mostrando una mayor frecuencia del alelo 124. Se puede apreciar la diferencia de las frecuencias alélicas entre ambas poblaciones. Solamente se encontró dos alelos privados (126 y 132) y corresponden a la población de llamas Ch'aku. El porcentaje de homocigotos en la población de llamas Ch'aku y Ccara fue: 31.82 y 48.41 por ciento, respectivamente.



**Figura 14.** Frecuencias alélicas del marcador LCA82 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LCA83

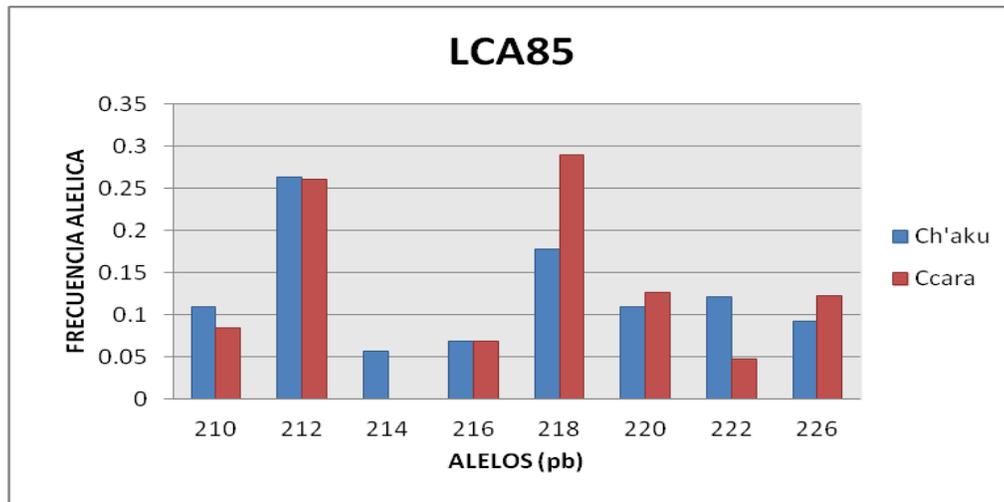
En a Figura 15 se observa las frecuencias alélicas del marcador LCA83, el cual presenta un número total de 8 alelos diferentes. Mostrando una mayor frecuencia del alelo 220 y una distribución alélica que permite diferenciar la mayoría de los tamaños de alelos obtenidos para este marcador en ambas poblaciones. Solo hay la presencia de un alelo privado que corresponde a la población Ch'aku (216). En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue elevado: 34.48 por ciento mientras que en la población de llamas Ccara fue 32.90 por ciento.



**Figura 15.** Frecuencias alélicas del marcador LCA83 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LCA85

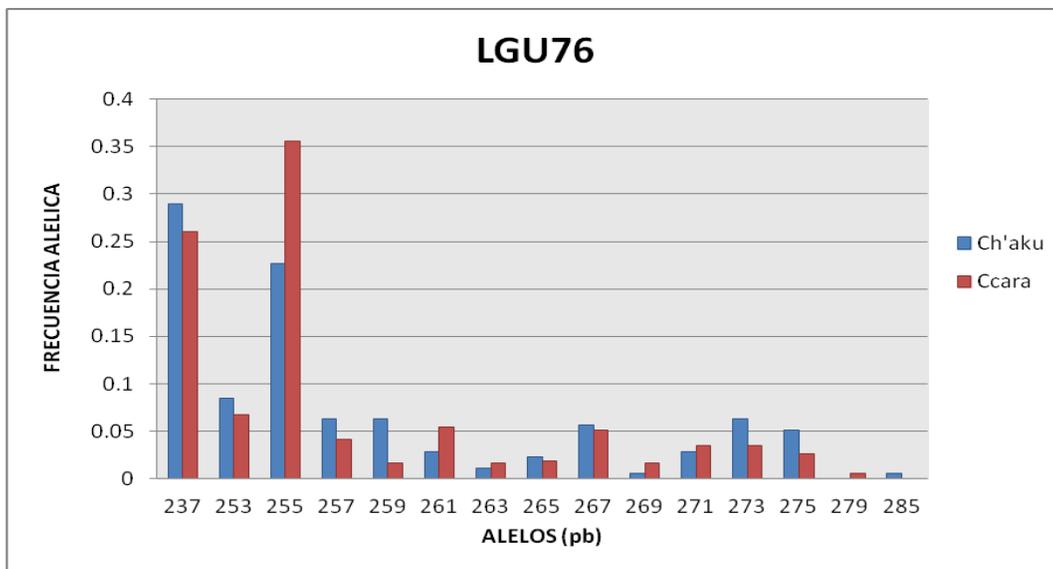
La Figura 16 indica las frecuencias alélicas del marcador LCA85, mostrando una mayor frecuencia de los alelos 212 en ambas poblaciones y 218 principalmente en las llamas Ccara. Este marcador presentó un número total de 8 alelos diferentes. Se aprecia una pequeña diferencia entre las frecuencias de la población de llamas Ch'aku y Ccara, y solo la población Ch'aku tiene un alelo privado (214). En la población de llamas Ch'aku y Ccara el porcentaje de homocigotos fue: 21.18 y 25.81 por ciento, respectivamente.



**Figura 16.** Frecuencias alélicas del marcador LCA85 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### LGU76

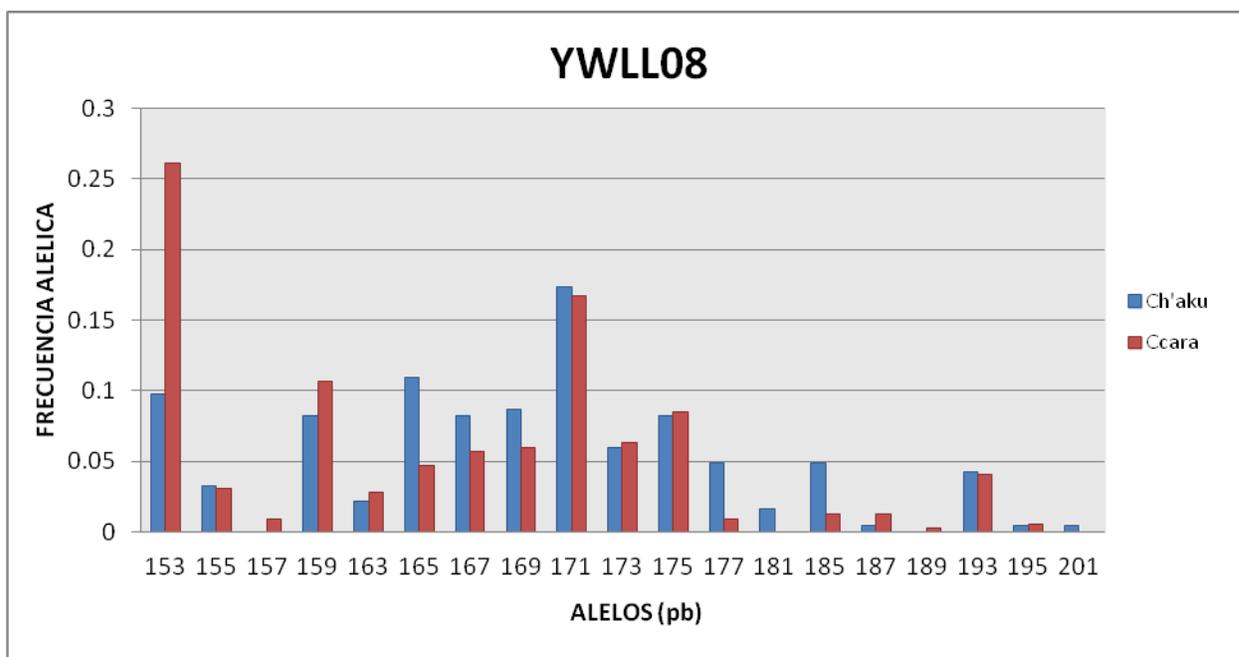
La Figura 17 indica las frecuencias alélicas del marcador LGU76, el cual presenta un número total de 15 alelos diferentes. Los alelos con mayor frecuencia son 237 y 255 y también las dos poblaciones presentan solamente un alelo privado: 279 (Ccara) y 285 (Ch'aku). En la población de llamas Ch'aku y Ccara el porcentaje de homocigotos fue: 17.05 y 25.00 por ciento, respectivamente.



**Figura 17.** Frecuencias alélicas del marcador LGU76 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### YWLL08

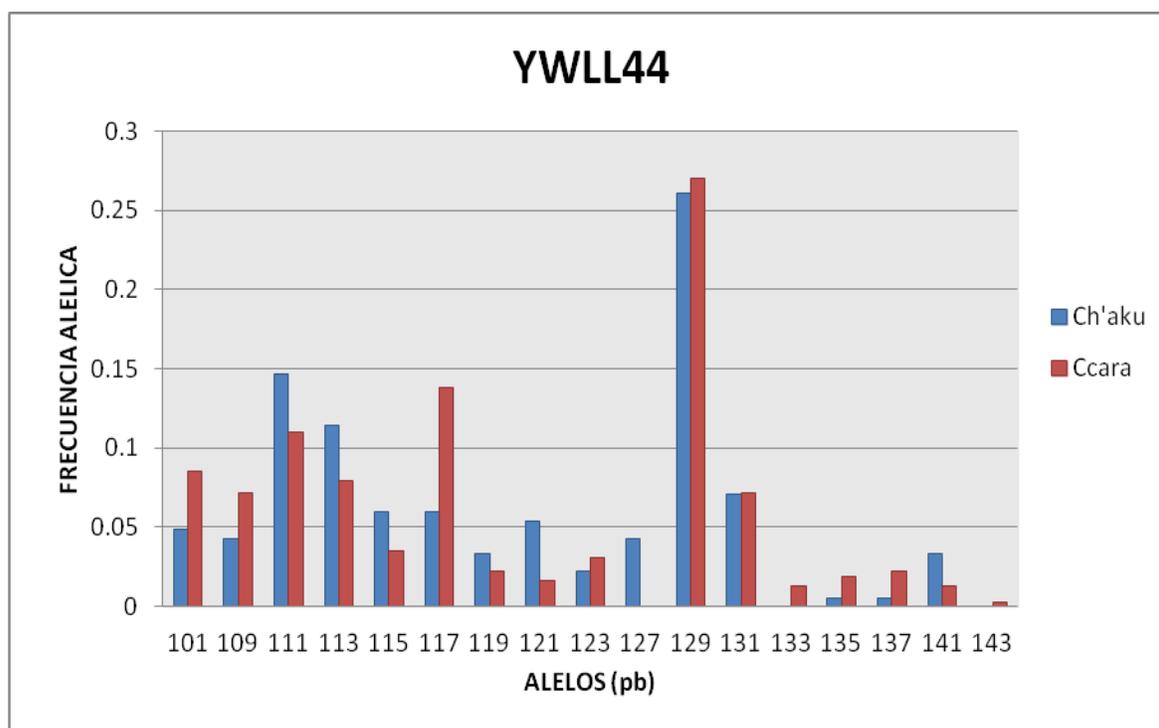
La Figura 18 muestra las frecuencias alélicas del marcador YWLL08, el cual presenta un número total de 19 alelos diferentes. Este marcador mostró dos alelos privados en cada población: 157 y 189; y 181 y 201 en la población de llamas Ccara y Ch'aku respectivamente. En la población de llamas Ch'aku el porcentaje de homocigotos fue 9.78 por ciento y el de la población de llamas Ccara fue 16.98 por ciento.



**Figura 18.** Frecuencias alélicas del marcador YWLL08 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### YWLL44

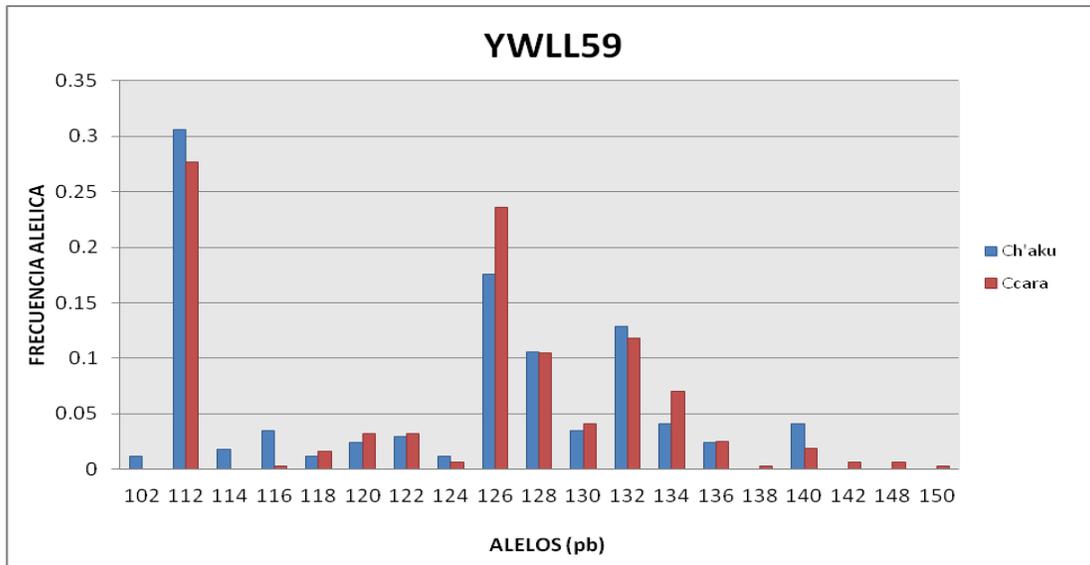
La Figura 19 muestra las frecuencias alélicas para el marcador YWLL44. Es un marcador con alta diversidad alélica y las frecuencias alélicas de todos sus alelos son bajas. El alelo con mayor frecuencia es el 129 en ambas poblaciones. Presenta un número total de 17 alelos diferentes. En la población de llamas Ch'aku se encontró un alelo privado (127), mientras que en la población de llamas Ccara se encontró dos (133 y 143). En la población de llamas Ch'aku y Ccara el porcentaje de homocigotos fue: 16.30 y 15.09 por ciento, respectivamente.



**Figura 19.** Frecuencias alélicas del marcador YWLL44 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### YWLL59

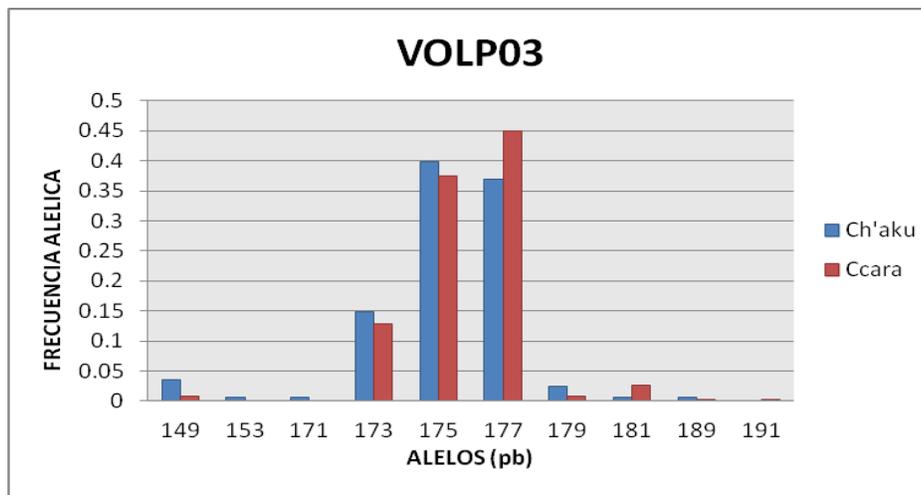
La Figura 20 muestra las frecuencias alélicas del marcador YWLL59. Este marcador junto con YWLL08 presenta la mayor diversidad alélica del Banco de Germoplasma de Quimsachata: un número total de 19 alelos diferentes. El alelo con mayor frecuencia es el 112 para ambas poblaciones. En la población de llamas Ccara se encontró cuatro alelos privados (138, 142, 148 y 150), mientras que en la población de llamas Ch'aku se encontró dos alelos privados (102 y 114). En la población de llamas Ch'aku y Ccara el porcentaje de homocigotos fue: 27.06 y 25.48 por ciento, respectivamente.



**Figura 20.** Frecuencias alélicas del marcador YWLL59 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

### VOLP03

En a Figura 22 se observa las frecuencias alélicas del marcador VOLP03. Este marcador presenta un total de 10 alelos diferentes. Mostrando una mayor frecuencia de los alelos 175 y 177. La población de llamas Ch'aku presentó dos alelos privados: 153, 171 y la población de llamas Ccara uno: 191 En la población de llamas Ch'aku y Ccara el porcentaje de homocigotos fue: 26.19 y 41.5 por ciento, respectivamente.



