

**UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**



---

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL OVINO CRIOLLO EN  
LA REGIÓN PASCO MEDIANTE EL USO DE MARCADORES  
MICROSATELITES”**

---

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO(A) ZOOTECNISTA**

Presentado por:

**Bach. FLORES CASAS, MARTA ELIZABETH**

**Bach. SOVERO AMBROSIO, LEONID ERNESTO**

Lima – Perú

2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRION**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL OVINO CRIOLLO EN LA  
REGIÓN PASCO MEDIANTE EL USO DE MARCADORES  
MICROSATELITES”**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO(A) ZOOTECNISTA**

**Presentado por:**

**FLORES CASAS, MARTA ELIZABETH**

**SOVERO AMBROSIO, LEONID ERNESTO**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

## DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a nuestros queridos padres que siempre nos apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica para poder llegar a ser un profesional.

A nuestros hermanos y demás familiares en general por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de nuestra carrera universitaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Agradecemos por el apoyo brindado al presente proyecto de investigación: “APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS PARA EL DESARROLLO DE OVINOS CON MEJORES INDICES DE PRODUCTIVIDAD EN CARNE, LANA Y LECHE, REGION PASCO 2013-2016.”
- Agradecemos al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y a su equipo de trabajo por habernos acogido como un miembro más de su familia durante el periodo de la realización de la tesis.
- Agradecemos también a nuestros hermanos por el apoyo a lo largo de nuestra carrera universitaria y también por su ayuda para formarnos como personas de bien.
- Finalmente, expresamos nuestro sincero agradecimiento a todas las personas que nos han ayudado a fortalecer nuestros conocimientos.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ARN	Ácido ribonucléico
°C	Grados centígrados
cM	Centimorgan
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
G	Gramos
H <sub>e</sub>	Heterocigosidad esperada
H <sub>o</sub>	Heterocigosidad observada
Hets	Heterocigotos
Homs	Homocigotos
kg	Kilogramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PIC	Índice de contenido de polimórfico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto

## RESUMEN

En el presente estudio, se examinó la diversidad genética de la población ovina criolla del departamento de Pasco, *Ovis aries*, empleando 11 marcadores microsatélites. Los parámetros utilizados en el análisis incluyeron el número de alelos ( $A$ ) y Heterocigosidad observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ). Los resultados obtenidos fueron  $A=152$  y  $A_{\text{promedio}}= 13.82$ , considerándose una diversidad alélica alta; mientras que  $H_o_{\text{promedio}}=0.739$  y  $H_e_{\text{promedio}}=0.796$ , considerándose también una diversidad genética alta. La prueba de Hardy- Weinberg demostró que la población estudiada se encuentra en equilibrio H-W. En cuanto al contenido de información polimórfica (PIC), los resultados mostraron que los once marcadores microsatélites utilizados (BM1258, BM1818, CSRD247, HSC, INRA63, MAF65, McM527, OarAE129, OarCP49, OarFCB20 y OarFCB304) fueron altamente polimórficos para la población estudiada. Los datos indican que los marcadores microsatélites utilizados son eficaces para el análisis de diversidad genética en poblaciones de ovinos criollos del Perú y que estos a su vez poseen una alta diversidad genética que puede ser aprovechada para el mejoramiento genético y también para la conservación de genes de interés.

*Palabras clave: marcadores microsatélites, ovino criollo, diversidad genética, mejoramiento genético, genes de interés.*

## **INTRODUCCIÓN**

La presencia de la crianza de ovinos a lo largo del territorio nacional es de vital importancia en la economía de la población rural, con mayor énfasis en la zona altoandina del Perú entre los 3000-4200 msnm. Así mismo, el ovino se complementa con la agricultura aprovechando muy bien los residuos de cosecha como fuente de energía, proteína y fibra donde el ovino brinda el estiércol como abono orgánico logrando una producción exitosa en algunos cultivos.

Debido a esto, la crianza de los ovinos criollos es importante para el Perú porque representan una gran medida de sustento de la población rural y porque es un animal adaptado y aclimatado a las condiciones ambientales adversas de los Andes, especialmente del departamento de Cerro de Pasco. Así mismo, el ganado de ovino criollo se caracteriza por su rusticidad y resistencia, mostrando una buena conversión alimenticia. El ganado ovino pastorea áreas pobres que sólo puede ser superada por la rusticidad de los camélidos.

En el aspecto económico- social, los ovinos en el Perú son la caja de ahorro del poblador rural andino dentro de su economía familiar. Siendo parte de sus costumbres ahorrar en especie animal y el ovino tiene la preferencia por su rápida comercialización. La crianza del ovino en el país en un 70 % se desarrolla para la comercialización informal y consumo en carne, lana, pieles y abono.

El ganado ovino en el Perú está conformada por 90 % de ganado criollo, el cual proviene del ganado ovino español cruzado con diversa razas como la Merino y la Corriedale entre otras. En la actualidad existen algunos centros piloto de

mejoramiento genético del ovino en el Perú, los cuales se dedican al trasplante de embriones (raza Australiana) en los ovinos criollos para la obtención de crías de mejor calidad, los que a su vez traerán mejores ganancias a los criadores. Sin embargo, la realización del mejoramiento genético es un método que se debe practicar con cuidado ya que este tipo de métodos debe ir de la mano con el conocimiento de la caracterización genética de los ovinos criollos y en qué estado de conservación se encuentran. Esto con la finalidad de no llevar a la raza criolla a la extinción.

Ante esto, la presente tesis ha buscado mostrar por primera vez la caracterización genética del ovino criollo y su estado de conservación genética en el Perú, para que esta información pueda ser utilizada eficazmente en procesos de mejoramiento genético, sin poner en riesgo a la raza criolla.

## INDICE

CARÁTULA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	v

### **CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

1.1. IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS	2
1.2.1. Objetivo General	2
1.2.2. Objetivos Específicos	2
1.3. FORMULACION DE LA HIPÓTESIS	3
1.3.1. Hipótesis nula	3
1.3.2. Hipótesis alternativa	3
1.4. JUSTIFICACIÓN	3
1.4.1. Viabilidad del estudio	4
1.4.2. Limitaciones del estudio	5

### **CAPITULO II: MARCO TEÓRICO**

2.1. BASES TEÓRICAS – CIENTÍFICAS	6
2.1.1. Taxonomía y origen del ovino criollo	6
2.1.2. Características del ovino criollo	8
2.1.3. Habidad del ovino criollo	9
2.1.4. Marcadores moleculares	10
2.1.4.1. Microsatelites (SSR)	10
2.1.5. Estudios sobre ovinos criollo utilizando marcadores moleculares	11
2.1.6. Estadísticos para analizar la diversidad genética	15
2.1.6.1. Número de alelos	15
2.1.6.2. Contenido de Información Polimórfica (PIC)	16
2.1.6.3. Heterocigosidad ( $H_e$ y $H_o$ )	16
2.1.6.4. Equilibrio Hardy – Weinberg	17

### **CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1.	COLECTA DE CAMPO	19
3.2.	TRABAJO EN LABORATORIO	22
3.2.1.	Recepción de muestras	22
3.2.2.	Obtención de leucocitos	22
3.2.3.	Extracción de ADN	22
3.2.4.	Cuantificación y calidad de ADN	23
3.2.5.	Amplificación de microsatélites (PCR)	24
3.2.6.	Análisis de datos.	27

### **CAPITULO IV: PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

4.1.	Resultados de la Extracción de ADN a partir de sangre y Amplificación de fragmentos (PCR)	28
4.2.	Resultados de los Parámetros de variabilidad genética	29
4.2.1.	Identificación de alelos	29
4.2.2.	Frecuencias alélicas	30
4.2.3.	Equilibrio Hardy-Weinberg	42
4.2.4.	Heterocigosidad y PIC	43
4.3.	Discusión de los resultados	44
4.4.	Parámetros de variabilidad genética	45

### **CAPITULO V: CONCLUSIONES**

### **CAPITULO VI: RECOMENDACIONES**

### **BIBLIOGRAFÍA**

### **ANEXOS**

# **CAPITULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA**

La crianza de ovino se realiza en casi todas las regiones del país, bajo un sistema extensivo, con crianza mixta de vacunos y camélidos sudamericanos. La mayor población de ovinos se encuentra en la sierra: 8'815,333 que representa el 94.4% de la población nacional, en Costa, 460,889 equivalente al 4.9% y Selva con el 0.7% según fuente del INEI. (CENAGRO 2012).