**Figura 21.** Frecuencias alélicas del marcador VOLP03 en las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

El porcentaje total de homocigotos de las poblaciones Ch'aku y Ccara fue: 26.86 y 30.37 por ciento. En total se observaron 35 alelos privados, de los cuales 15 corresponden a la población de llamas Ch'aku y 20 a la población de llamas Ccara. Cabe mencionar que todas sus frecuencias génicas fueron bajas ( $<0.05$ ). El marcador con mayor número de alelos privados fue YWLL59 (6).

#### **4.1.2 HETEROCIGOSIDAD ESPERADA Y OBSERVADA**

El cálculo de las frecuencias alélicas permitió determinar, mediante los programas Fstat 2.9.3.2 y Cervus 3.0.3, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) total y de cada población de los 13 marcadores microsatélites.

En el Cuadro 8 se observa que la  $H_e$  es en general más alta que la  $H_o$  ( $H_e > H_o$ ). Los valores de  $H_e$  y  $H_o$  en las llamas Ch'aku son mayores que los valores de  $H_e$  y  $H_o$  en las llamas Ccara:  $0.772 > 0.744$ ; y  $0.731 > 0.693$ , respectivamente. Esto se explica porque el porcentaje de heterocigotos total para los trece locus es de 73.14 y 69.33 por ciento para la primera y segunda población, respectivamente.

Los marcadores GLM4, LCA82 y YWLL59 son aquellos que presentan la mayor diferencia entre  $H_e$  y  $H_o$  en la población de llamas Ch'aku. Los marcadores LCA82 y YWLL59 se comportan de igual manera en la población de llamas Ccara. Por lo tanto, estos marcadores son los que más contribuyen con el déficit de heterocigosidad global.

Los marcadores LCA77, LCA83 y VOLP03 presentan un valor mayor de  $H_o$  respecto a la  $H_e$  ( $H_o > H_e$ ) solamente en la población de llamas Ch'aku, por tanto se asume que para estos marcadores en esta población, se produjeron menos apareamientos endogámicos de lo que se espera por azar.

El valor máximo de  $H_e$  en la población total corresponde al locus YWLL08 (0.893), mientras que la  $H_e$  más baja fue para el marcador LCA54 (0.587), que corresponde también a uno de los loci con menor número de alelos totales. La  $H_e$  total tuvo un promedio de 0.758.

Igualmente, la  $H_o$  en la población total varió en el rango de 0.555 (LCA54) a 0.857 (YWLL08) con un promedio de 0.707. Estos resultados son comparables con aquellos análisis de población de llamas en Argentina y Bolivia (Bustamante, et al., 2002, 2006; Barreta et al, 2012). En todos estos trabajos, al igual que en el presente estudio, la heterocigosidad esperada fue siempre mayor que la observada.

**Cuadro 8.** Valores de  $H_e$  y  $H_o$  en cada población y en la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.

		POBLACIÓN					
		CH'AKU		CCARA		TOTAL	
Locus	A	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$
GLM4	10	0.775	0.663	0.784	0.758	0.783	0.724
LAB1	14	0.789	0.721	0.732	0.704	0.756	0.71
LCA54	8	0.613	0.6	0.557	0.529	0.587	0.555
LCA65	9	0.648	0.605	0.639	0.609	0.643	0.608
LCA77	11	0.641	0.655	0.683	0.671	0.669	0.665
LCA82	9	0.786	0.682	0.715	0.516	0.746	0.576
LCA83	8	0.777	0.788	0.742	0.724	0.762	0.747
LCA85	8	0.848	0.759	0.805	0.742	0.824	0.748
LGU76	15	0.842	0.83	0.792	0.75	0.814	0.779
YWLL08	19	0.914	0.902	0.871	0.83	0.893	0.857
YWLL44	17	0.878	0.837	0.87	0.849	0.875	0.845
YWLL59	19	0.844	0.729	0.835	0.745	0.838	0.74
VOLP03	10	0.685	0.738	0.643	0.585	0.659	0.641
Media	12.08	0.772	0.731	0.744	0.693	0.758	0.707

A = número de alelos diferentes detectados en cada población;  $H_e$ : heterocigosidad esperada,  $H_o$ : heterocigosidad observada.

### 4.1.3 CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA

El contenido de información polimórfica (PIC) fue calculado mediante el *software* estadístico Cervus 3.0.3 y depende tanto del número de alelos como de la distribución de sus frecuencias en la población. Considerando que un valor de PIC superior a 0,50 indica que un marcador es muy informativo, se afirma que todos los locus analizados fueron polimórficos y siendo los microsatélites más informativos: YWLL08 (0.883), YWLL44 (0.863), YWLL59 (0.819), y LCA85 (0.8), y el menos informativo LCA54 (0.517).

En total el promedio obtenido del PIC fue de 0.724. El PIC, muestra un valor promedio de 0.736 para la población de llamas Ch'aku, mientras que la población de llamas Ccara posee un valor promedio más bajo de 0.707, pero igualmente informativo. Los marcadores que presentan los valores más altos de PIC también presentan elevados valores en el número de alelos y en la heterocigosidad observada.

Algunos marcadores muestran un PIC bajo aunque su número de alelos es alto como por ejemplo VOLP03 (0.593) con 10 alelos y LCA65 (0.517) con 9 alelos, esto puede deberse a que la  $H_o$  en ambos marcadores es menor con respecto a la  $H_o$  de los demás loci microsatélite. En el Cuadro 9 se muestra los valores del contenido de información polimórfica para cada marcador.

**Cuadro 9.** Contenido de Información Polimórfica de las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara.

Locus	Ch'aku	Ccara	Total
GLM4	0.745	0.752	0.753
LAB1	0.766	0.708	0.735
LCA54	0.531	0.497	0.517
LCA65	0.584	0.591	0.59
LCA77	0.594	0.63	0.62
LCA82	0.751	0.663	0.705
LCA83	0.738	0.704	0.728
LCA85	0.825	0.776	0.8
LGU76	0.821	0.766	0.791
YWLL08	0.902	0.857	0.883
YWLL44	0.863	0.856	0.863
YWLL59	0.823	0.814	0.819
VOLP03	0.623	0.572	0.593
MEDIA	0.736	0.707	0.723

Los valores de PIC de los 13 marcadores microsatélite son similares a los observados en estudios reportados con llamas (Penedo et al., 1998, Bustamante, 2002, 2006; Barreta et al., 2012). En todos estos trabajos, al igual que en el presente estudio, tuvieron un valor de PIC elevado.

#### **4.1.4 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG**

##### **a. GLOBAL**

En el Cuadro 10 se muestra el análisis por marcador del equilibrio Hardy-Weinberg (HW) global, es decir de ambas poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara que conforman la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata. De los 13 marcadores microsatélites, cinco están en equilibrio HW ( $P > 0.05$ ): LCA77, LGU76, YWLL08, YWLL44 y VOLP03. Los otros loci mostraron desvíos significativos del equilibrio HW ( $P < 0,05$ ). El test multi-locus de HW realizado para la población global de llamas, también sugirió que la población entera de llamas estudiada estaba en desequilibrio Hardy-Weinberg.

Todas las desviaciones del equilibrio HW estuvieron explicadas por deficiencia de heterocigosidad de acuerdo al programa Genepop 4.0.11. El exceso de individuos homocigotos en una población doméstica puede evidenciar el efecto de la selección artificial practicada mediante el manejo reproductivo.

**Cuadro 10.** Análisis de la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg global por marcador.

Locus	Déficit de Heterocigotos (P-value)	Exceso de Heterocigotos (P-value)	Desviación Estándar
GLM4	0.0062	0.9904	0
LAB1	0	1	0
LCA54	0.0217	0.9779	0.0051
LCA65	0.054	0.8672	0.0134
LCA77	0.259	0.7157	0.015
LCA82	0.0001	0.9999	0
LCA83	0.0463	0.9663	0.0066
LCA85	0.0002	0.9997	0.0001
LGU76	0.139	0.8151	0.0227
YWLL08	0.182	0.8269	0.0458
YWLL44	0.118	0.8714	0
YWLL59	0	1	0
VOLP03	0.434	0.5906	0.0511

b. POR POBLACIÓN

Para el análisis de la existencia del equilibrio HW de cada marcador por población se usó el programa Genepop 4.0.11, mediante el test para exceso de heterocigotos, y el test para déficit de heterocigotos. La prueba del equilibrio HW demostró que en general los loci estuvieron en desequilibrio debido a un déficit de heterocigotos ( $F_{is} > 0$ ), con excepción de LCA77, LCA83 y VOLP03, en la población de llamas Ch'aku, donde se observó exceso de heterocigotos ( $F_{is} < 0$ ) (Cuadro 11).

El exceso de homocigotos indica una clara pérdida de variabilidad y a su vez, evidencia la ausencia de apareamientos al azar en ambas poblaciones. Diversos trabajos de caracterización de camélidos sudamericanos realizados con diferentes microsatélites (Sarno et al., 2001, Wheeler et al., 2004, Maté et al., 2005), detectaron también un marcado déficit de heterocigotos en la población de camélidos sudamericanos.

Si la proporción de genotipos para un solo *locus* no está en equilibrio HW, se puede atribuir a que ha habido selección que ha afectado dicho *locus* o a la existencia de alelos nulos, pero si son varios *loci* independientes los que se desvían significativamente del equilibrio HW, este fenómeno puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones: efecto Wahlund (lo cual más adelante mostramos que no ocurre debido a que la diferenciación genética entre ambas poblaciones es muy baja), a que existe migración o flujo de genes o también al manejo mediante la práctica de apareamientos dirigidos por el criador (selección artificial) (Darío, 2007); sumado a esto, está a la misma historia evolutiva de las llamas, ya que su comportamiento reproductivo natural es la poligínico, donde los rebaños están conformados por machos, hembras y sus crías, estableciéndose jerarquías sociales con un macho dominante que controla el acceso de otros machos a su territorio de reproducción, alimento y bebida. Además, el macho dominante expulsa a las crías macho antes de que cumplan un año de edad y retiene a las hembras para asegurar el crecimiento del rebaño (Franklin, 1992).

Este comportamiento de exclusión de machos jóvenes e inclusión de hembras, que es conservado en las poblaciones bajo manejo resultaría en un déficit de heterocigotos. Por otra parte, no se puede excluir la existencia probable de alelos nulos (Bustamante et al., 2006) por lo que su análisis se presenta a continuación.

Además, como en otros estudios poblacionales de vicuñas y guanacos (Sarno et al., 2001; Maté et al., 2005; Vallejo et al., 2008) y llamas y alpacas (Bustamante et al., 2002, 2006; La Manna et al., 2011; Barreta et al., 2012) se observaron desvíos significativos del equilibrio de H-W, debido a un exceso de homocigotos. Entre las causales de estos desvíos podrían mencionarse a la práctica de apareamientos dirigidos por el criador (selección artificial), a una subdivisión poblacional o bien a la existencia de alelos nulos

**Cuadro 11.** Análisis de la desviación del equilibrio HW por marcador y por población, por medio de la Fis de Weir y Cockerhan y Robertson y Hill (1984). Score Test 5000 iteraciones.

Locus	POBLACIÓN							
	CH'AKU				CCARA			
	Déficit de Heterocigotos (P-value)	Exceso de Heterocigotos (P-value)	Fis (Weir y Cockerhan)	Fis (Robertson y Hill)	Déficit de Heterocigotos (P-value)	Exceso de Heterocigotos (P-value)	Fis (Weir y Cockerhan)	Fis (Robertson y Hill)
GLM4	0.0043	0.9997	0.145	0.145	0.2332	0.7476	0.0335	0.0126
LAB1	0	0.9595	0.087	0.2396	0.1997	0.7765	0.0435	0.018
LCA54	0.4336	0.578	0.0049	0.0026	0.4318	0.599	0.035	0.001
LCA65	0.3251	0.7623	0.0676	0.0139	0.1958	0.8105	0.0518	0.0197
LCA77	0.7613	0.3991	-0.0216	-0.0133	0.2567	0.7405	0.0171	0.0117
LCA82	0.0084	0.9866	0.1327	0.1041	0.001	0.9976	0.2788	0.1581
LCA83	0.023	0.9656	-0.0152	-0.0814	0.2985	0.7576	0.0251	0.016
LCA85	0.0036	0.9963	0.1063	0.112	0.0172	0.9852	0.0788	0.0759
LGU76	0.0955	0.9229	0.0388	0.0376	0.2207	0.7914	0.0536	0.0116
YWLL08	0.0032	1	0.1439	0.0734	0.0151	0.9903	0.0756	0.0354
YWLL44	0.0587	0.9562	0.0694	0.0491	0.1947	0.7281	0.0373	0.01
YWLL59	0	1	0.1348	0.1615	0.0256	0.9774	0.1227	0.0431
VOLP03	0.9264	0.0607	-0.0785	-0.0338	0.2005	0.846	0.0905	0.0195

#### 4.1.5 ALELOS NULOS

Debido a que se observó un déficit de heterocigotos ( $H_e > H_o$ ) en todos los loci y por ende un desequilibrio de Hardy-Weinberg, es necesario evaluar si esto está explicado por la presencia de alelos nulos que ocasionan la no detección de ciertos alelos heterocigotos resultando en una sobreestimación del nivel de homocigosidad.

El Cuadro 12 muestra la frecuencia de alelos nulos de cada locus calculada mediante el programa Cervus 3.0.3, se observa que las frecuencias estimadas de alelos nulos en cada locus es cercana a cero por lo cual se puede considerar como nula (Fendri, 2008). Es decir que el número de homocigotos detectado en cada locus es muy cercano al que existe realmente y no afectan en los resultados obtenidos ni a las conclusiones de este trabajo.

Además, este análisis permite descartar a los alelos nulos como una de las causas principales de la desviación del equilibrio HW. Por lo que probablemente el desequilibrio Hardy-Weinberg se deba principalmente al efecto de la selección artificial por medio del manejo de los criadores.

**Cuadro 12.** Frecuencia de alelos nulos por locus.

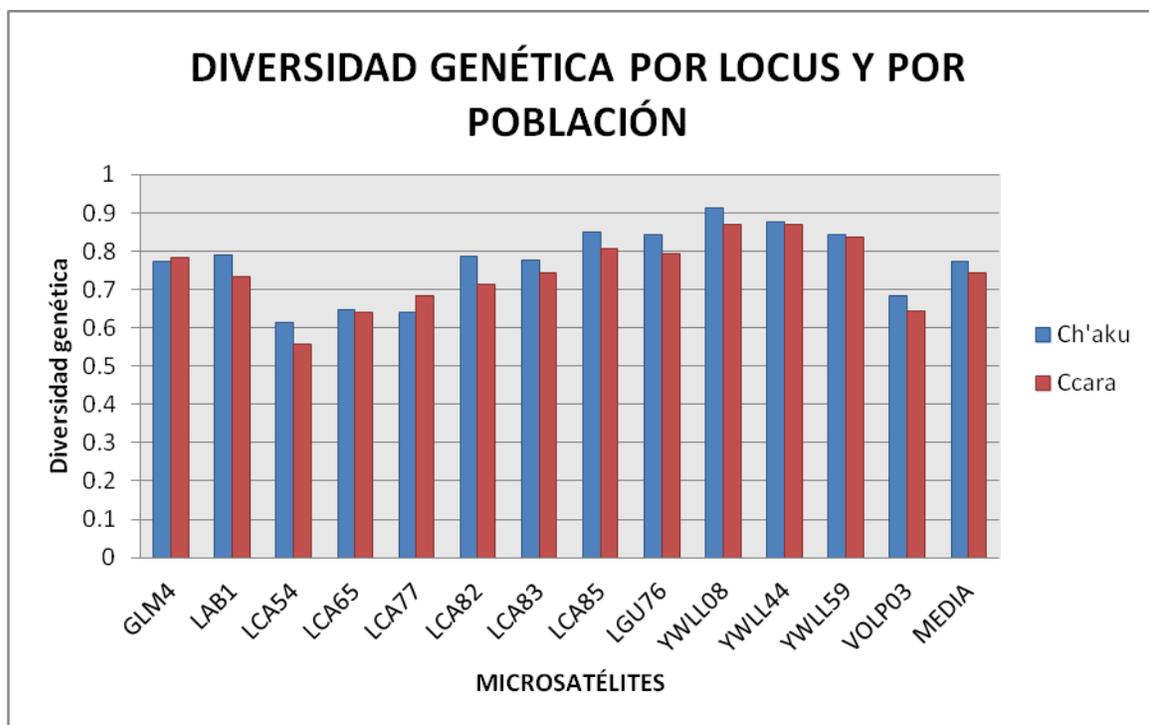
Locus	F0
GLM4	0.035
LAB1	0.029
LCA54	0.028
LCA65	0.031
LCA77	0.003
LCA82	0.033
LCA83	0.009
LCA85	0.046
LGU76	0.022
YWLL08	0.020
YWLL44	0.016
YWLL59	0.062
VOLP03	0.016

#### 4.1.6 DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética de los 13 marcadores microsatélites analizados para cada población de llamas, fue calculada mediante el programa Fstat 2.9.3.2. La figura 22, muestra que todos los marcadores presentan una alta diversidad genética y esta fue mayor en la población de llamas Ch'aku (0.772) que en las llamas Ccara (0.744), mientras que la diversidad genética total fue de 0.758.