El ovino criollo es una raza que está muy difundida en todo el país y que concentra la mayor población, es decir, representa el 81% del total de la población de ovinos en el Perú. (CENAGRO 2012)

Los pequeños productores de la sierra vienen criando ovinos criollos en pequeñas parcelas, sin programas sanitarios, pequeños rebaños con reproducción consanguínea y donde su crianza está únicamente orientada al auto consumo.

La diversidad de ambientes y algunos factores adversos, así como la falta de una selección adecuada a través del tiempo, hicieron que se transformara en un animal rústico pero de tamaño pequeño con escaso desarrollo corporal. Los ovinos criollos tienen una gran adaptación a las condiciones geográficas y ecológicas del país, de sobre pastoreo y con pocas instalaciones, sin embargo, son de baja prolificidad; lo que significa que los carneros pueden llegar a pesar de 32 a 37 Kg. y la borregas de 25 a 27 Kg. Además, a nivel de producción, los ovinos criollos solo generan un promedio de de 2 a 3 libras de lana gruesa por animal adulto y el rendimiento de carcasa es de 7 a 15 Kg por animal (MINAG 2013). Este nivel bajo de prolificidad y producción no hace a los ovinos criollos un recurso útil para los criadores.

## **1.2. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo General**

Caracterizar a nivel molecular los ovinos criollos de la Región Pasco mediante el uso de marcadores microsatélites

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Estimar el valor de diversidad genética en la población de ovinos criollos.
- Hallar asociación entre la diversidad genética presente en la población de ovinos criollos y las características fenotípicas de estos.
- Determinar si los marcadores microsatélites son útiles en el estudio de ovinos criollos peruanos.

### **1.3. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS**

#### **1.3.1. Hipótesis nula**

Las poblaciones de ovinos criollos del departamento de Pasco presentan baja diversidad genética.

#### **1.3.2. Hipótesis alternativa**

Las poblaciones de ovinos criollos del departamento de Pasco presentan alta diversidad genética.

### **1.4. JUSTIFICACIÓN**

Este trabajo de investigación se origina ante la paradoja existente alrededor del ovino criollo. Por un lado, los ovinos criollos; conocido como el mestizaje de varias razas procedentes de la Península Ibérica e introducidas en América hace más de cinco siglos, son animales bastante adaptados a los diferentes pisos ecológicos y han fijado caracteres propios como la rusticidad y la prolificidad, así como cualidades maternas excepcionales; sin embargo, la baja producción de lana, carcaza y carne que se obtiene del ovino criollo no lo hace rentable para los criadores, los cuales en vez de continuar con los rebaños, buscan reemplazarlos por otras razas más eficientes. A esto se le debe sumar la escasa información científica que se tiene sobre los ovinos criollos, la cual no permite conocer el beneficio real de estos animales.

El estudio planteado permitirá conocer la diversidad genética de los ovinos criollos

a través de la utilización de técnicas de biología molecular. Esto es importante ya que será el primer estudio reportado para ovinos criollos y especialmente porque permitirá a muchos conocer sus beneficios. La diversidad genética en los ovinos criollos nos permitirá corroborar de manera confiable si los ovinos estudiados cuentan con la capacidad de poder resistir muchos factores de estrés y enfermedades, y poder adaptarse a estos.

De ser cierta la hipótesis de alta diversidad genética (raza criolla alta resistencia a la geografía de su habitat, al estrés generado en su habitat, a enfermedades, etc.) los resultados servirían para considerar a los ovinos criollos como un salvación para aquellas razas mejoradas que son rápidamente vulnerables a alguno de los factores de estrés ya mencionados.

#### **1.4.1. Viabilidad del estudio.**

El presente trabajo es viable por los siguientes aspectos:

En el aspecto económico cuenta con el respaldo del proyecto de “APLICACIÓN DE TECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS PARA EL DESARROLLO DE OVINOS CON MEJORES INDICES DE PRODUCTIVIDAD EN CARNE, LANA Y LECHE, REGIÓN PASCO 2013 – 2016” en la Universidad Nacional “DANIEL ALCIDES CARRION”

En el cuanto al soporte técnico y logístico; se cuenta con el INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria); quien ha facilitado el uso del Laboratorios de Biología Molecular y Genómica; además se cuenta con el asesoramiento de sus profesionales.

#### **1.4.2. Limitaciones del estudio.**

Dentro de las limitaciones para el desarrollo del estudio tenemos: el clima, que particularmente en la Provincia de Pasco, llegan a temperaturas bastante bajas y por tal son consideradas un factor limitante al momento de la colección de muestras y de la supervivencia de los animales. Otro factor limitante es la ubicación de los criadores, y la inclusión de nuevas razas especializadas, que en conjunto están provocando la extinción al ovino criollo. Así mismo, debido a que las vías de transporte consisten en trochas, es difícil acceder a los lugares de crianza de nuestro interés y el tiempo de trabajo se prolonga.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. BASES TEÓRICAS – CIENTÍFICAS**

##### **2.1.1. Taxonomía y origen del ovino criollo**

Los ovinos se encuentran clasificados dentro del:

Reino Animalia

Filo Chordata

Clase Mammalia

Orden Artiodactyla

Familia Bovidae

Género Ovis

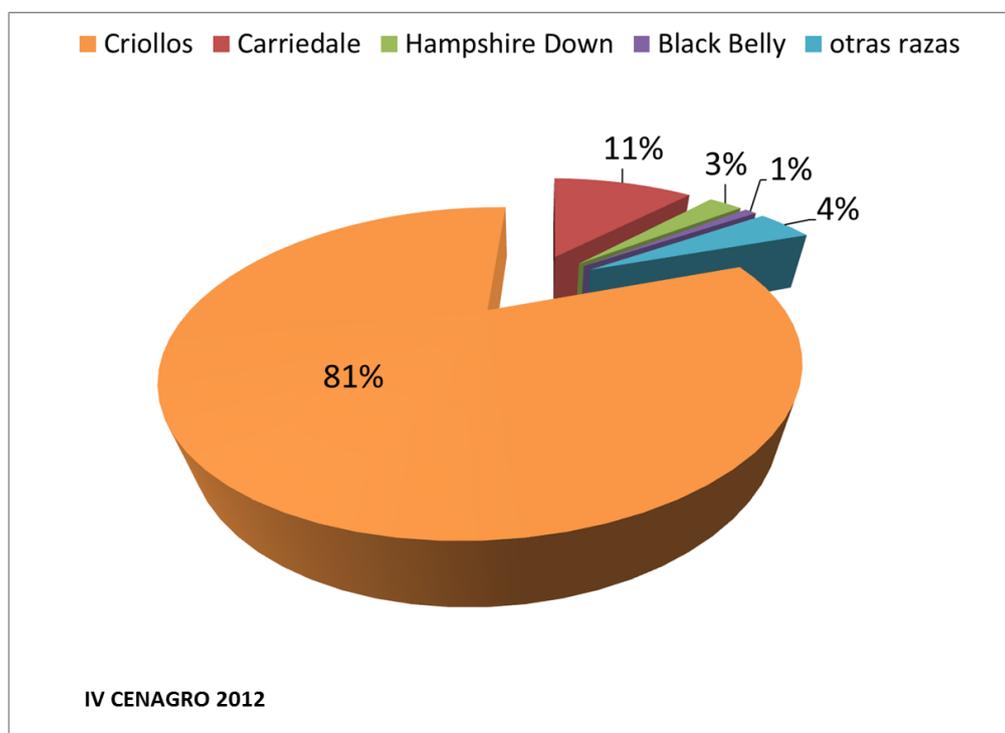
Especie *Ovis aries* Linnaeus 1758

Los ovinos pertenecen a la familia de los Bóvidos, y está formada por animales pequeños, con cuernos arrollados en espiral y retorcidos o inclinados hacia atrás, hocico puntiagudo, cuerpo cubierto de lana hasta el hocico, el cual es puntiagudo. Las ovejas junto las cabras fueron las primeras especies en ser domesticadas entre los 6 000 y 7 000 a. C. en medio oriente, lo que las convierte en el primer animal para pastoreo domesticado en el mundo (Mattiello 1998).