La diversidad genética máxima en la población de llamas Ch'aku corresponde a los locus YWLL08 (0.902), YWLL44 (0.878), LCA85 (0.849) YWLL59 (0.844), al igual que en la población de llamas Ccara: YWLL08 (0.871), YWLL44 (0.870), YWLL59 (0.836) y LCA85 (0.805). La diversidad genética más baja correspondió al locus LCA54: 0.613 y 0.557, para la población de llamas Ch'aku y Ccara respectivamente.

A la vista de los resultados de  $H_e$ ,  $H_o$  y de PIC obtenidos para estos microsatélites se puede afirmar que los marcadores para la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata presentan alta diversidad genética; sin embargo, no es información suficiente para afirmar que este Banco representa la máxima variabilidad genética presente en las poblaciones de llamas de los departamentos de Cuzco y Puno, por lo que el PNI de Recursos Genéticos Animales del INIA, está llevando a cabo investigaciones enfocadas en la identificación y búsqueda de nuevas poblaciones de llamas que posean variabilidades genéticas altas y que puedan servir como vías para enriquecer la diversidad del banco de germoplasma, convirtiéndolo en una población con alta diversidad que cumpla su papel principal de conservación y resguardo de genes promisorios para el mejoramiento genético y adaptabilidad hacia el futuro cambio ambiental (Revista Agroinnova, 2011).



**Figura 22.** Diversidad genética por locus y por población.

#### 4.2 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LAS LLAMAS CH'AKU Y CCARA

Para poder obtener datos con respecto a la diferenciación genética de las poblaciones, se utilizó el programa Genepop 3.0.3. Los resultados se presentan en el Cuadro 13 (las probabilidades corresponden a la probabilidad estadística comparable con  $\alpha$  de 0.05 de poder utilizar para diferenciar los pares de poblaciones en ese microsatélite).

La diferenciación genética global para cada uno de los marcadores no muestra valores significativos, lo cual indica que los marcadores utilizados no son robustos al momento de diferenciar las dos poblaciones de llamas del Banco de Quimsachata. Este resultado concuerda con el resultado obtenido del *software* GeneClass, el cual asigna a los individuos en grupos en base a su perfil genético. Se observó que el programa asignó a todos los individuos en un solo grupo, es decir la población de llamas Ch'aku y la población de llamas Ccara fue reconocida como una misma población.

**Cuadro 13.** Diferenciación genética entre las poblaciones de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.

<b>Locus</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Desviación estándar</b>
GLM4	0.208	0.0086
LAB1	0.024	0.0041
LCA54	0.003	0
LCA65	0.002	0.01
LCA77	0.045	0.0097
LCA82	0.003	0
LCA83	0.131	0
LCA85	0.116	0.00058
LGU76	0.236	0.0039
YWLL08	0.003	0
YWLL44	0.006	0
YWLL59	0.046	0.0084
VOLP03	0.001	0.003

#### **4.2.1 ESTADÍSTICOS F DE WRIGHT**

En el Cuadro 14 se muestra los estadísticos F de Wright promedio obtenidos con cada uno de los 13 microsatélites, calculados mediante el programa Fstat 2.9.3.2., Goudet (2002) y tomando a las dos poblaciones de llamas como un todo. Para ello se empleo el procedimiento de Weir y Cockerham (1984) para cada locus por medio de la estimación de la  $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IS}$ .

El parámetro  $F_{IS}$  indica el porcentaje promedio de desequilibrio entre las poblaciones. El valor de  $F_{ST}$  indica el grado de diferenciación entre las poblaciones de llamas, es decir, que parte de la variabilidad genética total se debe a las diferencias genéticas entre las poblaciones. Por último el parámetro  $F_{IT}$  nos indica el porcentaje de déficit medio de heterocigotos o porcentaje de exceso de homocigotos respecto al equilibrio HW.

**Cuadro 14.** Estadísticos F para todos los loci de la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata

Locus	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>
GLM4	0.078	0.005	0.073
LAB1	0.065	0.009	0.056
LCA54	0.071	0.033	0.04
LCA65	0.056	0.001	0.054
LCA77	0.009	0.005	0.004
LCA82	0.236	0.017	0.223
LCA83	0.032	0.022	0.01
LCA85	0.097	0.009	0.089
LGU76	0.048	0.009	0.039
YWLL08	0.049	0.016	0.034
YWLL44	0.038	0.005	0.033
YWLL59	0.118	0.001	0.118
VOLP03	0.029	0.002	0.027

El análisis del Cuadro 14 demuestra lo siguiente.

- El marcador GLM4 tiene un 7.8 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW; la diferenciación genética entre las poblaciones es de 0.4 por ciento y además el desequilibrio dentro de las poblaciones fue de 7.3 por ciento a favor de los homocigotos.
- El marcador LAB1 tiene un 6.5 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética entre las población para este locus fue de 0.9 por ciento y tuvo un 5.6 por ciento de desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos.
- El marcador LCA54 presenta un 7.1 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética entre las poblaciones fue de 3.3

por ciento; y hay un 4 por ciento de desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos.

- El marcador LCA65 presenta un 5.6 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética entre ambas poblaciones fue de 0.1 por ciento, y hay un 5.4 por ciento de desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos.
- El marcador LCA77 presenta un 0.9 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética entre ambas poblaciones es muy baja: 0.5 por ciento y hay un desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos con un valor de 0.4 por ciento
- El marcador LCA82 tiene un 23.6 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW, la diferenciación genética fue de 1.7 por ciento y, hay desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos (22.3 por ciento).
- El marcador LCA83 posee un 3.2 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW; la diferenciación genética entre las poblaciones fue de 2.2 por ciento y el desequilibrio dentro de las poblaciones tuvo un valor de 1 por ciento a favor de los homocigotos
- El marcador LCA85 muestra un 9.7 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética que se encontró entre ambas poblaciones fue de 0.9 por ciento y hay un desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos con un valor de 8.9 por ciento.
- El marcador LGU76 muestra un 4.8 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW; la diferenciación genética entre las poblaciones es muy baja (0.9 por ciento) y, hay un 3.9 por ciento de desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos.
- El marcador YWLL08 presenta 4.9 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética entre las poblaciones fue de 1.6 por ciento. El desequilibrio dentro de las poblaciones fue de 3.4 por ciento a favor de los homocigotos.
- Para el marcador YWLL44 se tiene un 3.8 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. La diferenciación genética que se encontró entre las

poblaciones fue muy baja de 0.5 por ciento, y mostró un 3.3 por ciento de desequilibrio dentro de las poblaciones a favor de los homocigotos.

- El marcador YWLL59 presenta un 11.8 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW. Al igual que el marcador LCA77, su diferenciación genética fue de 0.1 y el desequilibrio dentro de las poblaciones fue de 11.8 por ciento a favor de los homocigotos.
- El marcador VOLP03 tiene un 2.9 por ciento más de homocigotos que los que se esperarían en equilibrio HW; la diferenciación genética entre ambas poblaciones de llamas fue de 0.2 por ciento y, el desequilibrio dentro de las poblaciones fue de 2.7 por ciento a favor de los homocigotos.

Por lo tanto, los microsatélites LCA82, YWLL59 y LCA85 son los que más contribuyen al déficit de heterocigotos ya que presentan un 23.6, 11.8 y 9.7 por ciento más de homocigotos que lo que se esperaría en equilibrio HW, respectivamente y coincide con los marcadores que presentaron la mayor diferencia entre  $H_e$  y  $H_o$  (donde la  $H_e > H_o$ ).

Tomando el promedio de todos los 13 locus analizados, los resultados indican que en toda la población de llamas del Banco de Germoplasma del INIA hay un 7.2 por ciento más de homocigotos de lo que se esperaría bajo equilibrio HW. El grado de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) calculado para todos los loci y para todas las poblaciones, fue de 0.01; lo cual según Wright (1978), es un valor muy bajo, siendo un indicativo de poca diferenciación genética entre las poblaciones de llamas estudiadas. El valor medio de  $F_{IS}$  fue de 0.063 indicando desequilibrio a favor de los homocigotos, reflejando el efecto que tiene la selección artificial con los sistemas de manejo y prácticas de apareamiento dirigido (Cuadro 15).

**Cuadro 15.** Estadísticos F global de la población total de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata

$F_{IT}$	$F_{ST}$	$F_{IS}$
0.072	0.01	0.063

En el Cuadro 16 se observa los valores de  $F_{IS}$  para las dos poblaciones de llamas del Banco de Germoplasma del INIA con los 13 microsatélites en conjunto. La población de llamas Ch'aku presenta un valor de  $F_{IS}$  similar al de las llamas Ccara. Este índice es una medida indirecta de consanguinidad y concuerda con los resultados obtenidos mediante las pruebas exactas de equilibrio HW.

**Cuadro 16.** Valores de  $F_{IS}$  promedio para ambas poblaciones.

Población	$F_{IS}$
Ch'aku	0.053
Ccara	0.068

#### 4.2.2 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR

El análisis de AMOVA, por medio del programa Arlequín 3.1, permitió la partición de la variabilidad genética total entre tres fuentes diferentes de variación: varianza molecular entre individuos, entre poblaciones y dentro de las poblaciones. En el Cuadro 7 se observa que la mayoría de la variación proviene de la variabilidad dentro de las poblaciones (93,95 por ciento), mientras que, solamente el 5.03 por ciento de la variación se debió a la variabilidad en las frecuencias alélicas encontrada entre las poblaciones. El grado de diferenciación genética entre las poblaciones ( $F_{ST}$ ) fue de 0,0102, el cuál coincide con el resultado del programa Fstat 2.9.3.2., Goudet (2002). Este valor según Wright (1978) indica poca diferenciación genética y también una débil estructuración genética entre las 2 poblaciones (Vélez, 2007). Estos resultados son muy semejantes a los valores estimados por Barreta et al., (2012) entre y dentro de los grupos regionales de llamas Bolivianas.

Para interpretar estos resultados se debe tomar en cuenta que el Banco de Germoplasma de Quimsachata fue establecido hace 26 años y desde su creación las llamas Ch'aku y Ccara han sido empadradas y manejadas por separado. Este intervalo de tiempo, es improbable para generar diferenciación genética entre los dos fenotipos (La Manna et al., 2011).

**Cuadro 17.** Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) de las dos poblaciones del Banco de Germoplasma de Quimsachata

<b>AMOVA</b>				
<b>Fuente de Variación</b>	<b>GL</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Componentes principales</b>	<b>Porcentaje de Variación (%)</b>
Entre Poblaciones	1	12.845	0.03837	1.02
Entre Individuos entre Poblaciones	249	970.878	0.1886	5.03
Dentro de la Población	251	884	3.52191	93.95
Total	501	1867.723		100
<b>F<sub>ST</sub> : 0.01024</b>				

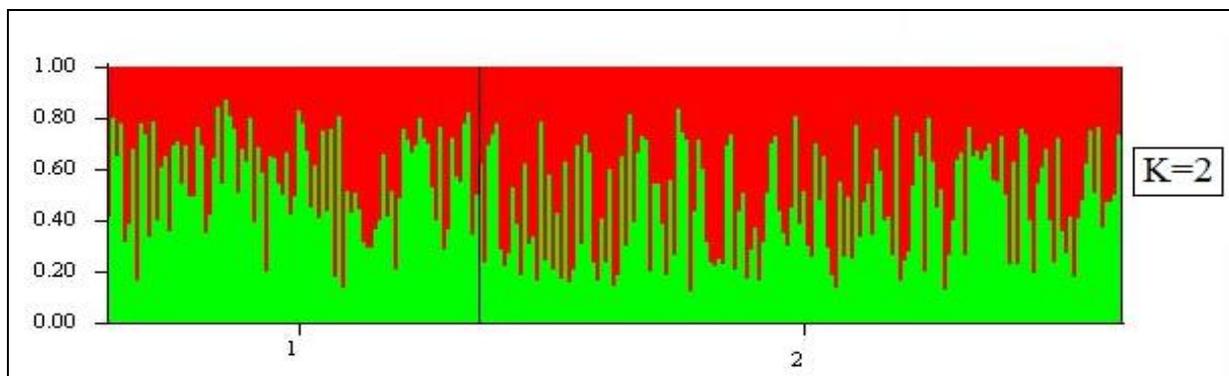
#### 4.2.3 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN

Para analizar la estructura poblacional en los 251 genotipos mediante los 13 marcadores microsatélites, se utilizó el programa STRUCTURE v 2.3 (Pritchard et al., 2000). Con este programa se hace un análisis de agrupamiento de los individuos estudiados en función a su parecido genético, en un diferente número de clusters (K) que representarían el número de poblaciones asumidas utilizando un modelo de mezcla en el cual cada individuo podría contener en su genoma porcentajes variables de las poblaciones ancestrales de las que proviene (Estévez, 2009). Cuando la barra vertical es de un solo color significa que el 100 % del genoma de ese individuo pertenece a ese cluster (K), mientras que si tiene dos o más colores significa que comparte el genoma con otros (K) (Darío, 2008).

Se realizaron 7 corridas independientes (K= 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) y estas fueron repetidas para corroborar la consistencia de los resultados. La representación grafica fue similar en los 8 clusters y no mostró ninguna evidencia de diferenciación genética o subdivisión poblacional en las poblaciones. En la Figura 23 se puede observar que los individuos de ambos fenotipos fueron asignados a dos clusters (cada uno de color distinto: rojo y verde) y no hay una clara separación entre las dos poblaciones de llamas del Banco de Quimsachata. Los resultados de los asignamientos de clusters mostraron una débil estructura genética en la población

estudiada, ésto fue consistente con el elevado flujo genético entre las poblaciones estudiadas (Barreta et al., 2012). Por lo tanto, la asignación de individuos a clusters, clarificó aún más la baja diferenciación genética entre ambas poblaciones.

**Figura 23.** Análisis de la estructura de las dos poblaciones de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.



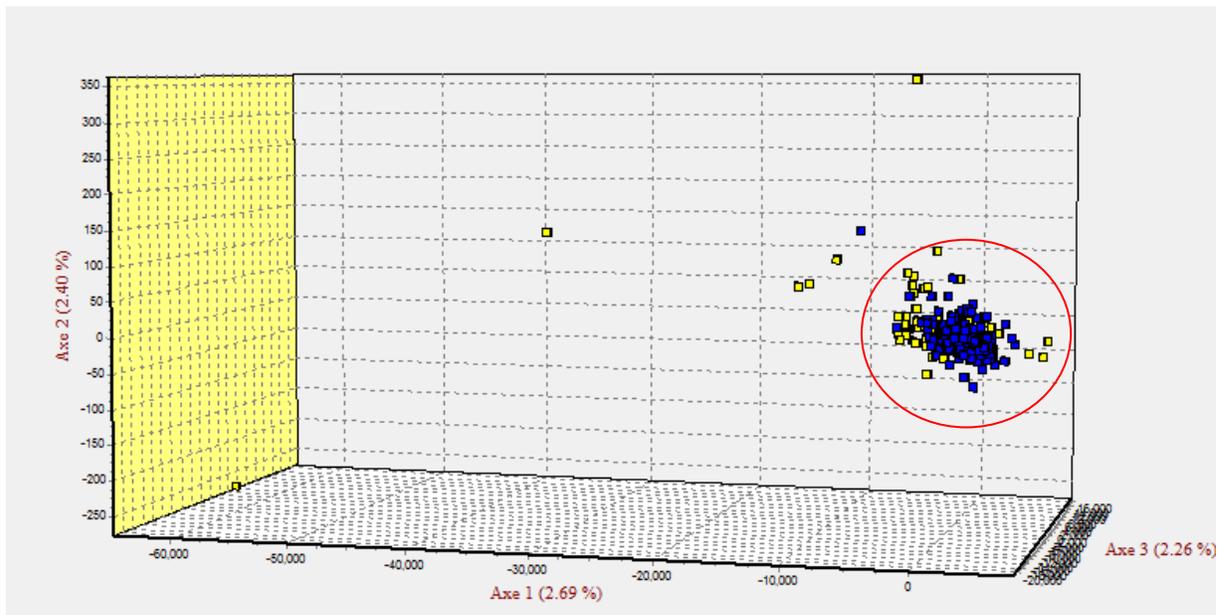
### 4.3 FLUJO GÉNICO

El *software* estadístico Genepop 3.0.3 fue utilizado para calcular el valor del flujo genético entre las poblaciones estudiadas. Para ello primero se obtiene el número de migrantes ( $N_m$ ) utilizando los alelos privados. La frecuencia promedio de alelos privados = 0.0107 y un número de migrantes por generación igual 30.9, el cual es un valor elevado, esto se explica porque a pesar que las poblaciones de llamas Ch'aku y Ccara actúan como un sistema cerrado (entre ellas) el Banco de Germoplasma es un sistema semi cerrado en un todo ya que hay el ingreso de llamas Ch'aku y Ccara externas de diversas comunidades de Puno y Cuzco. A este respecto, es importante mencionar que su misma historia de domesticación ha envuelto, a lo largo del tiempo, cruzamientos entre estos dos fenotipos ya sea de manera empírica (por intercambio de reproductores entre los criadores) o incluso accidental entre ellas, lo que ha ocasionado que haya intercambio de material genético.

#### 4.4 ANÁLISIS FACTORIAL DE CORRESPONDENCIA

El AFC representa la relación genética entre las poblaciones, este fue calculado mediante el programa Genetix 4.0.5 utilizando como variable de clasificación los genotipos individuales para los 13 microsatélites. En la figura 24 se puede observar la representación espacial de las poblaciones de llamas: Ch'aku (cuadrados amarillos) y Ccara (cuadrados azules), y lo que podríamos llamar como diferenciación genética entre las poblaciones.

Este análisis, permite nuevamente evidenciar claramente la baja diferenciación genética entre las dos poblaciones de llamas estudiadas. Ninguna de las poblaciones se mostró como un grupo independiente con respecto la una de la otra.



**Figura 24.** Representación tridimensional del Análisis Factorial de Correspondencia entre las dos poblaciones de llamas (Amarillo: Ch'aku y Azul: Ccara).

## V. CONCLUSIONES

La población de llamas, *Lama glama*, Ch'aku y Ccara ubicadas en el Banco de Germoplasma del INIA, simboliza patrimonio natural, económico, cultural e histórico del Perú. Además, constituye, junto con las alpacas, la base del sustento de un vasto sector de la población de la región alto andina de nuestro País. Por estos motivos, es de suma importancia caracterizar la diversidad genética que presenta con el fin de poder protegerla, conservarla y posteriormente utilizarla para impulsar su crianza sostenible. El presente trabajo, provee el primer estudio de diversidad genética en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata basado en el análisis de marcadores de tipo microsatélite y presenta las siguientes conclusiones:

- Los 13 marcadores microsatélites utilizados son altamente polimórficos e informativos para detectar variabilidad genética en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata.
- Existe una alta diversidad genética en la población de llamas del Banco de Germoplasma de Quimsachata. Se identificaron un total de 157 alelos en total, altos niveles de heterocigosidad esperada y elevado número promedio de alelos por marcador (12.08). Por lo que el Banco cumple su papel principal de conservación de este recurso animal y puede contribuir a aumentar la viabilidad y productividad de las poblaciones de llamas de los departamentos de Puno y Cuzco.
- La diferenciación genética entre los fenotipos de llamas Ch'aku y Ccara del Banco de Germoplasma de Quimsachata es muy baja ( $F_{st}=0.01$ ). Esta conclusión está apoyada por el valor de flujo génico alto (30.9), y los resultados del análisis factorial de correspondencia (AFC), del análisis de varianza molecular (AMOVA) y del programa STRUCTURE.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Con el fin de mantener la diversidad genética y evitar el incremento de la consanguinidad en el Banco de Germoplasma de Alpacas de color y Llamas del INIA, es prioritario establecer registros genealógicos que permitan optimizar el diseño de apareamientos entre los individuos (principalmente aquellos con alelos privados).
- La diferenciación genética entre los fenotipos de llamas Ch'aku y Ccara debe ser estudiada mediante el análisis de genes relacionados con diferencias fenotípicas observadas, estos podrían identificar variantes alélicas relacionadas a los fenotipos estudiados.
- Emplear el panel de microsatélites utilizados en este trabajo para realizar estudios de caracterización molecular en las principales regiones llameradas del país: Puno, Cuzco, Huancavelica, Ayacucho, Junín y Arequipa con el fin de identificar diferentes reservorios genéticos que proporcionen nuevos reproductores. Sin embargo hay que tomar en cuenta, que no necesariamente estos marcadores tendrán el mismo comportamiento en otras poblaciones.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aranguren, J; Jordana, J; y M. Gómez. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection and Evolution* 33: 243-252.
2. Arruda, M; Gonçalves, E; Schneider, M; Da-Silva, A; y M. Versute. 2010. An alternative genotyping method using dye- labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. *Mol Biol Rep.* 37: 2031-2036.
3. Barreta, J; Gutiérrez-Gil, B; Iñiguez, V; Romero, F; Saavedra, V; Chiri, R; Rodríguez, T; y J. Arranz. 2012. Analysis of genetic diversity in Bolivian llama populations using microsatellites. *Journal of Animal Breeding and Genetics.*
4. Belkhir, K; Borsa, L; Chikhi, N; y F. Bonhomme. 2003. Genetix: 4.05 logiciel sous windowstm pour la genetique des populations. Laboratoire Genoma Populations, Interactions, Adaptations, Montpellier, France.
5. Botstein, D; White, M; Skolnick, M; y R. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
6. Bonin, A; Bellemain, E; Bronken, E; y F. Pompanon. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13: 3261-3273.

7. Bustamante, A; Zambelli, A; De Lamo D; Von Thungen; y L. Vidal-Rioja. 2002. Genetic variability of guanaco and llama populations in Argentina. *Small Ruminant Research* 44: 97-101.
8. Bustamante, A; Maté, M; Zambelli, A; y L. Vidal-Rioja. 2003. Isolation and characterization of 10 polymorphic dinucleotide microsatellite markers for llama. *Molecular Ecology Notes*. 3: 68-69.
9. Bustamante, A; Mate, M; Lamas, H; Giovambattista, G; Zambelli, A; y L. Vidal-Rioja,. 2006. Análisis de diversidad genética en tres poblaciones de llamas (*Lama glama*) del noroeste argentino. *Revista Chilena de Historia Natural*. 79: 175-184.
10. Callen, D; y A. Thompson. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellites markers. *Am. J. Human Genet.* 52: 922-927.
11. Cano, Z; Rosadio, R; Maturrano, L; Dávalos, R; y J. Wheeler. 2012. Caracterización fenotípica y análisis de ADN mitocondrial de llamas de Marcapomacocha, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 23 (3): 388-398.
12. Cortes, G. 2008. Análisis de la variabilidad genética en la raza bovina de Lidia utilizando información molecular. Tesis para obtener el grado de Doctor en Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España.
13. Crow, J; y M. Kimura. 1970. An introduction to population genetics theory. (Harper y Row, Publishers, Inc., N.Y.)
14. Cristofanelli, S; Antonini, M; Torres, D; Polidori, P; C. Renieri. 2005. Carcass characteristics of peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) reared in the Andean highlands. *Small Ruminant Research*. 58: 219–222.
15. Cruz, H. 2003. Identificación, Caracterización y Herencia de Microsatélites y su Aplicación como Marcadores Moleculares en un Programa de Mejoramiento de

- Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz.
16. Darío, R. 2008. Caracterización genética y morfológica del ovino criollo Argentino de origen patagónico. Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad Politécnica de Valencia.
  17. David, L; Scott, L; y C. Stephen. 1993. An alternate universal *forward* primer for improved automated DNA sequencing of M13. *BioTechniques*, 15: 580--582
  18. Estévez, C. 2009. Estudio sobre la caracterización genética de las razas caprinas Mallorquina e Ibicenca. Tesis para optar el título de Magister en Zootecnia y Gestión Sostenible. Universidad de Córdoba.
  19. Evdotchenko, D; Han, Y; Bartenschlager, H; Preuss, S; y H. Geldermann. 2003. New polymorphic microsatellite loci for different camel species. *Molecular Ecology Notes*. 3:431–434.
  20. Enríquez, S. 2003. Evaluación, Recuperación y Conservación del Germoplasma de la alpaca raza suri color. Nuñoa Melgar Puno. ACRICAN-ILLA.
  21. Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005) Arlequin ver.3.0: an integrated softwarepackage for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. On.*, 1, 47–50.
  22. FAO. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú.
  23. Fendri, M. 2008. Uso de Marcadores Microsatélites (SSRs) para el análisis de la variabilidad molecular y la identificación de las variedades de olivo del banco de germoplasma de “boughrara” (Sfax, Túnez). Tesis presentada para optar al título de Master en Olivicultura y Elaiotecnia, Córdoba.

24. Frankham, J; Ballou, D; y D. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.
25. Franklin, W.1992. Biology, ecology and relationship to man of the South American Camelids. In: Mares MA y H Genoways (eds) Mammalian biology of South America: 457-489. The Pymatuning Symposia in Ecology, University of Pittsburgh, Linesville, Pennsylvania, USA.
26. Godoy, J. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de species. Ecosistemas 18 (1): 23-33.
27. Goldstein, D; y C. Schlotterer. 1999. Microsatellites. Evolution and applications. Oxford University Press. Oxford, Great Britain
28. Goudet, J. 2002. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology Evolution.
29. Hardy, G. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. Science. 28: 49-50.
30. Huanca, T., Apaza, N., y M. Gonzáles. 2007. Experiencia del INIA en el fortalecimiento del banco de germoplasma de camélidos domésticos. Archivos Latinoamericanos de producción Animal. Vol. 15.
31. Hoelzel, A. 1998. Molecular Genetics Analysis of Populations. Second Edition. The practical Approach Series. Oxford University Press. Oxford.
32. Hoffman, J; y W. Amos. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. Molecular Ecology. 14: 599-612.

33. Iñiguez, L; Alem, R; Wauer, A; y J. Mueller. 1998. Fleece types, fiber characteristics and production system of an outstanding llama population from southern Bolivia. *Small Ruminant Research*. 30: 57-65.
34. Kadwell, M; Fernandez, M; Stanley, H; Baldi, R; Wheeler, J; Rosadio, R; y M. Bruford. 2001. Genetic Analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society*. 268: 2575-2584.
35. Klug, W; Cummings, M; y C. Spencer. 2005. *Conceptos de genética*. 8va. Edición. Editorial Prentice Hall.
36. La Manna, V; La Terza, A; Ghezzi, S; Saravanaperumal, S; Apaza, N; Huanca, T; Bozzi, R; C. Renieri. 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*. 10:60.
37. Lang, K; Wang, Y; y P. Saskatchewan. 1996. Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *International Society for Animal Genetics*. 27: 285-294.
38. Litt, M; y J. Luty. 1989. A hyper variable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*. 44: 397-401.
39. Marin, J.C., Zapata, B., Gonzalez, B.A., Bonacic, C., Wheeler, J.C., Casey, C., Bruford, M.W., Palma, R.E., Poulin, E., Alliende, M.A; y A. Spotorno. 2007b. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural*. 80, 121–140.

40. Marklund, S; Ellegren, H; Ericsson, S; Sandberg, A; y L. Anderson. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*, 25: 19-23.
41. Marshall, T; Slate, J; Krukk, L; y J. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 7: 639-655
42. Maquera, F. 1991. Caracterización y persistencia fenotípica en llamas Karas y Lanuda del Centro Experimental La Raya-Puno. Escuela de Post-Grado. Especialidad en Producción animal. UNALM. Perú. Pp 9-29.
43. Maté, M; Bustamante, A; Giovambattista, G; De Lamo, D; von Thungen, J; Zambelli, A; y L. Vidal-Rioja. 2005. Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. *Animal Genetics*. 36: 316-321.
44. Missiaggia, A; y D. Grattapaglia. 2006. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers *Genetics and Molecular Research*. 5: 72-78.
45. Moritz, C. 1999. Conservations units and translocations: strategies for evolutionary processes. *Hereditas*. 130: 217-228
46. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Science*. 70: 3321-3323.
47. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
48. Neilan, B; Wilton, A; y D. Jacobs. 1997. A universal procedure for primer labeling of amplicons. *Nucleic Acids Research*. 25: 2938-2939.

49. Oblessuc, P; Campos, T; Cardoso, K; Sforça, A; Baroni, M; Souza, P; y L. Benchimol. 2009. Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 44:638-644.
50. Oetting, S; Lee, K; Flanders, J; Weisner, L; Sellers, A; y A. King. 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed cebador. *Genomics* 30: 450-458
51. Packer, B; Yeager, M; Staats, B; Welch, R; Crenshaw, A; Kiley, M; Eckert, A; Beerman, M; Miller, E; Bergen, A; Rothman, N; Strausberg, R; y S. Chanock. 2004. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation and assay development for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Research*. Vol. 32.
52. Pemberton, M; Slate, J; Bancroft, R; y A. Barrett. 1995. Non-amplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*. 4: 249- 52
53. Penedo, C; R. Caetano; I. Cordova. 1998. Microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics* 29: 398-413.
54. Penedo, M; Caetano, A; y K. Córdova. 1999a. Eight microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics*. 30: 166-167.
55. Penedo, M; Caetano, A; y K. Córdova. 1999b. Six microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics*. 30: 399.
56. Piñero, D. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435.

57. Quispe, C; Rodríguez, R; Iñiguez, L; y J. Mueller. 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*. 45: 1-14.
58. Raymond, M; y F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.
59. Revista Institucional Agroinnova-INIA. Año 2 Edición Nro. 7. 2011
60. Sambrook, J; y W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3Erd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. Sarno, R; David, V; Franklin, W; O'brien, S; y W. Johnson. 2000. Development of microsatellite markers in the guanaco, *Lama guanicoe*: utility for South American camelids. *Molecular Ecology*. 9: 1922-1924.
62. Sarno, R; Franklin, W; O'brien, S; y W. Johnson. 2001. Patterns of mtDNA and microsatellite variation in an island and mainland population of guanacos in southern Chile. *Animal Conservation*. 4: 93-101.
63. Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18: 233-234
64. Shimada, M; y I. Shimada. 1985. Prehistoric Llama Breeding and Herding on the North Coast of Peru. *Society for American Archaeology*. 50: 3-26.
65. Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
66. Tóh, G; Gáspari, Z; y J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

67. Vallejo, A. 2008. Impacto de diferentes sistemas de manejo en la estructura genético poblacional de *Vicugna vicugna*. Tesis para optar grado de Magister en Ciencias. UNALM. Perú.
68. Vélez, D. 2007. Estudio de un sistema de marcadores microsátélites para la protección y defensa legal de variedades de vid (*Vitis vinifera L.*). Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. España.
69. Vila, B. 2004. Camellos sin joroba. Ediciones Colihue. Argentina. Pp 32-71
70. Weber, J; y P. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics. 44: 388-396.
71. Wheeler, J. 1995. Evolution and present situation of South American Camelidae. Biological Journal of the Linnean Society. 54: 271 – 295.
72. Wheeler, J; Lounes, C; y W. Bruford. 2004. Genetic Analysis of the Origin of Domestic South American Camelids. Chapter 23.
73. Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.
74. Wilson, D; y D. Reeder. 2005. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. 3ra. Edición. Pp 646-648.
75. Wing E. S. 1977. Animal domestication in the Andes. In Origins of Agriculture. The Hague: Mouton, pp. 387-859.
76. Yañez, V. 2002. Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares Microsátélites a partir de la construcción de Librerías Genómicas Enriquecidas de Camote (*Ipomoea batatas (L.) Lam*). Tesis presentada para optar el título de Biólogo. UNMSM. Lima, Perú.