Luego de la domesticación en Europa o Asia, el ovino se ha diseminado por todo el mundo, debido a la variada utilidad que esta especie aporta al hombre (lana, carne, leche, etc.). En América Latina, la mayoría de las introducciones de ganado tuvieron lugar durante los primeros 50 años de colonización. Este proceso, iniciado hace aproximadamente 450 años con las colonias españolas y portuguesas, estableció poblaciones en mayor parte de las especies de la península Ibérica. A partir del segundo viaje de Cristóbal Colón en 1493, las especies de animales domésticos fueron introducidas a Haití, México, América Central y más tarde América del Sur (FAO 2010, Albano 2006).

Los ovinos se introdujeron al Perú con los viajes de Pizarro, siendo algunas de las primeras razas introducidas el Merino y el Churro Español. Los ovinos lograron adaptarse a la geografía y ecología de nuestro país de tal manera que, desplazaron a los Camélidos americanos, que habitaban las zonas más remotas de los Altos Andes. En la actualidad, de acuerdo al IV CENAGRO 2012, la población de ovinos es de 9,523,198 millones de ovinos, mostrando un descenso de 21,2% con respecto al censo agropecuario de 1994. La raza que concentra la mayor población es la de Criollos y representa el 81,0% del total. Le

sigue en orden de importancia la raza Corriedale con el 11,4%, Hampshire Down 2,6%, Black Belly 0,9% y otras razas 4,1% respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Gráfico del porcentaje de la crianza de ovinos en el Perú según IV CENAGRO 2012.

### 2.1.2. Características del ovino criollo

En ovinos, a la hembra se le denomina oveja y al macho carnero, las crías son llamadas corderos y los ejemplares jóvenes son conocidos como moruecos.

Así mismo, el ovino criollo se caracteriza principalmente (Salamanca 2014, Díaz 2013, Alencastre 2005) (Figura 2):

- Ser una raza de fenotipo muy variado.
- Contar con una alta rusticidad y mediana prolificidad.
- Tener un bajo nivel productivo (carne y lana).

- Facilidad para adaptarse a zonas de Ande.
- Posee menor cantidad de grasas (debido a sus largas caminatas en los cerros).
- Mejor sabor de la carne, en comparación con otras variedades.
- Presenta un peso vivo de 27 kg para ovejas y 35 kg para carneros (aproximadamente.)



**Figura 2.** Características morfológicas del ovino criollo peruano.

### **2.1.3. Habitación del ovino**

Los ovinos están distribuidos en el Perú en las 3 regiones naturales, pero con mayor población en nuestra sierra. El presente estudio, específicamente trabaja con el departamento de Pasco, el cual está situado en la parte central del Perú, en la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes a más de 4000 msnm. La porción occidental de este departamento corresponde a zonas de mesetas elevadas y puna, así como a asiento de mineras. Esta ubicación geográfica hace que el clima sea frío, llegando a temperaturas menores a 0 °C. A pesar de las

adversidades climáticas de la región, los ovinos criollos han sabido adaptarse a su habitud y por ello su crianza se encuentra extendida a lo largo de todo el departamento de Pasco (Morales 2004).

#### **2.1.4. Marcadores moleculares**

Se les define como “todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o estado alélico” (Ferreira y Grattapaglia 1998). Así mismo, se les considera una herramienta que permite conocer la variabilidad genética de una especie. Existen diferentes tipos de marcadores, tales como: morfológicos (rasgos físicos), bioquímicos (isoenzimas) y marcadores de ADN (molecular). Estos últimos, en la actualidad, son ampliamente usados debido a su abundancia y eficiencia (Gonzales 2008).

Para los estudios de diversidad genética existen diferentes metodologías que ayudan a establecer las características de interés dentro de un genoma, como: Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), repeticiones de secuencias simple (SSR), polimorfismo de nucleótido simple (SNP), entre otros (Collard et al. 2005).

##### **2.1.4.1. Microsatélites (SSR)**

Se trata de uno de los marcadores más importantes basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se caracterizan por permitir visualizar las diferencias genéticas entre individuos, organismos o especies (Gonzales 2008).

Los microsatélites son repeticiones cortas en serie cuya secuencia básica tiene una longitud entre 1 y 10 pb, y los más típicos son de 2 a 4 pb. También son altamente variables y están distribuidos por igual en todo el genoma. Este tipo de ADN repetitivo es común en organismos eucariotas, y el número de unidades repetidas varía ampliamente entre los organismos, hallándose en algunos hasta 50 copias o más de la unidad repetida. Para identificar estos polimorfismos, se construyen cebadores o primers para la amplificación mediante PCR de la región del ADN que flanquea el microsatélite. Las regiones adyacentes a los microsatélites tienden a conservarse dentro de las especies, aunque a veces se conservan también en niveles taxonómicos mayores (Hajeer et al. 2000)

La variación en tamaño de los productos de la PCR para un microsatélite se debe a las diferencias en el número de las unidades repetidas en el locus. El polimorfismo de los microsatélites es generado por la pérdida o ganancia de repeticiones, aunque se cree que se deba en mayor medida a la ganancia. Éste fenómeno no es conocido completamente, pero se piensa que esta expansión es debida a procesos de mutación durante la replicación (Roizés 2000). Debido a que estos marcadores presentan grandes ventajas fueron seleccionados para este estudio.

#### **2.1.5. Estudios sobre ovinos criollos utilizando marcadores moleculares**

La amplia distribución geográfica que presentan los ovinos, de manera general, ha llevado a que en muchos países se realicen diferentes tipos de estudios; que pueden ser a nivel morfológico, reproductivo, molecular, etc. Este último tipo de

estudio, en el cual se usan técnicas de biología molecular, ha dado información importante para saber qué tan conservadas se encuentran las razas de ovinos y el grado de su diversidad genética. Por ejemplo:

❖ **Arora y Bhatia 2006** GENETIC DIVERSITY OF MAGRA SHEEP FROM INDIA USING MICROSATELLITE ANALYSIS.

La diversidad genética del ovino Magra de la India, fue investigada por medio de 25 marcadores microsatélites. Todos los microsatélites usados amplificaron bien y exhibieron polimorfismos. Se observó una amplia gama de variabilidad genética respecto a: número de alelos de 3 (BM6506, OarCP20) a 10 (CSSM31), heterocigosidad observada de 0.200 (BM6506) a 0.947 (OarHH35), heterocigosidad esperada de 0.368 (CSSM47) a 0.864 (BM1314) y Contenido de Información Polimórfica (CIP) de 0,347 (CSSM47) a 0.849 (BM1314). Esto apoya la utilidad de estos loci microsatélites en la medición de los índices de diversidad genética en el ganado ovino de la India. El promedio de varias medidas de variabilidad genética a saber son la diversidad alelica (5.7), heterocigosidad observada (0.597), heterocigosidad esperada (0.694) y la media de PIC (0,648). Los valores mostraron una alta variabilidad genética a pesar de consanguinidad acumulada como se refleja en el coeficiente de consanguinidad media alta (FIS = 0,159), debido a la proporción de sexos desigual de los animales de cría.

❖ **WAFULA 2005:** GENETIC CHARACTERIZATION OF WEST AFRICAN DJALLONKE SHEEP USING MICROSATELLITE MARKERS

La diversidad genética de 11 poblaciones de ovinos Djallonke de Guinea, Malí, Senegal y Gambia y tres poblaciones de referencia de Mali, Nigeria y Portugal

han sido estimada a través 15 microsatélites. Las ovejas Djallonke en Mali, Gambia y Guinea oriental tienen una mayor diversidad genética en comparación con los de Senegal y Guinea meridional y occidental.

❖ **PAIVA 2005: GENETIC VARIABILITY AMONG BRAZILIAN SHEEP USING MICROSATELLITES**

Un total de 18 loci fueron examinados en 297 animales en cinco razas naturalizadas y tres razas exóticas de ovejas en Brasil. Los resultados muestran que 12,87% de la variación total ( $p < 0,001$ ) se debió a las diferencias entre razas, la cual sugiere poca diferenciación genética entre el razas estudiadas. Mientras que los resultados dentro de cada raza indican la calidad genética de los rebaños examinados. Estos resultados serán importantes para las decisiones de gestión que se tomen.