## VIII. ANEXOS

**ANEXO I.** Datos de colecta de cada llama seleccionada del Banco de Germoplasma de Quimsachata.

<b>N°</b>	<b>CODIGO MUESTRA LABORATORIO</b>	<b>ID(N° ARETE)</b>	<b>SEXO</b>	<b>FENOTIPO</b>	<b>COLOR</b>
1	LG-001	166204	H	Cc	negro
2	LG-002	316306	H	Cc	cafe oscuro
3	LG-003	406	M	Ch	cafe
4	LG-004	149206	H	Cc	gris
5	LG-005	025106	M	Cc	cafe claro
6	LG-006	031106	M	Cc	gris manchado
7	LG-007	019105	H	Cc	blanco manchado
8	LG-008	077106	M	Ch	gris
9	LG-009	194206	M	Cc	gris con blanco
10	LG-010	226205	H	Cc	blanco
11	LG-011	092106	M	Ch	pibul
12	LG-012	101103	M	Ch	pibul
13	LG-013	150206	M	Cc	negro con blanco
14	LG-014	193106	H	Cc	blanco
15	LG-015	248305	H	Cc	gris cafe
16	LG-016	139206	M	Cc	gris
17	LG-017	052105	M	Cc	cafe claro
18	LG-018	027103	H	Cc	blanco manchado
19	LG-019	339306	H	Cc	negro manchado
20	LG-020	285206	M	Cc	cafe oscuro con blanco
21	LG-021	140206	M	Cc	cafe oscuro
22	LG-022	136206	M	Cc	pibul
23	LG-023	148206	M	Cc	cafe claro
24	LG-024	022104	H	Cc	cafe

25	LG-025	197203	H	Cc	negro
26	LG-026	285206	M	Cc	cafe oscuro con blanco
27	LG-027	072101	H	Cc	pibul
28	LG-028	820200	H	Cc	pibul
29	LG-029	145206	M	Ch	cafe claro
30	LG-030	244305	H	Cc	cafe blanco
31	LG-031	067106	M	Cc	cafe
32	LG-032	068106	M	Cc	blanco
33	LG-033	308306	M	Cc	blanco
34	LG-034	057106	H	Cc	blanco manchado
35	LG-035	065204	H	Cc	cafe claro
36	LG-036	191206	M	Ch	APU
37	LG-037	017106	H	Cc	gris manchado
38	LG-038	217305	H	Ch	
39	LG-039	277206	H	Cc	pibul
257	LG-040	295409	H	Cc	pibul
41	LG-041	360306	H	Cc	cafe
42	LG-042	154206	M	Cc	cafe claro
256	LG-043	288409	H	Cc	café
44	LG-044	301306	H	Cc	pibul
45	LG-045	284206	M	Cc	cafe oscuro con blanco
255	LG-046	282409	H	Cc	LF
47	LG-047	239203	H	Cc	
48	LG-048	013105	H	Cc	blanco
49	LG-049	068103	H	Cc	gris
50	LG-050	32306	M	Ch	
54	LG-051	028104	H	Ch	blanco
55	LG-052	041104	M	Cc	café
56	LG-053	089204	M	Ch	blanco
57	LG-054	158204	H	Ch	café
58	LG-055	161204	M	Ch	café
59	LG-056	031205	H	Ch	
60	LG-057	040105	M	Ch	pibul
61	LG-058	043105	H	Ch	café claro
62	LG-059	061105	H	Ch	blanco
63	LG-060	077105	H	Cc	café
64	LG-061	098205	H	Ch	gris
65	LG-062	104205	H	Ch	blanco
66	LG-063	127205	H	Cc	cafe claro
67	LG-064	131205	M	Ch	gris

68	LG-065	177205	H	Cc	pibul
69	LG-066	233305	H	Cc	pibul
70	LG-067	240305	H	Cc	café claro
71	LG-068	270305	H	Cc	blanco
72	LG-069	0206	M	Ch	cafe con blanco
73	LG-070	0506	M	Cc	café oscuro
74	LG-071	606	M	Cc	gris
75	LG-072	806	M	Cc	cafe
76	LG-073	001106	M	Cc	café
77	LG-074	017106	M	Ch	pibul
78	LG-075	041106	H	Cc	blanco
79	LG-076	055106	H	Cc	blanco
80	LG-077	063106	H	Cc	café oscuro
81	LG-078	069106	M	Ch	negro
82	LG-079	076106	M	Cc	café con gris
83	LG-080	077106	M	Ch	gris
84	LG-081	080106	M	Cc	café
85	LG-082	099106	M	Cc	blanco con gris
86	LG-083	114206	M	Cc	café claro
87	LG-084	120206	H	Ch	blanco
88	LG-085	121206	H	Cc	café claro
89	LG-086	145206	M	Ch	café claro
90	LG-087	184206	H	Cc	negro con blanco
259	LG-088	303409	H	Cc	café
92	LG-089	196206	H	Ch	gris
93	LG-090	207206	H	Ch	café oscuro
94	LG-091	213206	M	Ch	café con blanco
95	LG-092	215206	M	Cc	blanco
96	LG-093	227206	H	Cc	pibul
97	LG-094	230206	H	Cc	blanco
98	LG-095	233206	M	Cc	café
99	LG-096	234206	H	Cc	café con gris
100	LG-097	237206	H	Cc	blanco
101	LG-098	239206	M	Cc	blanco
102	LG-099	242206	H	Cc	pibul
103	LG-100	258206	M	Cc	pibul
104	LG-101	264206	H	Cc	café
105	LG-102	279206	H	Ch	pibul
106	LG-103	280206	H	Ch	café
107	LG-104	289206	M	Cc	blanco
108	LG-105	309306	H	Ch	café claro

109	LG-106	350306	H	Cc	café
110	LG-107	015107	M	Cc	blanco
111	LG-108	024107	M	Cc	café
112	LG-109	036107	H	Cc	blanco
113	LG-110	057207	H	Ch	café oscuro
114	LG-111	066207	H	Ch	pibul
115	LG-112	071207	M	Ch	blanco
116	LG-113	091207	H	Cc	café
117	LG-114	101207	H	Cc	negro
118	LG-115	123207	H	Ch	café
119	LG-116	125207	H	Cc	blanco
120	LG-117	153207	H	Ch	gris
121	LG-118	193207	H	Cc	pibul
122	LG-119	234307	H	Cc	café rojizo
123	LG-120	247307	H	Ch	café claro
124	LG-121	296407	H	Ch	pibul
125	LG-122	011108	H	Ch	café oscuro
126	LG-123	016108	H	Cc	gris
127	LG-124	020108	M	Cc	café
128	LG-125	021108	H	Cc	blanco
129	LG-126	025108	H	Cc	café claro
130	LG-127	044108	H	Cc	café
131	LG-128	048108	M	Cc	gris
132	LG-129	053108	M	Cc	gris
133	LG-130	054108	H	Ch	blanco
134	LG-131	060108	H	Cc	gris
135	LG-132	068108	M	Ch	gris
136	LG-133	070108	H	Cc	blanco
137	LG-134	072208	H	Ch	pibul cara con manchas
138	LG-135	076208	M	Cc	gris
139	LG-136	082208	H	Ch	pibul
140	LG-137	087208	H	Ch	café oscuro
141	LG-138	092208	M	Cc	gris
142	LG-139	110208	H	Cc	café
143	LG-140	111208	H	Cc	café
144	LG-141	120208	M	Cc	café
145	LG-142	121208	H	Ch	café
146	LG-143	125208	H	Ch	negro
147	LG-144	127208	M	Cc	blanco
148	LG-145	131208	H	Ch	blanco cara manchada

149	LG-146	134208	H	Cc	blanco
150	LG-147	155208	H	Ch	café claro
151	LG-148	161208	M	Cc	café
152	LG-149	170308	H	Cc	blanco
153	LG-150	173308	H	Cc	café oscuro
154	LG-151	198308	H	Ch	café
155	LG-152	199308	H	Cc	café claro
156	LG-153	201308	H	Cc	blanco
157	LG-154	208308	H	Ch	café
158	LG-155	217308	H	Ch	LF
159	LG-156	222308	M	Cc	gris
160	LG-157	230308	H	Ch	blanco
161	LG-158	234308	H	Ch	blanco
162	LG-159	236308	H	Ch	café oscuro
163	LG-160	243308	H	Ch	café blanco
164	LG-161	244308	H	Cc	negro
165	LG-162	248308	H	Ch	café blanco
166	LG-163	255408	M	Cc	blanco
167	LG-164	001109	H	Cc	café blanco
168	LG-165	002109	M	Cc	pibul
169	LG-166	003109	H	Ch	café blanco
170	LG-167	007109	M	Ch	café
258	LG-168	296409	H	Cc	café claro
172	LG-169	012109	M	Cc	pibul
173	LG-170	015109	H	Cc	gris
174	LG-171	020109	H	Cc	café
175	LG-172	021109	M	Cc	gris
176	LG-173	023109	H	Ch	café
177	LG-174	029109	M	Cc	café
178	LG-175	042109	H	Ch	café
179	LG-176	044109	M	Ch	negro
180	LG-177	045109	M	Ch	café
181	LG-178	047109	H	Ch	café gris
182	LG-179	052109	H	Ch	pibul
183	LG-180	057209	H	Cc	café
184	LG-181	059209	M	Cc	gris
185	LG-182	061209	H	Cc	café oscuro
186	LG-183	066209	H	Ch	pibul
187	LG-184	070209	H	Cc	café claro
188	LG-185	072209	H	Cc	café con blanco

189	LG-186	073209	H	Cc	café con blanco
190	LG-187	075209	H	Cc	café
191	LG-188	080209	H	Cc	blanco
192	LG-189	086209	H	Cc	café manchado
193	LG-190	092209	H	Cc	pibul
194	LG-191	095209	H	Cc	pibul
195	LG-192	104209	H	Cc	pibul
196	LG-193	106209	H	Ch	pibul
197	LG-194	107209	H	Cc	café manchado
198	LG-195	110209	H	Cc	blanco
199	LG-196	119209	H	Cc	blanco manchado
200	LG-197	120209	H	Cc	café gris
201	LG-198	122209	M	Ch	LF
202	LG-199	129209	H	Ch	café
203	LG-200	131209	M	Cc	café
204	LG-201	132209	H	Ch	pibul
205	LG-202	136209	H	Ch	café claro
206	LG-203	137209	H	Ch	café oscuro
207	LG-204	138209	H	Cc	blanco-pivul
208	LG-205	140209	H	Cc	café blanco
209	LG-206	146209	H	Ch	café oscuro
210	LG-207	150209	H	Cc	café
211	LG-208	155209	H	Cc	blanco
212	LG-209	156209	H	Cc	café blanco
213	LG-210	157209	H	Ch	pibul
214	LG-211	158209	M	Ch	café
215	LG-212	161209	H	Cc	gris
216	LG-213	165309	H	Cc	café
217	LG-214	166309	M	Cc	gris
218	LG-215	167309	H	Cc	café
219	LG-216	170309	H	Ch	café claro
220	LG-217	175309	H	Ch	café blanco
221	LG-218	176309	H	Ch	café
222	LG-219	181309	H	Cc	café oscuro
223	LG-220	183309	H	Ch	café oscuro
224	LG-221	187309	H	Ch	café blanco
225	LG-222	189309	H	Cc	café
226	LG-223	190309	H	Ch	café oscuro
227	LG-224	192309	H	Ch	café blanco
228	LG-225	194309	H	Cc	café
229	LG-226	195309	H	Cc	blanco

230	LG-227	199309	H	Cc	café gris
231	LG-228	200309	H	Cc	café oscuro
232	LG-229	204309	M	Cc	café
233	LG-230	205309	H	Ch	café
234	LG-231	207309	H	Cc	café claro
235	LG-232	217309	H	Cc	gris
236	LG-233	222309	H	Cc	LF
237	LG-234	224309	H	Cc	blanco
238	LG-235	225309	H	Cc	gris
239	LG-236	227309	H	Ch	café
240	LG-237	232309	H	Cc	negro con blanco
241	LG-238	234309	H	Cc	blanco
242	LG-239	235309	M	Ch	café
243	LG-240	238309	H	Ch	blanco
244	LG-241	239309	H	Cc	blanco
245	LG-242	245309	H	Ch	blanco
246	LG-243	246309	H	Ch	café
247	LG-244	260409	H	Cc	café
248	LG-245	261409	H	Ch	café con blanco
249	LG-246	269409	H	Ch	pibul
250	LG-247	270409	H	Ch	café
251	LG-248	273409	H	Ch	café
252	LG-249	275409	H	Cc	negro con blanco
253	LG-250	279409	H	Ch	café claro
254	LG-251	281409	H	Cc	café

**ANEXO II.** Concentración y Calidad del ADN Stock.

#	MUESTRA	Volumen Inicial	Nucleic Acid Conc. (ng/μl)	[ ] FINAL	Volumen Final	ADN (μL)	AGUA (μL)	260/280	260/230	ADN restante
1	LG-002A	50	46.8	25	100	53.42	46.58	1.76	1.95	3.42
2	LG-002B	50	15.8	25	100	158.23	58.23	2.02	1.65	108.23
3	LG-003A	50	178.9	25	200	27.95	172.05	1.83	1.47	22.05
4	LG-003B	50	189.3	25	200	26.41	173.59	1.81	1.48	23.59
5	LG-004A	50	97.8	25	100	25.56	74.44	1.79	2.18	24.44
6	LG-004B	50	23.4	25	100	106.84	-6.84	1.66	1.35	-56.84
7	LG-005A	50	62.9	25	100	39.75	60.25	1.72	1.61	10.25
8	LG-005B	50	35.9	25	100	69.64	30.36	1.51	1.04	-19.64
9	LG-006A	50	66.3	25	100	37.71	62.29	1.83	2.04	12.29
10	LG-006B	50	20.7	25	100	120.77	20.77	1.68	1.71	70.77
11	LG-008A	50	153.4	25	200	32.59	167.41	1.87	1.49	17.41
12	LG-008B	50	146.4	25	200	34.15	165.85	1.89	1.51	15.85
13	LG-010A	50	86.6	25	100	28.87	71.13	1.8	2.35	21.13
14	LG-010B	50	21.1	25	100	118.48	18.48	1.89	1.99	68.48
15	LG-011A	50	149.7	25	200	33.40	166.60	1.92	1.51	16.60
16	LG-011B	50	123.4	25	100	20.26	79.74	1.94	1.44	29.74
17	LG-012A	50	968.6	25	200	5.16	194.84	1.65	1.92	44.84
18	LG-012B	50	376.2	25	200	13.29	186.71	1.56	1.67	36.71
19	LG-014A	50	53.4	25	100	46.82	53.18	1.76	2.03	3.18
20	LG-014B	50	17.8	25	100	140.45	-40.45	1.76	1.59	-90.45
21	LG-016A	50	45.5	25	100	54.95	45.05	1.76	1.89	-4.95
22	LG-016B	50	18	25	100	138.89	38.89	1.74	1.62	88.89
23	LG-017A	50	71.7	25	100	34.87	65.13	1.7	1.45	15.13

24	LG-017B	50	17.3	25	100	144.51	44.51	1.76	1.59	94.51
25	LG-021A	50	503	25	200	9.94	190.06	1.29	1.6	40.06
26	LG-021B	50	561.1	25	200	8.91	191.09	1.86	2.02	41.09
27	LG-029A	50	84.4	25	100	29.62	70.38	1.95	1.35	20.38
28	LG-029B	50	96.2	25	100	25.99	74.01	1.94	1.33	24.01
29	LG-036A	50	245.6	25	200	20.36	179.64	1.81	1.67	29.64
30	LG-036B	50	233.4	25	200	21.42	178.58	1.82	1.65	28.58
31	LG-051A	80	99.8	25	100	25.05	74.95	1.87	1.51	54.95
32	LG-051B	80	62.7	25	100	39.87	60.13	1.91	1.23	40.13
33	LG-052A	80	94.1	25	100	26.57	73.43	1.89	1.45	53.43
34	LG-052B	50	164.9	25	100	15.16	84.84	1.82	1.7	34.84
35	LG-053A	50	65.9	25	100	37.94	62.06	1.91	1.22	12.06
36	LG-053B	50	130.3	25	100	19.19	80.81	1.85	1.55	30.81
37	LG-054A	30	24.1	25	100	103.73	3.73	2	0.56	73.73
38	LG-054B	30	14.8	25	100	168.92	68.29	1.98	0.4	-138.92
39	LG-055A	30	-0.4	25	100	62.50	37.50	1.8	1.82	32.50
40	LG-055B	30	5.6	25	100	446.43	346.36	2.65	0.19	416.63
41	LG-056A	30	16.7	25	100	149.70	-49.70	1.98	0.49	119.70
42	LG-056B	30	34.5	25	100	72.46	27.54	1.94	0.83	42.46
43	LG-057A	30	11.8	25	100	211.86	111.86	1.97	0.38	181.86
44	LG-057B	30	154.2	25	100	16.21	83.79	1.81	1.64	13.79
45	LG-058A	30	5	25	100	500.00	400.00	2.17	0.16	470.00
46	LG-058B	30	11.4	25	100	219.30	119.30	2.01	0.35	189.30
47	LG-059A	30	2	25	100	125.00	11.50	1.98	1.71	95.00
48	LG-059B	30	0.6	25	100	41.66	40.66	1.97	0.02	-11.66
49	LG-060A	30	31.5	25	100	79.37	20.63	1.94	0.96	-49.37
50	LG-060B	30	27.7	25	100	90.25	9.75	2	0.76	60.25
51	LG-061A	50	127	25	100	19.69	80.31	1.85	1.59	30.31