Por otro lado, en Perú no se reporta antecedente alguno de estudios de caracterización molecular del ovino criollo, por lo cual el presente estudio representará un gran avance en el conocimiento de estos animales a nivel molecular. Así mismo, este estudio brindará información complementaria a otros sobre reproducción, que ya han sido desarrollados en los ovinos criollos peruanos, dando la oportunidad de que estudios como estos puedan ser tomados como base para la toma de decisiones en cuanto su mejoramiento y conservación. Por ejemplo:

❖ **Alencastre y Gómez 2005.** COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL OVINO CRIOLLO EN EL ALTIPLANO PERUANO

La tasa de ovulación comienza a disminuir en el mes de agosto, registrándose las menores tasas en septiembre y octubre, para nuevamente incrementarse en diciembre; en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la UNA-Puno (CIPCH), se realizaron investigaciones que determinaron que la mejor época para el empadre se encontraba entre el 15 de marzo y el 15 de abril. Cabe hacer notar que en los rebaños donde permanentemente están juntos las hembras y los machos, como es en el caso de los pequeños productores, los apareamientos son en los meses comprendidos entre diciembre y julio, produciéndose los partos a partir de junio hasta diciembre. El ciclo estral, tiempo que transcurre entre un estro y otro, es de 17,65 días como promedio, con rangos de 15 a 20 días. Referente a la pubertad, su inicio es a los 4,5 meses en machos, y 7 meses en hembras, por esta razón los corderos mayores empadran a sus propias madres cuando los desbarates se hacen tardíos, ocurriendo los partos en junio. En condiciones de crianza extensiva con pastos naturales, la influencia del peso del ovino para decidir la monta, es relativo ya que los pesos varían mucho de una localidad a otra, en el CIPCH se observó que las borregas criollas dientes de leche empadradas con pesos entre 20 y 25 kilos, parieron el 86 p.100 mostrando un buen comportamiento reproductivo en comparación con el ganado Corriedale (Montesinos, 1991). También se apreció que el factor alimentación es decisivo para alcanzar empadres tempranos con éxito en la parición. El periodo de gestación se encuentra en el intervalo de 144 a 150 días, el parto dura un poco más de cuatro horas, en Puno - Perú como

rutina, el destete o desbarate se hace entre los 90 a 105 días de edad, condición que depende del tipo de alimentación que se le suministre al animal.

### **2.1.6. Estadísticos para analizar la diversidad genética**

La diversidad genética hace referencia a la cantidad de variación genética cuantificable en una población o especie y permite que esta se adapte con éxito a un ambiente cambiante. Existen factores que incrementan dicha diversidad (e.g. mutaciones, flujo génico, reproducción sexual y selección equilibradora); mientras que otros factores favorecen su disminución (e.g. cuellos de botella, deriva génica, endogamia, selección direccional, pequeño tamaño poblacional, etc.) ocasionando una reducción del fitness y poniendo en riesgo a los individuos y a la población (Freeland 2005).

Los estadísticos que determinarán la diversidad genética de las poblaciones estudiadas en la presente tesis son: número de alelos, Contenido de Información Polimórfica, Heterocigosidad, Equilibrio Hardy – Weinberg y el estadístico F de Wrigth

#### **2.1.6.1. Número de alelos**

También conocido como diversidad alélica. Se le considera un estadístico que indica el número total de alelos presentes en un locus en una población y se expresa de la siguiente manera:

$$A = \sum a_j$$

donde  $a_j$  corresponde a la cantidad de alelos diferentes y el número total de alelos ( $A$ ) es la suma total de alelos.

#### **2.1.6.2. Contenido de Información Polimórfica (PIC)**

Es usado para medir la informatividad de un marcador genético en estudios de vínculo. Como una medida de polimorfismo de un marcador, PIC depende solo del número de alelos y la frecuencia de cada alelo en un locus. Su valor varía de (monomórfico) a 1 (altamente polimórfico con muchos alelos de frecuencias semejantes) (Guo y Elston 1999). El valor promedio de PIC para el total de loci representa la diversidad genética total ( $H_t$ ).

#### **2.1.6.3. Heterocigosidad ( $H_e$ y $H_o$ )**

La heterocigosis mide la proporción de individuos heterocigotos existentes para un determinado marcador, o para un conjunto de estos. Recordemos que cada célula diploide tiene dos alelos, uno heredado de cada parental. Si un individuo tiene dos alelos en un locus específico, el individuo es heterocigoto en ese locus; si los dos alelos son iguales, el individuo se denomina homocigote (Eguiluz 2014).

La heterocigosis es una buena medida de la diversidad contenida en una población, ya que está íntimamente relacionada con la consanguinidad y la viabilidad de la población. Esta puede ser medida de dos formas distintas. Una de ellas consiste en calcular directamente la proporción de individuos heterocigotos contando uno a uno los genotipos heterocigotos, o acumulando

las frecuencias génicas de éstos. Es lo que se conoce como heterocigosis observada.

La heterocigosis esperada, o diversidad génica (Nei 1973), es la heterocigosis que se esperaría en condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg. Se define como la probabilidad que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes. Dónde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  y  $n$  es el número de alelos en un locus (Nei et al. 1973).

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

Las diferencias entre la heterocigosis observada y la esperada pueden ser consecuencia de fenómenos poblacionales como la subdivisión y los cuellos de botella.

#### **2.1.6.4. Equilibrio Hardy – Weinberg**

Este principio es usado para comparar las frecuencias alélicas en una población dada a través de un periodo de tiempo. Una población debe cumplir cinco reglas para ser considerada en equilibrio: 1) Ausencia de mutaciones génicas y por tanto los cambios alélicos no ocurren. 2) Mínima tasa de migración de los individuos. 3) Apareamientos al azar. 4) Ausencia de deriva génica, una oportunidad de cambio en las frecuencias alélicas. 5) Ausencia de selección natural 6) Población suficientemente grande (Eguiluz 2014).

El equilibrio de Hardy-Weinberg nunca ocurre en la naturaleza debido a que ninguna población llega a cumplir todas las reglas pero es un estado ideal que

proporciona una línea de base contra la cual los científicos miden la evolución de los genes en una población dada. Así mismo, un muestreo inapropiado, tamaños de muestra pequeños (menores de 20 individuos) así como baja variabilidad de los loci caracterizados son factores comunes que originan una desviación del HWE (Freeland 2005).

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

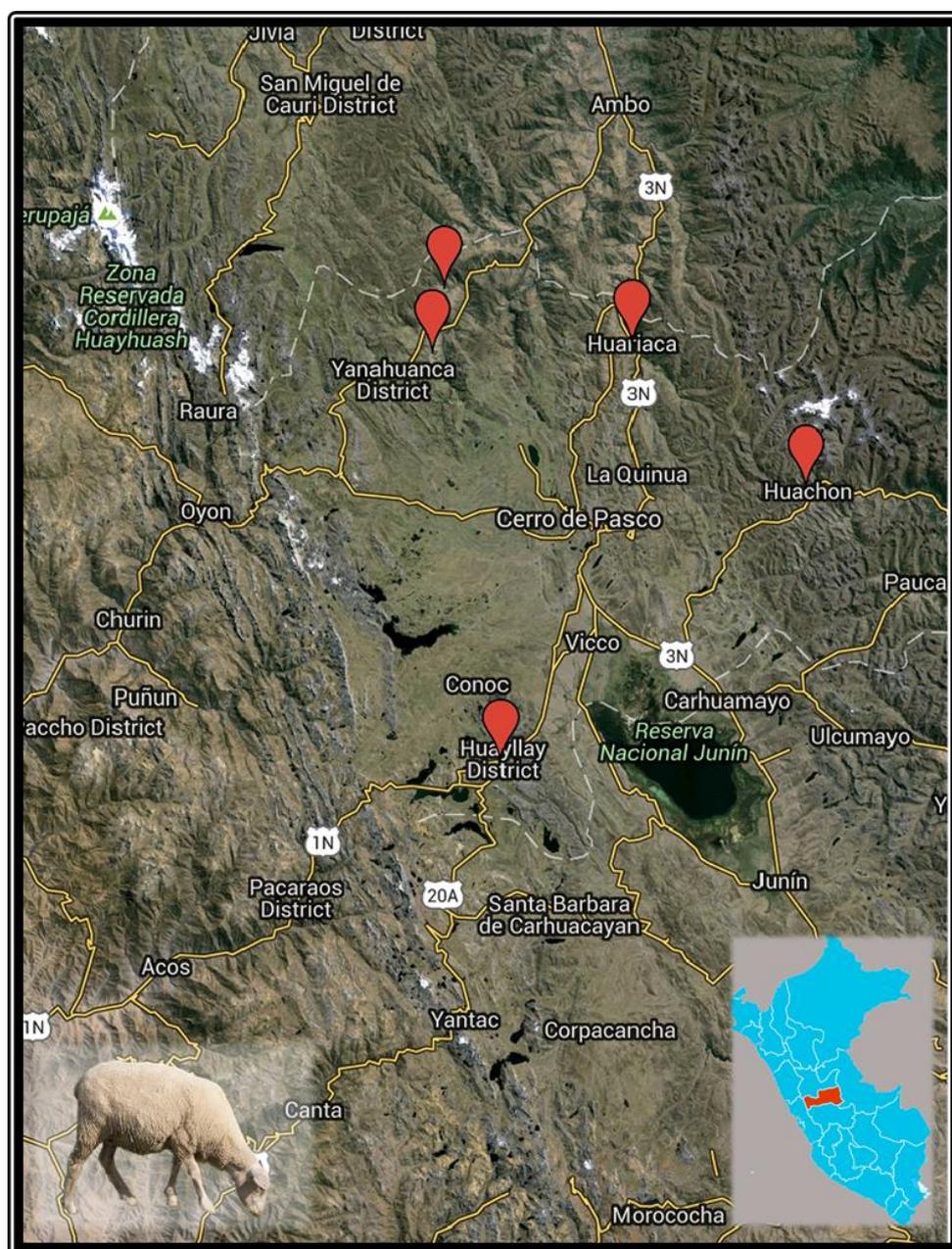
Los procedimientos llevados a cabo para la obtención y análisis de las poblaciones de ovinos criollos estudiados empleando marcadores microsatélites, se dividieron en varias etapas: 1) Colecta en Campo, 2) Trabajo en Laboratorio y 3) Análisis Genético.