52	LG-061B	30	184	25	100	13.59	86.41	1.79	1.71	16.41
53	LG-062A	80	105	25	100	23.81	76.19	1.87	1.5	56.19
54	LG-062B	50	155.9	25	100	16.04	83.96	1.82	1.68	33.96
55	LG-063A	30	54.4	25	100	45.96	54.04	1.93	1.04	15.96
56	LG-063B	30	82.4	25	100	30.34	69.66	1.84	1.29	-0.34
57	LG-064A	30	24.1	25	100	103.73	-3.73	2.05	0.57	-73.73
58	LG-064B	30	55.5	25	100	45.05	54.95	1.93	1.06	-15.05
59	LG-065A	50	129.9	25	100	19.25	80.75	1.86	1.57	30.75
60	LG-065B	50	269.3	25	100	9.28	90.72	1.71	1.76	40.72
61	LG-066A	50	118.1	25	100	21.17	78.83	1.85	1.59	28.83
62	LG-066B	50	113.7	25	100	21.99	78.01	1.86	1.5	28.01
63	LG-067A	50	81.7	25	100	30.60	69.40	1.92	1.37	19.40
64	LG-067B	30	57.3	25	100	43.63	56.37	1.89	1.77	-13.63
65	LG-068A	50	188.3	25	100	13.28	86.72	1.78	1.69	36.72
66	LG-068B	50	242.7	25	100	10.30	89.70	1.71	1.93	39.70
67	LG-069A	30	7.9	25	100	316.46	-216.46	10.56	0.41	-286.46
68	LG-069B	30	25	25	100	100.00	0.00	2.4	1	-70.00
69	LG-070A	30	21.6	25	100	115.74	-15.74	1.85	0.68	-85.74
70	LG-070B	30	2.9	25	100	862.07	-762.07	-2.62	0.29	-832.07
71	LG-070B	30	2.3	25	100	1086.96	-986.96	-3.3	0.25	-1056.96
72	LG-071A	50	83.3	25	100	30.01	69.99	1.95	1.78	19.99
73	LG-071B	50	102.5	25	100	24.39	75.61	1.92	1.91	25.61
74	LG-072A	30	1.2	25	100	2083.33	-1983.33	-0.84	0.11	-2053.33
75	LG-072B	30	6.7	25	100	373.13	-273.13	18.68	0.45	-343.13
76	LG-073A	30	9.6	25	100	260.42	-160.42	1.82	0.5	-230.42
77	LG-073B	30	5.9	25	100	423.73	-323.73	2.16	0.29	-393.73
78	LG-074A	30	50.1	25	100	49.90	50.10	1.62	1.1	-19.90
79	LG-074B	30	63.1	25	100	39.62	60.38	1.57	0.93	-9.62

80	LG-075A	30	60.8	25	100	41.12	58.88	1.78	1.55	-11.12
81	LG-075B	30	360	25	100	6.94	93.06	0.93	1.02	23.06
82	LG-076A	30	17	25	100	147.06	-47.06	2.55	0.87	-117.06
83	LG-076B	30	16.8	25	100	148.81	-48.81	2.01	0.54	-118.81
84	LG-077A	30	30.5	25	100	81.97	18.03	2.2	1.12	-51.97
85	LG-077B	30	124.9	25	100	20.02	79.98	1.24	0.66	9.98
86	LG-078A	30	49.9	25	100	50.10	49.90	0.62	0.22	-20.10
87	LG-078B	50	243.7	25	100	10.26	89.74	1.69	1.3	39.74
88	LG-079A	30	141.1	25	100	17.72	82.28	1.21	0.84	12.28
89	LG-079B	30	11.1	25	100	225.23	-125.23	2.47	0.5	-195.23
90	LG-080A	30	15.6	25	100	160.26	-60.26	3.02	0.74	-130.26
91	LG-080B	30	41.4	25	100	60.39	39.61	1.88	1.16	-30.39
92	LG-081A	30	-2.2	25	100	-1136.36	1236.36	0.77	-0.09	1166.36
93	LG-081B	30	-3.4	25	100	-735.29	835.29	1.29	-0.12	765.29
94	LG-082A	30	-1.3	25	100	-1923.08	2023.08	0.62	-0.05	1953.08
95	LG-082B	30	-2.4	25	100	-1041.67	1141.67	0.87	-0.09	1071.67
96	LG-083A	30	13.3	25	100	187.97	-87.97	2.3	0.34	-157.97
97	LG-083B	30	59.3	25	100	42.16	57.84	1.94	1.14	-12.16
98	LG-084A	30	5.6	25	100	446.43	-346.43	3.27	0.21	-416.43
99	LG-084B	30	58.7	25	100	42.59	57.41	2.01	1.19	-12.59
100	LG-085A	30	9.1	25	100	274.73	-174.73	2.33	0.34	-244.73
101	LG-085B	30	0.9	25	100	2777.78	-2677.78	-0.58	0.03	-2747.78
102	LG-086A	30	36.3	25	100	68.87	31.13	2.05	0.91	-38.87
103	LG-086B	30	24.6	25	100	101.63	-1.63	2.04	0.69	-71.63
104	LG-087A	30	21	25	100	119.05	-19.05	2.11	0.64	-89.05
105	LG-087B	30	27	25	100	92.59	7.41	2.12	0.74	-62.59
106	LG-088A	30	40.6	25	100	61.58	38.42	1.97	0.95	-31.58
107	LG-088B	30	40.2	25	100	62.19	37.81	1.95	0.86	-32.19

108	LG-089A	80	65.8	25	100	37.99	62.01	1.93	1.26	42.01
109	LG-089B	50	68.7	25	100	36.39	63.61	1.9	1.16	13.61
110	LG-090A	80	204.7	25	100	12.21	87.79	1.8	1.74	67.79
111	LG-90B	80	116.3	25	100	21.50	78.50	1.84	1.57	58.50
112	LG-91A	50	55.6	25	100	44.96	55.04	1.92	1.12	5.04
113	LG-91B	80	170.6	25	100	14.65	85.35	1.8	1.68	65.35
114	LG-92A	100	183.4	25	100	13.63	86.37	1.79	1.7	86.37
115	LG-92B	80	61.1	25	100	40.92	59.08	1.93	1.13	39.08
116	LG-93A	100	144.4	25	100	17.31	82.69	1.82	1.6	82.69
117	LG-93B	80	98.2	25	100	25.46	74.54	1.86	1.39	54.54
118	LG-94A	100	156.7	25	100	15.95	84.05	1.8	1.66	84.05
119	LG-94B	100	101.8	25	100	24.56	75.44	1.85	1.48	75.44
120	LG-95A	100	62.4	25	100	40.06	59.94	1.91	1.19	59.94
121	LG-95B	80	36.1	25	100	69.25	30.75	2.02	0.88	10.75
122	LG-96A	80	61.2	25	100	40.85	59.15	1.83	0.69	39.15
123	LG-96B	80	18.1	25	100	138.12	-38.12	2.08	0.54	-58.12
124	LG-97A	50	58.3	25	100	42.88	57.12	1.92	1.12	7.12
125	LG-97B	50	78.6	25	100	31.81	68.19	1.85	1.33	18.19
126	LG-98A	30	17.4	25	100	143.68	-43.68	2.07	0.41	-113.68
127	LG-98B	50	170.2	25	100	14.69	85.31	1.76	1.67	35.31
128	LG-99A	30	26.9	25	100	92.94	7.06	2.02	0.68	-62.94
129	LG-99B	30	22.9	25	100	109.17	-9.17	1.99	0.54	-79.17
130	LG-100A	30	97.2	25	100	25.72	74.28	1.79	1.3	4.28
131	LG-100B	30	7.5	25	100	333.33	-233.33	2.6	0.21	-303.33
132	LG-101A	50	262.9	25	100	9.51	90.49	1.72	1.78	40.49
133	LG-101B	50	5.9	25	100	423.73	-323.73	3.14	0.19	-373.73
134	LG-102A	30	122.9	25	100	20.34	79.66	1.84	1.49	9.66
135	LG-102B	30	8.1	25	100	308.64	-208.64	2.55	0.26	-278.64

136	LG-103A	30	14.4	25	100	173.61	-73.61	2.27	0.37	-143.61
137	LG-103B	30	19.1	25	100	130.89	-30.89	2.09	0.49	-100.89
138	LG-104A	30	22	25	100	113.64	-13.64	2.08	0.56	-83.64
139	LG-104B	30	12.1	25	100	206.61	-106.61	2.31	0.34	-176.61
140	LG-105A	50	21.7	25	100	115.21	-15.21	2.2	0.57	-65.21
141	LG-105B	50	5.3	25	100	471.70	-371.70	3.63	0.18	-421.70
142	LG-106A	50	73.9	25	100	33.83	66.17	1.9	1.25	16.17
143	LG-106B	50	222.9	25	100	11.22	88.78	1.75	1.74	38.78
144	LG-107A	50	196	25	100	12.76	87.24	1.77	1.73	37.24
145	LG-107B	50	141.1	25	100	17.72	82.28	1.8	1.58	32.28
146	LG-108A	30	237	25	100	10.55	89.45	1.63	1.61	19.45
147	LG-108B	30	93.3	25	100	26.80	73.20	1.89	1.26	3.20
148	LG-109A	30	302.6	25	100	8.26	91.74	1.65	1.75	21.74
149	LG-110A	30	105.9	25	100	23.61	76.39	1.77	1.33	6.39
150	LG-110B	30	59.7	25	100	41.88	58.12	1.91	1.09	-11.88
151	LG-111A	30	15.1	25	100	165.56	-65.56	2.17	0.38	-135.56
152	LG-111B	30	24.6	25	100	101.63	-1.63	1.99	0.6	-71.63
153	LG-112A	30	15	25	100	166.67	-66.67	2.32	0.39	-136.67
154	LG-112B	30	6.1	25	100	409.84	-309.84	2.96	0.19	-379.84
155	LG-113A	30	13.2	25	100	189.39	-89.39	2.15	0.38	-159.39
156	LG-113B	30	18.1	25	100	138.12	-38.12	2.15	0.48	-108.12
157	LG-114A	30	148	25	100	16.89	83.11	1.82	1.61	13.11
158	LG-114B	30	184.1	25	100	13.58	86.42	1.75	1.58	16.42
159	LG-115A	30	1.1	25	100	2272.73	-2172.73	3.41	0.03	-2242.73
160	LG-115B	30	-0.2	25	100	-12500.00	12600.00	0.24	-0.01	12530.00
161	LG-116A	50	149.2	25	100	16.76	83.24	1.82	1.56	33.24
162	LG-116B	50	20.7	25	100	120.77	-20.77	2.04	0.55	-70.77
163	LG-117A	50	34.9	25	100	71.63	28.37	1.95	0.87	-21.63

164	LG-117B	50	12.8	25	100	195.31	-95.31	2.34	0.36	-145.31
165	LG-118A	50	135	25	100	18.52	81.48	1.84	1.52	31.48
166	LG-118B	50	177.2	25	100	14.11	85.89	1.77	1.59	35.89
167	LG-119A	50	89.9	25	100	27.81	72.19	1.89	1.29	22.19
168	LG-119B	30	276.5	25	100	9.04	90.96	1.7	1.75	20.96
169	LG-120A	50	20.9	25	100	119.62	-19.62	2.14	0.54	-69.62
170	LG-120B	50	71.9	25	100	34.77	65.23	1.87	1.15	15.23
171	LG-121A	30	34	25	100	73.53	26.47	1.98	0.66	-43.53
172	LG-121B	30	21	25	100	119.05	-19.05	1.98	0.52	-89.05
173	LG-122A	50	152	25	100	16.45	83.55	1.8	1.6	33.55
174	LG-122B	50	70.3	25	100	35.56	64.44	1.84	1.94	14.44
175	LG-123A	80	245.3	25	100	10.19	89.81	1.61	1.66	69.81
176	LG-123B	80	29.5	25	100	84.75	15.25	2.08	0.74	-4.75
177	LG-124A	80	70.1	25	100	35.66	64.34	1.57	1.28	44.34
178	LG-124B	50	100.2	25	100	24.95	75.05	1.9	1.41	25.05
179	LG-125A	80	308.8	25	100	8.10	91.90	1.66	1.75	71.90
180	LG-125B	80	133.6	25	100	18.71	81.29	1.86	1.55	61.29
181	LG-126A	50	40.3	25	100	62.03	37.97	2.06	0.92	-12.03
182	LG-126B	50	73.4	25	100	34.06	65.94	1.95	1.19	15.94
183	LG-127A	80	285.8	25	100	8.75	91.25	1.69	1.8	71.25
184	LG-127B	50	161.4	25	100	15.49	84.51	1.82	1.56	34.51
185	LG-128A	80	293.5	25	100	8.52	91.48	1.66	1.73	71.48
186	LG-128B	100	378	25	100	6.61	93.39	1.5	1.67	93.39
187	LG-129A	80	166	25	100	15.06	84.94	1.81	1.65	64.94
188	LG-129B	80	213.8	25	100	11.69	88.31	1.77	1.75	68.31
189	LG-130A	50	33.8	25	100	73.96	26.04	1.98	0.78	-23.96
190	LG-130B	80	44.8	25	100	55.80	44.20	1.94	0.94	24.20
191	LG-131A	50	181.7	25	100	13.76	86.24	1.78	1.62	36.24

192	LG-131B	30	20.8	25	100	120.19	-20.19	2.04	0.49	-90.19
193	LG-132A	80	129.1	25	100	19.36	80.64	1.83	1.47	60.64
194	LG-132B	50	33.4	25	100	74.85	25.15	2.01	0.71	-24.85
195	LG-133A	80	147.8	25	100	16.91	83.09	1.81	1.62	63.09
196	LG-133B	80	182.9	25	100	13.67	86.33	1.79	1.66	66.33
197	LG-134A	80	39	25	100	64.10	35.90	1.85	0.98	15.90
198	LG-134B	80	28.6	25	100	87.41	12.59	1.98	0.7	-7.41
199	LG-135A	100	262.8	25	100	9.51	90.49	1.69	1.75	90.49
200	LG-135B	100	144.9	25	100	17.25	82.75	1.79	1.55	82.75
201	LG-136A	100	123.8	25	100	20.19	79.81	1.85	1.5	79.81
202	LG-136B	100	77.8	25	100	32.13	67.87	1.83	1.2	67.87
203	LG-138A	30	77.6	25	100	32.22	67.78	1.85	1.1	-2.22
204	LG-138B	50	49.1	25	100	50.92	49.08	1.86	0.88	-0.92
205	LG-139A	50	34	25	100	73.53	26.47	1.96	0.78	-23.53
206	LG-139B	50	58.8	25	100	42.52	57.48	1.89	1.07	7.48
207	LG-140A	80	140.4	25	100	17.81	82.19	1.8	1.55	62.19
208	LG-140B	50	102.3	25	100	24.44	75.56	1.82	1.36	25.56
209	LG-141A	80	89.4	25	100	27.96	72.04	1.85	1.3	52.04
210	LG-141B	100	251.6	25	100	9.94	90.06	1.7	1.75	90.06
211	LG-141B	100	251.7	25	100	9.93	90.07	1.72	1.73	90.07
212	LG-142A	100	103.4	25	100	24.18	75.82	1.82	1.42	75.82
213	LG-142B	100	119	25	100	21.01	78.99	1.86	1.46	78.99
214	LG-143A	80	129.5	25	100	19.31	80.69	1.82	1.5	60.69
215	LG-143B	80	164.4	25	100	15.21	84.79	1.78	1.54	64.79
216	LG-144A	80	214.7	25	100	11.64	88.36	1.75	1.72	68.36
217	LG-144B	50	271.2	25	100	9.22	90.78	1.67	1.69	40.78
218	LG-145A	30	924.4	25	100	2.70	97.30	1.72	1.93	27.30
219	LG-145B	30	944.1	25	100	2.65	97.35	1.72	1.96	27.35

220	LG-146A	80	165.6	25	100	15.10	84.90	1.78	1.61	64.90
221	LG-146B	80	1169.9	25	100	2.14	97.86	1.84	2.12	77.86
222	LG-147A	50	23.5	25	100	106.38	-6.38	2.01	0.58	-56.38
223	LG-147B	30	69.4	25	100	36.02	63.98	1.87	1.12	-6.02
224	LG-148A	50	200.9	25	100	12.44	87.56	1.75	1.66	37.56
225	LG-148B	30	180.4	25	100	13.86	86.14	1.8	1.62	16.14
226	LG-149A	80	231	25	100	10.82	89.18	1.74	1.71	69.18
227	LG-149B	80	168.6	25	100	14.83	85.17	1.76	1.56	65.17
228	LG-150A	80	298.8	25	100	8.37	91.63	1.63	1.68	71.63
229	LG-150B	50	159.2	25	100	15.70	84.30	1.77	1.51	34.30
230	LG-151A	80	280.7	25	100	8.91	91.09	1.67	1.76	71.09
231	LG-151B	80	176.6	25	100	14.16	85.84	1.77	1.62	65.84
232	LG-152A	30	2.9	25	100	862.07	-762.07	3.47	0.07	-832.07
233	LG-152B	30	18.1	25	100	138.12	-38.12	1.98	0.42	-108.12
234	LG-153A	100	287.5	25	100	8.70	91.30	1.66	1.64	91.30
235	LG-153B	100	265.8	25	100	9.41	90.59	1.63	1.63	90.59
236	LG-154A	30	8.1	25	100	308.64	-208.64	2.25	0.23	-278.64
237	LG-154B	30	12.3	25	100	203.25	-103.25	2.23	0.35	-173.25
238	LG-155A	100	273.2	25	100	9.15	90.85	1.64	1.61	90.85
239	LG-155B	100	217.8	25	100	11.48	88.52	1.75	1.65	88.52
240	LG-156B	80	305.1	25	100	8.19	91.81	1.61	1.63	71.81
241	LG-158A	50	46.2	25	100	54.11	45.89	1.93	0.88	-4.11
242	LG-158B	30	54.1	25	100	46.21	53.79	1.93	0.94	-16.21
243	LG-159A	80	149.3	25	100	16.74	83.26	1.8	1.48	63.26
244	LG-159B	80	197.5	25	100	12.66	87.34	1.74	1.58	67.34
245	LG-160A	50	220.4	25	100	11.34	88.66	1.75	1.71	38.66
246	LG-160B	30	240.1	25	100	10.41	89.59	1.69	1.63	19.59
247	LG-161A	50	260.8	25	100	9.59	90.41	1.7	1.69	40.41

248	LG-161B	50	235.2	25	100	10.63	89.37	1.72	1.66	39.37
249	LG-162A	50	203.2	25	100	12.30	87.70	1.75	1.67	37.70
250	LG-162B	50	159.5	25	100	15.67	84.33	1.79	1.6	34.33
251	LG-163A	50	185.4	25	100	13.48	86.52	1.77	1.61	36.52
252	LG-163B	50	283.6	25	100	8.82	91.18	1.66	1.76	41.18
253	LG-164A	30	625	25	100	4.00	96.00	1.79	1.76	26.00
254	LG-164B	30	66.3	25	100	37.71	62.29	1.78	0.89	-7.71
255	LG-165A	30	362.2	25	100	6.90	93.10	1.53	1.59	23.10
256	LG-165B	50	282.7	25	100	8.84	91.16	1.67	1.68	41.16
257	LG-166A	30	15.6	25	100	160.26	-60.26	1.98	0.39	-130.26
258	LG-166B	30	15.6	25	100	160.26	-60.26	2.08	0.39	-130.26
259	LG-167A	80	484.8	25	100	5.16	94.84	1.79	1.92	74.84
260	LG-167B	30	30.8	25	100	81.17	18.83	1.93	0.57	-51.17
261	LG-169A	30	24.4	25	100	102.46	-2.46	1.98	0.48	-72.46
262	LG-169B	50	211.1	25	100	11.84	88.16	1.76	1.63	38.16
263	LG-170A	30	153.9	25	100	16.24	83.76	1.78	1.43	13.76
264	LG-170B	50	211.6	25	100	11.81	88.19	1.74	1.68	38.19
265	LG-171A	30	1.1	25	100	2272.73	-2172.73	-3.67	0.03	-2242.73
266	LG-171B	30	1.1	25	100	2272.73	-2172.73	-1.67	0.03	-2242.73
267	LG-172A	80	66.5	25	100	37.59	62.41	1.86	1.12	42.41
268	LG-172B	80	126.9	25	100	19.70	80.30	1.81	1.49	60.30
269	LG-173A	80	365.6	25	100	6.84	93.16	1.48	1.66	73.16
270	LG-173B	80	697.3	25	100	3.59	96.41	1.77	1.98	76.41
271	LG-174A	50	333.5	25	100	7.50	92.50	1.57	1.73	42.50
272	LG-174B	50	321.2	25	100	7.78	92.22	1.59	1.72	42.22
273	LG-175A	50	155.4	25	100	16.09	83.91	1.76	1.6	33.91
274	LG-175B	50	142.5	25	100	17.54	82.46	1.79	1.52	32.46
275	LG-176A	50	260.6	25	100	9.59	90.41	1.68	1.8	40.41

276	LG-176B	50	342	25	100	7.31	92.69	1.54	1.74	42.69
277	LG-177A	50	225.5	25	100	11.09	88.91	1.74	1.75	38.91
278	LG-177B	50	306.7	25	100	8.15	91.85	1.21	1.35	41.85
279	LG-178A	50	193.7	25	100	12.91	87.09	1.75	1.7	37.09
280	LG-178B	50	166	25	100	15.06	84.94	1.76	1.66	34.94
281	LG-179A	50	432.2	25	100	5.78	94.22	1.7	1.26	44.22
282	LG-179B	50	203.4	25	100	12.29	87.71	1.75	1.72	37.71
283	LG-180A	50	293.6	25	100	8.51	91.49	1.64	1.68	41.49
284	LG-180B	50	202.4	25	100	12.35	87.65	1.75	1.63	37.65
285	LG-181A	50	148.5	25	100	16.84	83.16	1.82	1.58	33.16
286	LG-181B	50	96.3	25	100	25.96	74.04	1.87	1.37	24.04
287	LG-182A	50	370	25	100	6.76	93.24	1.44	1.65	43.24
288	LG-182B	80	510.3	25	100	4.90	95.10	1.78	1.91	75.10
289	LG-183A	50	233.1	25	100	10.73	89.27	1.72	1.74	39.27
290	LG-183B	50	294.1	25	100	8.50	91.50	1.64	1.78	41.50
291	LG-184A	50	113.1	25	100	22.10	77.90	1.77	1.45	27.90
292	LG-184B	50	125.8	25	100	19.87	80.13	1.82	1.61	30.13
293	LG-185A	50	199.7	25	100	12.52	87.48	1.74	1.64	37.48
294	LG-185B	50	183.5	25	100	13.62	86.38	1.73	1.62	36.38
295	LG-186A	50	225.3	25	100	11.10	88.90	1.75	1.76	38.90
296	LG-186B	50	256.2	25	100	9.76	90.24	1.69	1.72	40.24
297	LG-187A	50	184.8	25	100	13.53	86.47	1.78	1.64	36.47
298	LG-187B	50	312.7	25	100	7.99	92.01	1.6	1.75	42.01
299	LG-188A	50	3.4	25	100	735.29	-635.29	13.82	0.14	-685.29
300	LG-188B	50	3.9	25	100	641.03	-541.03	5.2	0.14	-591.03
301	LG-189A	50	-1	25	100	-2500.00	2600.00	0.61	-0.04	2550.00
302	LG-189B	50	0.3	25	100	8333.33	-8233.33	-0.2	0.01	-8283.33
303	LG-190A	50	152.7	25	100	16.37	83.63	1.83	1.66	33.63

304	LG-190B	50	248.6	25	100	10.06	89.94	1.69	1.78	39.94
305	LG-191A	50	124.9	25	100	20.02	79.98	1.84	1.47	29.98
306	LG-191B	50	253.3	25	100	9.87	90.13	1.68	1.77	40.13
307	LG-192A	50	632.1	25	100	3.96	96.04	1.74	1.87	46.04
308	LG-192B	50	310.2	25	100	8.06	91.94	1.57	1.72	41.94
309	LG-193A	50	302.1	25	100	8.28	91.72	1.63	1.78	41.72
310	LG-193B	50	271.8	25	100	9.20	90.80	1.65	1.69	40.80
311	LG-194A	50	119.6	25	100	20.90	79.10	1.87	1.56	29.10
312	LG-194B	50	131.9	25	100	18.95	81.05	1.83	1.58	31.05
313	LG-195A	50	335.4	25	100	7.45	92.55	1.56	1.75	42.55
314	LG-195B	50	210.3	25	100	11.89	88.11	1.74	1.71	38.11
315	LG-196A	50	371.2	25	100	6.73	93.27	1.44	1.66	43.27
316	LG-196B	50	281.7	25	100	8.87	91.13	1.66	1.76	41.13
317	LG-197A	50	583.5	25	100	4.28	95.72	1.73	1.86	45.72
318	LG-197B	50	393.4	25	100	6.35	93.65	1.38	1.64	43.65
319	LG-198A	50	277	25	100	9.03	90.97	1.66	1.77	40.97
320	LG-198B	50	162.6	25	100	15.38	84.62	1.81	1.72	34.62
321	LG-198B	50	-1.5	25	100	-1666.67	1766.67	0.68	0.55	1716.67
322	LG-199A	50	288.2	25	100	8.67	91.33	1.62	1.85	41.33
323	LG-199B	50	281.7	25	100	8.87	91.13	1.65	1.81	41.13
324	LG-200A	50	90	25	100	27.78	72.22	1.89	1.52	22.22
325	LG-200B	50	117.4	25	100	21.29	78.71	1.86	1.57	28.71
326	LG-201A	50	263.5	25	100	9.49	90.51	1.69	1.84	40.51
327	LG-201B	50	198.5	25	100	12.59	87.41	1.77	1.73	37.41
328	LG-202A	50	3.3	25	100	757.58	-657.58	13.13	0.13	-707.58
329	LG-202B	50	3.2	25	100	781.25	-681.25	4.79	0.1	-731.25
330	LG-203A	50	270	25	100	9.26	90.74	1.66	1.68	40.74
331	LG-203B	50	332.4	25	100	7.52	92.48	1.54	1.65	42.48

332	LG-204A	50	36.1	25	100	69.25	30.75	1.99	0.93	-19.25
333	LG-204B	50	56.3	25	100	44.40	55.60	1.86	1.16	5.60
334	LG-205A	50	246.5	25	100	10.14	89.86	1.7	1.79	39.86
335	LG-205B	50	724.6	25	100	3.45	96.55	1.74	1.9	46.55
336	LG-206A	50	10.9	25	100	229.36	-129.36	2.63	0.34	-179.36
337	LG-206B	50	10.2	25	100	245.10	-145.10	2.28	0.35	-195.10
338	LG-208A	50	228.4	25	100	10.95	89.05	1.72	1.75	39.05
339	LG-208B	50	288.2	25	100	8.67	91.33	1.61	1.66	41.33
340	LG-209A	50	294.3	25	100	8.49	91.51	1.65	1.78	41.51
341	LG-209B	50	295.4	25	100	8.46	91.54	1.64	1.83	41.54
342	LG-210A	50	211.6	25	100	11.81	88.19	1.74	1.73	38.19
343	LG-210B	50	148.3	25	100	16.86	83.14	1.78	1.49	33.14
344	LG-211A	50	296.7	25	100	8.43	91.57	1.64	1.64	41.57
345	LG-211B	50	200.8	25	100	12.45	87.55	1.73	1.59	37.55
346	LG-212A	50	196.1	25	100	12.75	87.25	1.75	1.66	37.25
347	LG-212B	50	107.7	25	100	23.21	76.79	1.83	1.46	26.79
348	LG-213A	50	40.1	25	100	62.34	37.66	1.99	0.97	-12.34
349	LG-213B	50	232.6	25	100	10.75	89.25	1.72	1.72	39.25
350	LG-214A	50	379.2	25	100	6.59	93.41	1.49	1.73	43.41
351	LG-214B	50	247.1	25	100	10.12	89.88	1.71	1.76	39.88
352	LG-215A	50	765.2	25	100	3.27	96.73	1.69	1.91	46.73
353	LG-215B	50	393.4	25	100	6.35	93.65	1.38	1.6	43.65
354	LG-216A	50	269.6	25	100	9.27	90.73	1.67	1.79	40.73
355	LG-216B	50	35.4	25	100	70.62	29.38	1.99	0.75	-20.62
356	LG-217A	50	59.4	25	100	42.09	57.91	1.97	1.12	7.91
357	LG-217B	50	64.4	25	100	38.82	61.18	1.92	1.12	11.18
358	LG-218A	50	123.6	25	100	20.23	79.77	1.83	1.51	29.77
359	LG-218B	50	112.7	25	100	22.18	77.82	1.86	1.53	27.82

360	LG-219A	50	131.2	25	100	19.05	80.95	1.83	1.7	30.95
361	LG-219B	50	142.6	25	100	17.53	82.47	1.83	1.54	32.47
362	LG-220A	50	344.5	25	100	7.26	92.74	1.53	1.64	42.74
363	LG-220B	50	387.8	25	100	6.45	93.55	1.38	1.57	43.55
364	LG-221A	50	185.7	25	100	13.46	86.54	1.2	0.9	36.54
365	LG-221B	50	44.4	25	100	56.31	43.69	1.9	0.99	-6.31
366	LG-222A	50	193	25	100	12.95	87.05	1.77	1.73	37.05
367	LG-222B	50	597.4	25	100	4.18	95.82	1.77	1.94	45.82
368	LG-223A	50	244.8	25	100	10.21	89.79	1.69	1.73	39.79
369	LG-223B	50	262.2	25	100	9.53	90.47	1.68	1.68	40.47
370	LG-224A	50	179.7	25	100	13.91	86.09	1.76	1.61	36.09
371	LG-224B	30	1082.6	25	100	2.31	97.69	1.57	1.86	27.69
372	LG-225A	50	18.4	25	100	135.87	-35.87	2.35	0.57	-85.87
373	LG-225B	30	40	25	100	62.50	37.50	2.03	0.89	-32.50
374	LG-226A	50	229.9	25	100	10.87	89.13	1.73	1.8	39.13
375	LG-226B	50	251.1	25	100	9.96	90.04	1.68	1.8	40.04
376	LG-227A	50	283	25	100	8.83	91.17	1.66	1.76	41.17
377	LG-227B	50	241.7	25	100	10.34	89.66	1.72	1.78	39.66
378	LG-228A	50	229.4	25	100	10.90	89.10	1.71	1.76	39.10
379	LG-228B	80	204.4	25	100	12.23	87.77	1.76	1.77	67.77
380	LG-229A	50	344.8	25	100	7.25	92.75	1.52	1.43	42.75
381	LG-229B	80	138.9	25	100	18.00	82.00	1.81	1.6	62.00
382	LG-230A	50	266	25	100	9.40	90.60	1.66	1.74	40.60
383	LG-230B	50	281.5	25	100	8.88	91.12	1.66	1.71	41.12
384	LG-231A	50	288.9	25	100	8.65	91.35	1.65	1.81	41.35
385	LG-231B	50	275.8	25	100	9.06	90.94	1.68	1.8	40.94
386	LG-232A	50	295.2	25	100	8.47	91.53	1.63	1.8	41.53
387	LG-232B	50	270.6	25	100	9.24	90.76	1.62	1.71	40.76