#### **3.1 COLECTA EN CAMPO**

Para el presente estudio se analizaran 600 ovinos criollos del departamento de Pasco, correspondientes a la provincia de Cerro de Pasco y Daniel Carrión, específicamente en los distritos de Huayllay, Huachon, Huariaca, Paucar y Tapuc (Tabla 1, Figura 3).

**Tabla 1.** Ubicación geográfica de los distritos de ovinos criollos del departamento de Pasco

PROVINCIA	DISTRITO	N°	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD (msnm)
CERRO DE PASCO	HUAYLLAY	153	11°00'16" S	76°22'05" W	4 348
	HUACHON	109	10°38'16" S	75°57'08" W	3 407
	HUARIACA	103	10°26'34" S	76°11'20" W	2 958
DANIEL CARRION	PAUCAR	117	10°22'11" S	76°26'42" W	3 357
	TAPUC	118	10°27'21" S	76°27'42" W	3 678



**Figura 3.** Puntos de muestreo en el departamento de Pasco.

El procedimiento de hemostasia se realizó colocando los dedos por encima de la yugular y presionando, esto permite que la vena se dilate y proporcione mayor volumen de sangre. Posteriormente se desinfectó la región con alcohol yodado e introducimos la aguja con mucho cuidado hasta la salida de la sangre, siempre tomando en cuenta el bienestar del animal. Se colectó aproximadamente 7 ml de sangre por animal, en tubos de centrifuga, las cuales contenían 500µl de EDTA al 2% (Figura 4).



**Figura 4.** Procedimiento de colecta de muestras en ovinos criollos A) Rebaño de ovejas. B y C) Equipo de colecta. D) Obtención de muestra de sangre. E) Recopilación de muestras sanguíneas en cajas térmicas y encuesta a los dueños de los rebaños.

Invertimos suavemente los tubos con muestra para que se mezcle con el anticoagulante y así evitar la coagulación. Se almacenaron las muestras lejos del sol, colocándolos en cajas con geles refrigerantes, A su llegada al laboratorio, fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento y su posterior extracción de ADN.

## **3.2 TRABAJO EN LABORATORIO**

### **3.2.1 Recepción de muestras**

Las muestras de sangre obtenidas del campo fueron almacenadas 4°C, realizando la verificación y la asignación del código de laboratorio.

### **3.2.2 Obtención de leucocitos**

Para la obtención de los leucocitos se realizó lavados con buffer TE<sub>20:5</sub> (pH 8.0, Tris y EDTA) con la finalidad de producir lisis en la pared celular, eliminando todos los glóbulos rojos y conservando los leucocitos. Las muestras fueron homogenizadas con vortex y luego centrifugadas, descartando el sobrenadante. Este procedimiento se repitió hasta que el pellet quedase limpio. Finalmente se guardó el pellet de leucocitos a -70°C.

### **3.2.3 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las 600 muestras sanguíneas se realizó a partir de los leucocitos utilizando el protocolo de Sambrook et al. (1989); modificado por el Laboratorio de Biología Molecular – INIA, como se detalla a continuación:

Se realizaron sucesivos lavados de las muestras colectadas con 500 µL de buffer TE (Tris-EDTA proporción 20:5, pH 8,0) hasta obtener un precipitado de

leucocitos. Posteriormente estos fueron resuspendidos en buffer TE (Tris-EDTA, proporción 20:5, pH 8,0), con 75  $\mu$ L de SDS 10%, y 1  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/ $\mu$ l), incubando las muestras a 56 °C por 3 h. Luego se separaron las impurezas agregando 200  $\mu$ L de acetato de potasio 3 M. El ADN se precipitó con una solución de isopropanol y etanol absoluto, y se resuspendió en buffer TE<sub>20,5</sub> (Tris-EDTA, pH 8,0). Se realizaron lavados con soluciones de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1; luego se lavó con acetato de potasio 3 M y cloruro de sodio 5 M para precipitar las impurezas presentes en el ADN. Finalmente, se agregó etanol absoluto para precipitar el ADN, y se resuspendió en 50-200  $\mu$ L de buffer TE (TrisEDTA proporción 10:1, pH: 8.0) dependiendo del tamaño del precipitado obtenido. Las extracciones se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Los materiales y reactivos de laboratorio así como el procedimiento de extracción de ADN se realizaron según el Anexo 1 y 2 respectivamente.

#### **3.2.4 Cuantificación y calidad de ADN**

Se cuantificó el ADN total utilizando un espectrofotómetro Epoch (Biotek). El procedimiento consistió en utilizar 2  $\mu$ L de buffer TE 10:1, como muestra control, y 2  $\mu$ L del ADN total extraído. Como resultados se obtuvo la concentración de ADN (ng/ $\mu$ L) y la relación de absorbancia (260/280) cuyo valor tuvo que ser mayor a 1.8 para continuar con el proceso de amplificación de microsatélites.

La calidad del ADN se evaluó a través de geles de agarosa al 1%, preparados con buffer TBE 1X (Tris-HCl, ácido bórico, EDTA; pH 8) y 1  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Se cargó 2  $\mu$ L de DNA stock mezclado con 6  $\mu$ L de Sal B 2X (azul de bromofenol, xilencianol, naranja G y sucrosa), el cual funciona como

indicador de la migración del DNA. La electroforesis se corrió a un voltaje de 120 V por 20 minutos. Los geles fueron fotografiados en un Transiluminador UV ChemicDoc XR y su edición se realizó con el programa Quantity One v. 4.6.3 (Biorad, Hercules, CA, USA).

### 3.2.5 Amplificación de microsatélites (PCR)

Se seleccionaron 11 marcadores genéticos microsatélites fluoromarcados (Tabla 3) reportados por Rosa et al. (2013), Peraza et al. (2013)

**Tabla 2.** Lista de los 11 marcadores microsatélites utilizados en el presente trabajo.

<b>PRIMER</b>	<b>SECUENCIA FORWARD</b>	<b>SECUENCIA REVERSE</b>
<b>OarFCB20<sup>1</sup></b>	CATCTTTCAAAGAAGACTCCGAAAGTG	CTTGGAATCCTTCCTAACTTTTCGG
<b>MAF65<sup>2</sup></b>	GGAAAACCCCATATATACCTATAC	AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG
<b>HSC<sup>2</sup></b>	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG	CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG
<b>OarCP49<sup>3</sup></b>	ATTGACACAAGCTAAATCTAACC	AAACCACAGAAATGCTTGGGAAG
<b>OarFCB304<sup>2</sup></b>	CTGCCAATGCAGAGACACAAGA	GTCTGTCTCCTGTCTTGTGCATC
<b>CSR247<sup>2</sup></b>	CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC	GTGGGGATGAATATTCCTTCATAAGG
<b>BM1818<sup>4</sup></b>	GCTGAACAATGTGATATGTTCAGG	GGACAATACTGTCTTAGATGCTGC
<b>BM1258<sup>5</sup></b>	CCTCCACACAGGCTTCTCTGACTT	CCTAACTTGCTTGAGTTATTGCC
<b>OarAE129<sup>6</sup></b>	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG	CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG
<b>McM527<sup>2</sup></b>	GGA CT TGCCAGA ACTCTGCAAT	CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG
<b>INRA63<sup>5</sup></b>	GTATGTATTTTTCCACCCCTGC	GAGTCAGACATGACTGAGCCTG

Baumung et al. 2006, Dalvit et al. 2008, Lozano et al. 2008.