388	LG-233A	50	107.6	25	100	23.23	76.77	1.83	1.4	26.77
389	LG-233B	30	49.4	25	100	50.61	49.39	1.81	0.92	-20.61
390	LG-234A	50	256.4	25	100	9.75	90.25	1.68	1.7	40.25
391	LG-234B	50	332.1	25	100	7.53	92.47	1.55	1.72	42.47
392	LG-235A	30	272.6	25	100	9.17	90.83	1.62	1.66	20.83
393	LG-235B	30	683	25	100	3.66	96.34	1.73	1.68	26.34
394	LG-236A	50	755.3	25	100	3.31	96.69	1.67	1.75	46.69
395	LG-236B	50	735.8	25	100	3.40	96.60	1.73	1.78	46.60
396	LG-237A	30	5.9	25	100	423.73	-323.73	2.38	0.17	-393.73
397	LG-237B	30	10.5	25	100	238.10	-138.10	1.88	0.26	-208.10
398	LG-238A	50	88	25	100	28.41	71.59	1.88	1.3	21.59
399	LG-238B	30	715.1	25	100	3.50	96.50	1.76	1.92	26.50
400	LG-239A	30	24.3	25	100	102.88	-2.88	2.12	0.63	-72.88
401	LG-239B	30	55	25	100	45.45	54.55	1.91	1.02	-15.45
402	LG-240A	50	257.9	25	100	9.69	90.31	0.98	0.94	40.31
403	LG-240B	50	111.2	25	100	22.48	77.52	1.82	1.35	27.52
404	LG-241A	50	253	25	100	9.88	90.12	1.67	1.68	40.12
405	LG-241B	50	258.4	25	100	9.67	90.33	1.69	1.73	40.33
406	LG-242A	50	189	25	100	13.23	86.77	1.75	1.61	36.77
407	LG-242B	50	192.7	25	100	12.97	87.03	1.75	1.71	37.03
408	LG-243A	50	289.5	25	100	8.64	91.36	1.64	1.79	41.36
409	LG-243B	50	253.8	25	100	9.85	90.15	1.66	1.75	40.15
410	LG-244A	50	86.6	25	100	28.87	71.13	1.57	1.22	21.13
411	LG-244B	50	57.3	25	100	43.63	56.37	1.81	0.96	6.37
412	LG-245A	50	309.1	25	100	8.09	91.91	1.61	1.71	41.91
413	LG-245B	50	300.3	25	100	8.33	91.67	1.6	1.62	41.67
414	LG-246A	50	148.4	25	100	16.85	83.15	1.82	1.51	33.15
415	LG-246B	50	209.9	25	100	11.91	88.09	1.72	1.65	38.09

416	LG-247A	50	224	25	100	11.16	88.84	1.74	1.8	38.84
417	LG-247B	50	74.4	25	100	33.60	66.40	1.89	1.25	16.40
418	LG-248A	50	11.8	25	100	211.86	-111.86	2.25	0.39	-161.86
419	LG-248B	50	13.3	25	100	187.97	-87.97	2.27	0.41	-137.97
420	LG-249A	50	169.6	25	100	14.74	85.26	1.78	1.58	35.26
421	LG-249B	50	133.6	25	100	18.71	81.29	1.82	1.63	31.29
422	LG-250A	50	31.4	25	100	79.62	20.38	1.98	0.88	-29.62
423	LG-250B	50	20.6	25	100	121.36	-21.36	2.17	0.58	-71.36
424	LG-251A	50	122	25	100	20.49	79.51	1.8	1.42	29.51
425	LG-251B	50	114.3	25	100	21.87	78.13	1.85	1.5	28.13
426	LG-252A	50	196.8	25	100	12.70	87.30	1.76	1.68	37.30
427	LG-252B	50	207.7	25	100	12.04	87.96	1.75	1.76	37.96
428	LG-253A	50	112.1	25	100	22.30	77.70	1.84	1.52	27.70
429	LG-253B	50	133.8	25	100	18.68	81.32	1.84	1.62	31.32
430	LG-254A	50	166.4	25	100	15.02	84.98	1.79	1.72	34.98
431	LG-254B	50	340	25	100	7.35	92.65	1.48	1.7	42.65
432	LG-255A	50	348.5	25	100	7.17	92.83	1.55	1.78	42.83
433	LG-255B	50	365.2	25	100	6.85	93.15	1.57	1.75	43.15

**ANEXO III.** Concentración y Calidad de Dilución del ADN.

<b>N°</b>	<b>CÓDIGO MUESTRA LABORATORIO</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/μL</b>
1	LG-001	0.042	0.022	1.957	42.186
2	LG-002	0.025	0.013	1.901	25.367
3	LG-003				
4	LG-004				
5	LG-005	0.014	0.007	1.914	13.643
6	LG-006	0.016	0.008	1.914	15.736
7	LG-007	0.061	0.032	1.907	60.634
8	LG-008	0.029	0.015	2.007	29.484
9	LG-009	0.012	0.006	1.841	11.849
10	LG-010	0.015	0.008	1.896	14.935
11	LG-011	0.032	0.015	2.054	31.572
12	LG-012	0.042	0.021	2.03	41.744
13	LG-013	0.03	0.015	1.94	29.895
14	LG-014	0.014	0.007	1.929	13.815
15	LG-015	0.011	0.006	1.931	11.49
16	LG-016	0.026	0.013	1.954	26.343
17	LG-017	0.019	0.01	1.935	18.694
18	LG-018	0.006	0.004	1.765	6.373
19	LG-019	0.011	0.006	1.891	10.623
20	LG-020	0.032	0.017	1.89	31.581
21	LG-021				
22	LG-022	0.03	0.016	1.89	29.627
23	LG-023	0.013	0.006	1.937	12.589
24	LG-024	0.034	0.018	1.915	34.227
25	LG-025	0.032	0.017	1.874	31.932
26	LG-026	0.03	0.016	1.861	30.031
27	LG-027	0.01	0.006	1.667	9.718
28	LG-028	0.022	0.012	1.946	22.493
29	LG-029	0.031	0.015	2.048	30.537
30	LG-030	0.014	0.007	1.986	14.485
31	LG-031	0.034	0.018	1.877	34.384
32	LG-032	0.025	0.015	1.6	24.928
33	LG-033				
34	LG-034	0.017	0.009	1.953	17.216
35	LG-035	0.011	0.005	2.02	10.607
36	LG-036	0.038	0.019	1.994	37.922
37	LG-037	0.025	0.014	1.801	25.026

38	LG-038	0.044	0.024	1.871	44.417
39	LG-039	0.035	0.019	1.87	35.023
40	LG-040	0.043	0.023	1.884	43.046
41	LG-041	0.033	0.018	1.891	33.415
42	LG-042	0.017	0.009	1.895	16.629
43	LG-043	0.017	0.009	1.92	17.058
44	LG-044	0.032	0.017	1.887	32.426
45	LG-045	0.016	0.009	1.855	15.889
46	LG-046	0.032	0.017	1.909	32.182
47	LG-047	0.032	0.017	1.926	32.053
48	LG-048	0.016	0.008	1.878	15.759
49	LG-049	0.007	0.003	2.121	7.181
50	LG-050	0.013	0.006	2.049	12.964
51	LG-051	0.028	0.015	1.894	28.25
52	LG-052	0.015	0.008	1.84	14.659
53	LG-053	0.026	0.013	1.939	26.149
54	LG-054	0.02	0.01	1.883	19.764
55	LG-055	0.038	0.02	1.923	37.976
56	LG-056				
57	LG-057	0.015	0.008	1.91	15.133
58	LG-058	0.033	0.018	1.885	33.463
59	LG-059	0.027	0.014	1.906	27.068
60	LG-060	0.007	0.004	1.943	6.956
61	LG-061	0.014	0.007	1.859	13.619
62	LG-062	0.01	0.005	2.021	9.973
63	LG-063	0.019	0.01	1.957	18.903
64	LG-064	0.013	0.007	1.938	12.689
65	LG-065	0.03	0.016	1.916	30.263
66	LG-066	0.026	0.014	1.947	26.447
67	LG-067	0.022	0.012	1.919	22.369
68	LG-068	0.031	0.016	1.87	30.593
69	LG-069	0.042	0.022	1.894	41.982
70	LG-070	0.018	0.01	1.904	18.236
71	LG-071	0.027	0.015	1.875	27.489
72	LG-072				
73	LG-073	0.033	0.017	1.906	32.893
74	LG-074	0.017	0.009	1.931	17.063
75	LG-075	0.006	0.003	2.143	6.121
76	LG-076	0.022	0.012	1.895	22.063
77	LG-077	0.008	0.005	1.864	8.388
78	LG-078	0.023	0.012	1.882	22.88
79	LG-079	0.013	0.007	1.91	13.04
80	LG-080				
81	LG-081	0.039	0.021	1.901	38.985
82	LG-082	0.029	0.015	1.919	29.047

83	LG-083	0.024	0.013	1.865	23.975
84	LG-084	0.019	0.01	1.908	19.101
85	LG-085	0.026	0.014	1.873	25.675
86	LG-086	0.015	0.007	1.958	14.548
87	LG-087	0.025	0.013	1.929	24.985
88	LG-088	0.007	0.003	2.088	7.294
89	LG-089				
90	LG-090	0.055	0.029	1.887	54.545
91	LG-091	0.028	0.015	1.91	28.219
92	LG-092	0.035	0.018	1.89	34.82
93	LG-093	0.041	0.022	1.892	40.914
94	LG-094	0.051	0.027	1.88	50.985
95	LG-095	0.019	0.01	1.916	18.568
96	LG-096	0.014	0.007	1.928	13.585
97	LG-097	0.014	0.007	1.932	14.423
98	LG-098	0.028	0.014	1.956	27.652
99	LG-099	0.036	0.019	1.891	35.575
100	LG-100				
101	LG-101	0.025	0.013	1.876	24.765
102	LG-102	0.018	0.009	1.923	17.952
103	LG-103	0.032	0.016	1.949	31.944
104	LG-104	0.038	0.021	1.842	37.912
105	LG-105	0.041	0.022	1.887	40.684
106	LG-106	0.032	0.017	1.882	32.482
107	LG-107	0.029	0.015	1.88	28.729
108	LG-108	0.023	0.012	1.917	23.417
109	LG-109	0.031	0.016	1.919	31.168
110	LG-110	0.013	0.007	1.941	13.406
111	LG-111	0.036	0.019	1.887	35.809
112	LG-112	0.038	0.02	1.913	38.1
113	LG-113	0.028	0.015	1.875	27.619
114	LG-114	0.028	0.015	1.88	27.548
115	LG-115	0.001	0.001	2.333	1.439
116	LG-116	0.021	0.011	1.962	21.163
117	LG-117	0.028	0.014	1.922	27.732
118	LG-118	0.03	0.016	1.914	29.852
119	LG-119	0.031	0.016	1.924	31.321
120	LG-120	0.018	0.01	1.934	18.484
121	LG-121	0.031	0.016	1.858	30.593
122	LG-122	0.03	0.016	1.884	29.826
123	LG-123	0.028	0.015	1.902	27.71
124	LG-124	0.023	0.012	1.889	22.501
125	LG-125	0.04	0.021	1.895	40.406
126	LG-126	0.025	0.013	1.908	25.391
127	LG-127	0.031	0.016	1.892	30.504

128	LG-128	0.032	0.017	1.886	32.176
129	LG-129	0.035	0.019	1.855	35.291
130	LG-130	0.017	0.009	1.952	16.715
131	LG-131	0.025	0.013	1.907	25.293
132	LG-132	0.032	0.017	1.939	32.464
133	LG-133	0.03	0.016	1.921	29.881
134	LG-134	0.035	0.019	1.89	35.289
135	LG-135	0.035	0.018	1.947	34.536
136	LG-136	0.029	0.015	1.924	29.091
137	LG-137	0.02	0.011	1.84	19.545
138	LG-138	0.024	0.013	1.894	23.8
139	LG-139	0.019	0.01	1.861	19.152
140	LG-140	0.03	0.016	1.89	29.627
141	LG-141	0.03	0.016	1.911	30.457
142	LG-142	0.034	0.018	1.908	33.719
143	LG-143	0.033	0.017	1.883	32.85
144	LG-144	0.036	0.019	1.902	35.546
145	LG-145	0.029	0.016	1.869	29.255
146	LG-146	0.03	0.016	1.914	30.025
147	LG-147	0.014	0.008	1.822	13.675
148	LG-148	0.028	0.015	1.937	28.251
149	LG-149	0.028	0.015	1.89	28.039
150	LG-150	0.032	0.017	1.896	31.904
151	LG-147				
152	LG-152	0.032	0.016	1.949	31.736
153	LG-153	0.035	0.018	1.954	34.724
154	LG-154	0.033	0.017	1.882	32.747
155	LG-155	0.04	0.021	1.893	40.008
156	LG-156	0.031	0.016	1.935	31.114
157	LG-157	0.031	0.016	1.884	30.666
158	LG-158	0.016	0.009	1.901	16.359
159	LG-159	0.038	0.02	1.889	38.202
160	LG-160	0.041	0.021	1.895	40.546
161	LG-161	0.032	0.017	1.841	31.867
162	LG-162	0.031	0.016	1.931	31.168
163	LG-163	0.034	0.018	1.914	34.024
164	LG-164	0.034	0.018	1.897	33.667
165	LG-165	0.031	0.016	1.905	30.746
166	LG-166	0.032	0.017	1.909	32.017
167	LG-167	0.023	0.012	1.939	22.802
168	LG-168				
169	LG-169	0.028	0.014	1.936	27.863
170	LG-170	0.031	0.016	1.912	31.436
171	LG-171	0.016	0.008	1.915	16.066
172	LG-172	0.037	0.02	1.895	37.136

173	LG-173	0.026	0.013	1.938	25.928
174	LG-174	0.024	0.012	1.898	23.524
175	LG-175				
176	LG-176	0.042	0.022	1.858	41.64
177	LG-177				
178	LG-178	0.031	0.016	1.907	31.359
179	LG-179	0.03	0.016	1.856	30.257
180	LG-180	0.03	0.016	1.898	30.34
181	LG-181				
182	LG-182	0.012	0.006	2.017	11.878
183	LG-183	0.037	0.019	1.916	36.969
184	LG-184	0.032	0.017	1.927	32.238
185	LG-185	0.035	0.019	1.886	35.444
186	LG-186	0.044	0.023	1.882	44.088
187	LG-187	0.033	0.017	1.922	33.12
188	LG-188	0.04	0.021	1.917	40.407
189	LG-189				
190	LG-190	0.031	0.016	1.929	30.923
191	LG-191	0.031	0.016	1.919	31.416
192	LG-192	0.033	0.017	1.918	33.443
193	LG-193	0.033	0.017	1.915	32.566
194	LG-194	0.016	0.008	2.026	16.173
195	LG-195	0.02	0.01	1.929	20.076
196	LG-196	0.048	0.025	1.907	47.906
197	LG-197	0.016	0.008	1.915	15.994
198	LG-198	0.007	0.004	2.086	7.432
199	LG-199	0.023	0.012	1.917	23.35
200	LG-200	0.02	0.011	1.913	20.211
201	LG-201	0.026	0.014	1.904	26.423
202	LG-202	0.033	0.018	1.874	33.299
203	LG-203	0.046	0.025	1.88	46.338
204	LG-204	0.008	0.004	2.206	7.738
205	LG-205	0.046	0.024	1.886	45.754
207	LG-207	0.023	0.012	1.94	23.115
208	LG-208	0.019	0.01	1.926	18.727
209	LG-209	0.035	0.019	1.885	35.392
210	LG-210	0.023	0.012	1.898	23.232
211	LG-211	0.027	0.014	1.932	26.99
212	LG-212	0.036	0.019	1.884	36.223
213	LG-213	0.028	0.015	1.878	28.396
214	LG-214	0.039	0.02	1.9	38.712
215	LG-215	0.057	0.031	1.87	57.117
216	LG-216	0.025	0.013	1.908	25.178
217	LG-217	0.026	0.013	1.932	25.899
218	LG-218	0.017	0.009	1.941	16.833

219	LG-219	0.011	0.006	1.981	10.93
220	LG-220	0.044	0.024	1.887	44.394
221	LG-221	0.011	0.006	2.056	11.453
222	LG-222	0.042	0.022	1.915	41.538
223	LG-223	0.022	0.011	1.945	21.779
224	LG-224	0.034	0.018	1.902	33.668
225	LG-225	0.03	0.016	1.903	30.057
226	LG-226	0.028	0.015	1.907	27.691
227	LG-227	0.031	0.016	1.934	30.666
228	LG-228	0.031	0.016	1.908	30.805
229	LG-229	0.032	0.017	1.893	32.482
230	LG-230	0.029	0.015	1.894	29.136
231	LG-231	0.034	0.018	1.898	34.005
232	LG-232	0.035	0.018	1.901	34.924
233	LG-233	0.03	0.015	1.94	29.758
234	LG-234	0.035	0.018	1.884	34.789
235	LG-235	0.035	0.019	1.847	34.525
236	LG-236	0.017	0.009	1.895	16.673
237	LG-237	0.034	0.018	1.93	34.049
238	LG-238	0.031	0.016	1.923	30.845
239	LG-239				
240	LG-240	0.031	0.016	1.923	30.614
241	LG-241	0.032	0.017	1.901	31.519
242	LG-242	0.028	0.015	1.917	28.314
243	LG-243	0.03	0.016	1.908	30.284
244	LG-244				
245	LG-245	0.035	0.019	1.91	35.497
246	LG-246	0.028	0.015	1.879	27.937
247	LG-247				
248	LG-248				
249	LG-249	0.027	0.014	1.892	26.864
250	LG-250	0.027	0.014	1.892	26.793
251	LG-251	0.009	0.005	1.937	9.469