Las reacciones de amplificación por PCR multiplex se prepararon en un volumen final de 11  $\mu$ l, considerando las siguientes concentraciones finales (Mullis, 1990): 1X buffer de PCR, MgCl<sub>2</sub> 2.5- 3.0 mM, dNTP 0.2 – 0.3 mM, cebador 0.1- 0.3  $\mu$ M (dependiendo de la reacción), 0.5 U de Taq Polimerasa, y 3  $\mu$ l de ADN 15 ng/ $\mu$ l. La PCR fue llevada a cabo en el termociclador Mastercycler® Pro Eppendorf, utilizando el siguiente programa de temperaturas: una fase de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 25 ciclos con una primera fase de desnaturalización a 95 °C por 45 s, hibridación del iniciador a 56 °C y 60 °C (dependiendo de los iniciadores) por 60 s y una de fase extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 4 min. La estandarización se realizó mediante modificaciones de las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, las temperaturas de hibridación y agrupando a los microsatélites de acuerdo al tamaño del producto (Anexo 1, Anexo 2).

Los productos de PCR fueron separados en un analizador genético ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mediante electroforesis capilar, utilizando un gel polímero POP 7 (Performance Optimised Polymer). Cada 1,5  $\mu$ l de producto de PCR fueron mezclados con 9,8  $\mu$ l de formamida Hi-Di y 0,20  $\mu$ l de un marcador estándar interno de 500bp GeneScan ROX™. Luego las muestras se sometieron en 94 °C durante 3 min para denaturación e inmediatamente se produjo un choque térmico colocándolo 3 min en hielo antes de realizar la corrida en el analizador genético.



**Figura 5.** Trabajos realizados en el laboratorio. A) Muestras de sangre, B) Obtención de leucocitos, C) Pellets de ADN, D) Cuantificación del ADN con el Equipo Epoch, E) Electroforesis horizontal, F) PCR, G) Análisis genético en ABI 3130XL y H) Edición de electroferogramas.

### **3.2.6 Análisis de datos**

Para el análisis de la variabilidad genética se estimó, el número de alelos y las frecuencias alélicas. La distribución de las frecuencias alélicas de cada locus en cada núcleo reproductor fueron graficadas en histogramas. La evaluación de equilibrio de HW de los 11 marcadores microsatélites se realizó según la prueba exacta de Fisher mediante el método de cadena de Monte Carlo Markov (Guo y Thompson 1992), así como el déficit y exceso de heterocigotos. El contenido de Polimórfico (PIC) y la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para cada uno de los loci y las heterocigosidades totales se determinó con el programa, CERVUS v. 3.0 (Kalinowski 2007).

## CAPITULO IV

### PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1. Resultados de la Extracción de ADN a partir de sangre y Amplificación de fragmentos (PCR)

Se observó una buena cantidad y calidad de ADN con una relación 260/280 entre 1.8 y 2.0. El éxito de la extracción de ADN se visualizó en geles de agarosa al 1%, los cuales mostraron ADN libre de RNA, proteínas, polisacáridos (ADN puro) (Figura 6).

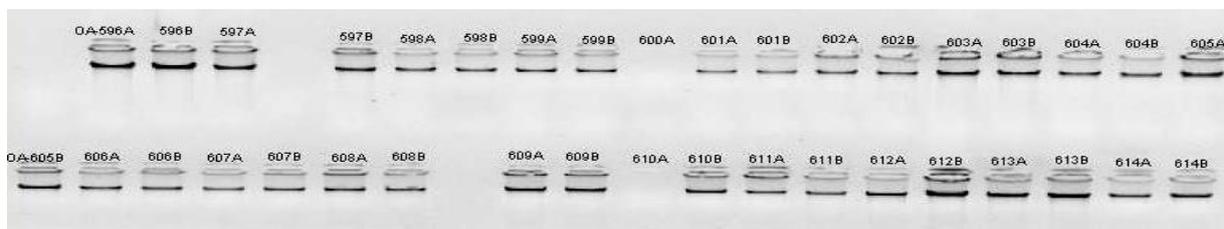
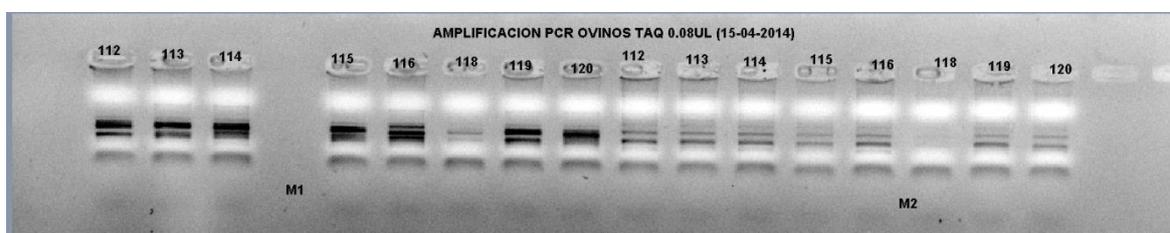


Figura 6. Calidad del stock de ADN

De igual forma, la amplificación de fragmentos de ADN resultó exitosa ya que todos los fragmentos deseados fueron amplificados sin problemas y con gran resolución, la cual se puede visualizar a través de la intensidad y grosor de las

bandas en el gel de agarosa al 2% (Figura 7)



**Figura 7.** Amplificados de PCR en gel de agarosa al 2%.

## 4.2. Resultados de los Parámetros de variabilidad genética

### 4.2.1. Identificación de alelos

El número total de alelos (A) identificados a través de los 11 marcadores STR fue de 152. El mayor número de alelos ( $n=24$ ) se encontró en el locus OarCP49, mientras el menor número ( $n=6$ ) fue en el locus OarAE129 (Tabla 3).

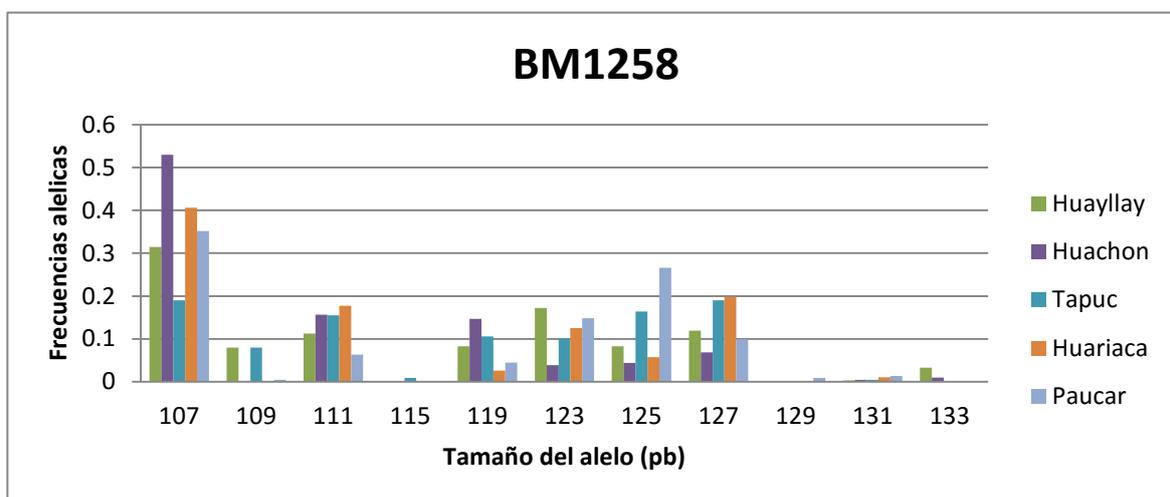
**Tabla 3.** Número total de alelos de la población. A= total de alelos

<b>Loci identificados</b>	<b>A</b>
BM1258	10
BM1818	17
CSRD247	15
HSC	15
INRA63	16
MAF65	10
McM527	8
OarAE129	6
OarCP49	24
OarFCB20	15
OarFCB304	16
Promedio	13.82

## 4.2.2. Frecuencias alélicas

### a. Locus BM1258:

De los 10 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 107 pb en todas las comunidades a excepción de la comunidad Tapuc (0.1903), el de menor frecuencia fue el de 131 pb; sin embargo, Tapuc presentó un alelo exclusivo de 115 pb (0.0088); y de igual modo, en Paucar se presentó el alelo exclusivo de 129 pb con una frecuencia de 0.009 (Figura 8, Tabla 4).



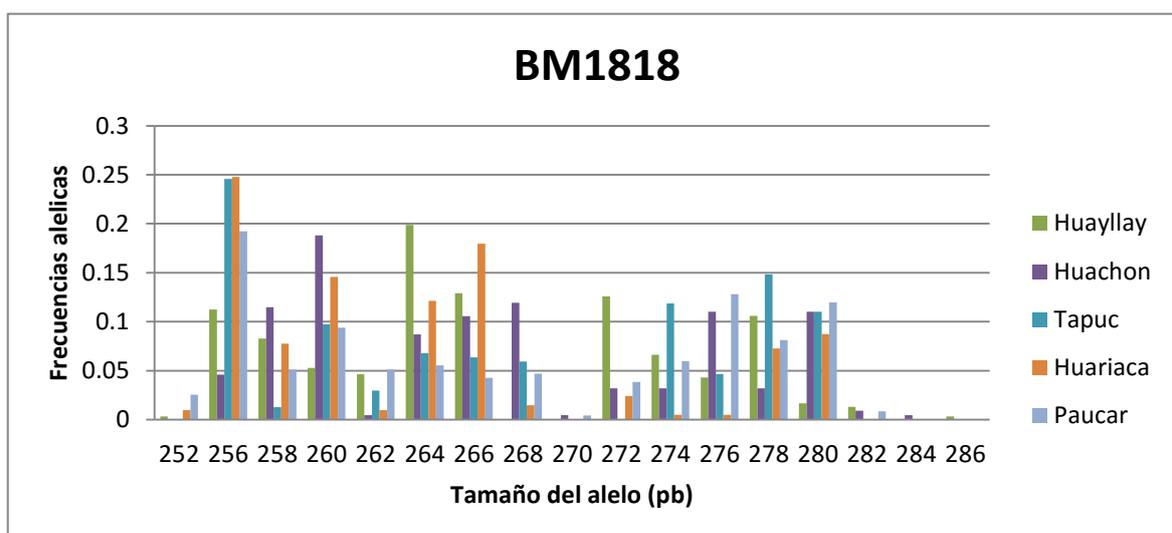
**Figura 8.** Distribución de frecuencias alélicas del locus BM1258 por comunidad.

**Tabla 4.** Frecuencias alélicas del locus BM1258 por comunidad.

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
107	0.3146	0.5294	0.1903	0.4063	0.3514
109	0.0795	0	0.0796	0	0.0045
111	0.1126	0.1569	0.1549	0.1771	0.0631
115	0	0	<b>0.0088</b>	0	0
119	0.0828	0.1471	0.1062	0.026	0.045
123	0.1722	0.0392	0.1018	0.125	0.1486
125	0.0828	0.0441	0.1637	0.0573	0.2658
127	0.1192	0.0686	0.1903	0.1979	0.0991
129	0	0	0	0	<b>0.009</b>
131	0.0033	0.0049	0.0044	0.0104	0.0135
133	0.0331	0.0098	0	0	0

**b. Locus BM1818:**

De los 17 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 256 pb en todas las comunidades y los de menor frecuencia fueron los de 252 pb y 286 pb. Huayllay presentó un alelo exclusivo 286 (0.0033); de igual modo, en Huachon se presentó el alelo exclusivo de 284 pb con una frecuencia de 0.0046 (Figura9, Tabla5).



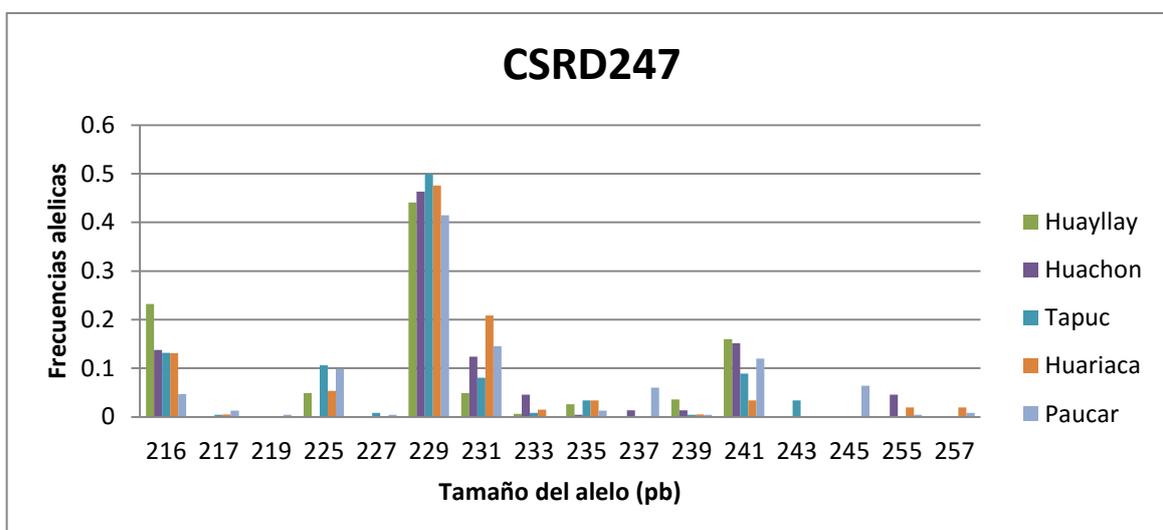
**Figura 9.** Distribución de frecuencias alélicas del locus BM1818 por comunidad.

**Tabla 5.** Frecuencias alélicas del locus BM1818 por comunidad.

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
252	0.0033	0	0	0.0097	0.0256
256	0.1126	0.0459	0.2458	0.2476	0.1923
258	0.0828	0.1147	0.0127	0.0777	0.0513
260	0.053	0.1881	0.0975	0.1456	0.094
262	0.0464	0.0046	0.0297	0.0097	0.0513
264	0.1987	0.0872	0.0678	0.1214	0.0556
266	0.1291	0.1055	0.0636	0.1796	0.0427
268	0	0.1193	0.0593	0.0146	0.047
270	0	0.0046	0	0	0.0043
272	0.1258	0.0321	0	0.0243	0.0385
274	0.0662	0.0321	0.1186	0.0049	0.0598
276	0.043	0.1101	0.0466	0.0049	0.1282
278	0.106	0.0321	0.1483	0.0728	0.0812
280	0.0166	0.1101	0.1102	0.0874	0.1197
282	0.0132	0.0092	0	0	0.0085
284	0	0.0046	0	0	0
286	0.0033	0	0	0	0

**c. Locus CSRD247:**

De los 16 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 229 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 217 pb. La población de Paucar presentó un alelo exclusivo de 219 pb (0.0043); de igual modo, en Tapuc se presentó el alelo exclusivo de 243 pb con una frecuencia de 0.0033 (Figura 10, Tabla 6).



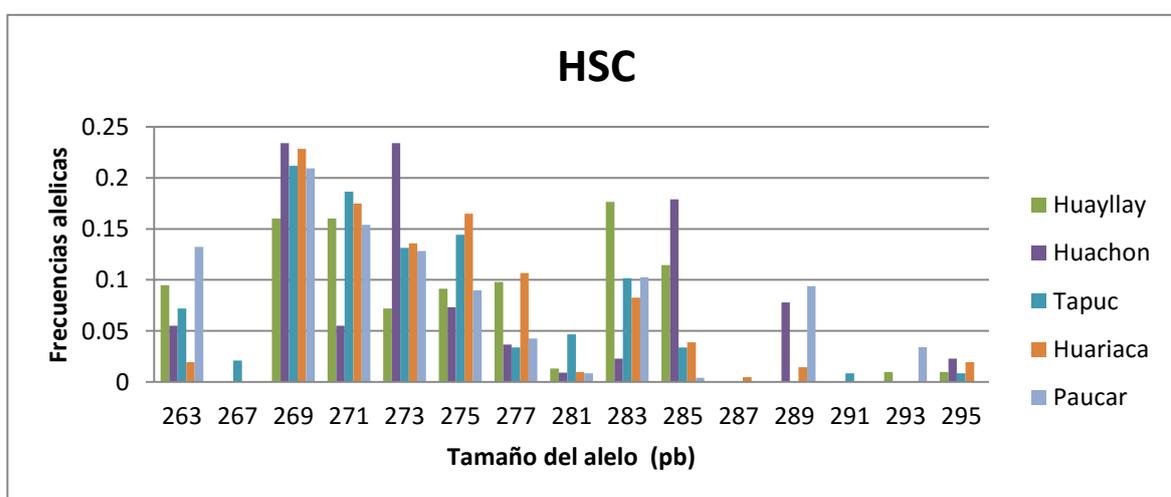
**Figura 10.** Distribución de frecuencias alélicas del locus CSRD247 por comunidad

**Tabla 6.** Frecuencias alélicas del locus CSRD247 por comunidad.

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
216	0.232	0.1376	0.1314	0.1311	0.047
217	0	0	0.0042	0.0049	0.0128
219	0	0	0	0	0.0043
225	0.049	0	0.1059	0.0534	0.0983
227	0	0	0.0085	0	0.0043
229	0.4412	0.4633	0.5	0.4757	0.4145
231	0.049	0.1239	0.0805	0.2087	0.1453
233	0.0065	0.0459	0.0085	0.0146	0
235	0.0261	0.0046	0.0339	0.034	0.0128
237	0	0.0138	0	0	0.0598
239	0.0359	0.0138	0.0042	0.0049	0.0043
241	0.1601	0.1514	0.089	0.034	0.1197
243	0	0	0.0033	0	0
245	0	0	0	0	0.0641
255	0	0.0459	0	0.0194	0.0043
257	0	0	0	0.0194	0.0085

**d. Locus HSC:**

De los 15 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 269 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 285 pb. La población de Tapu presentó dos alelos exclusivos de 267 pb (0.0043) y 291 pb (0.0085); de igual modo, en Huariaca se presentó el alelo exclusivo de 287 pb con una frecuencia de 0.0049 (Figura 11, Tabla7).



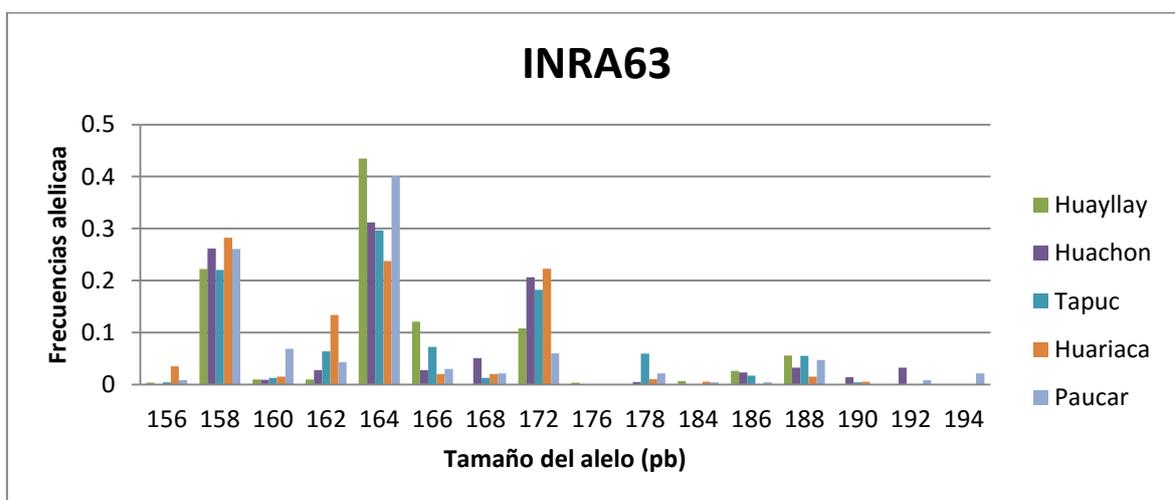
**Figura 11.** Distribución de frecuencias alélicas del locus HSC por comunidad

**Tabla 7.** Frecuencias alélicas del locus HSC por comunidad.

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
263	0.0948	0.055	0.072	0.0194	0.1325
267	0	0	0.0212	0	0
269	0.1601	0.2339	0.2119	0.2282	0.2094
271	0.1601	0.055	0.1864	0.1748	0.1538
273	0.0719	0.2339	0.1314	0.1359	0.1282
275	0.0915	0.0734	0.1441	0.165	0.0897
277	0.098	0.0367	0.0339	0.1068	0.0427
281	0.0131	0.0092	0.0466	0.0097	0.0085
283	0.1765	0.0229	0.1017	0.0825	0.1026
285	0.1144	0.1789	0.0339	0.0388	0.0043
287	0	0	0	0.0049	0
289	0	0.078	0	0.0146	0.094
291	0	0	0.0085	0	0
293	0.0098	0	0	0	0.0342
295	0.0098	0.0229	0.0085	0.0194	0

**e. Locus INRA63:**

De los 16 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 164 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 156 pb. La población de Huayllay presentó un alelo exclusivo de 176 pb (0.0033); de igual modo, en Paucar se presentó el alelo exclusivo de 194 pb con una frecuencia de 0.0214 (Figura 12, Tabla8).



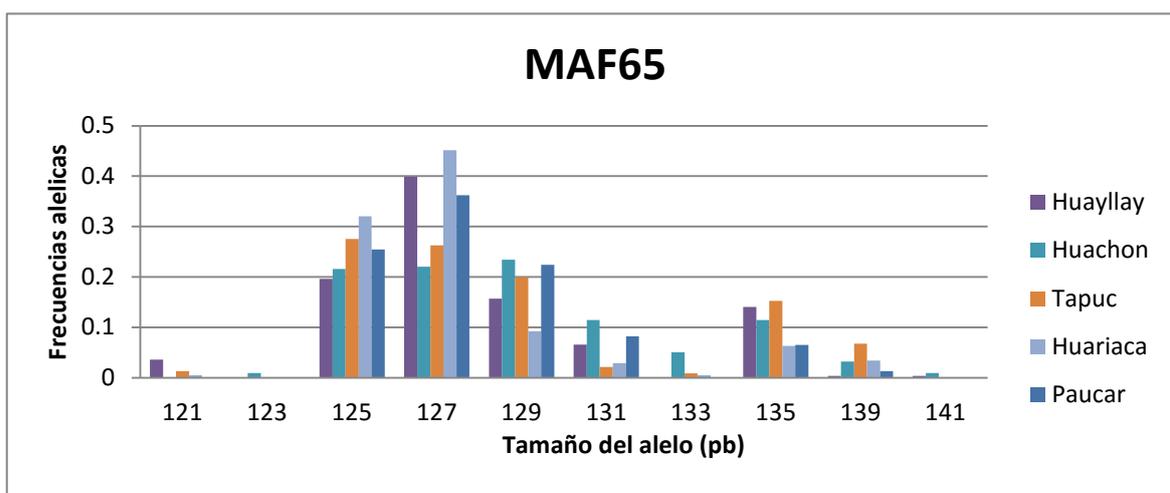
**Figura 12.** Distribución de frecuencias alélicas del locus INRA063 por comunidad

**Tabla 8.** Frecuencias alélicas del locus INRA063 por comunidad

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
156	0.0033	0	0.0042	0.0347	0.0085
158	0.2222	0.2615	0.2203	0.2822	0.2607
160	0.0098	0.0092	0.0127	0.0149	0.0684
162	0.0098	0.0275	0.0636	0.1337	0.0427
164	0.4346	0.3119	0.2966	0.2376	0.4017
166	0.1209	0.0275	0.072	0.0198	0.0299
168	0	0.0505	0.0127	0.0198	0.0214
172	0.1078	0.2064	0.1822	0.2228	0.0598
176	0.0033	0	0	0	0
178	0	0.0046	0.0593	0.0099	0.0214
184	0.0065	0	0	0.005	0.0043
186	0.0261	0.0229	0.0169	0	0.0043
188	0.0556	0.0321	0.0551	0.0149	0.047
190	0	0.0138	0.0042	0.005	0
192	0	0.0321	0	0	0.0085
194	0	0	0	0	0.0214

**f. Locus MAF65:**

De los 10 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 127 pb en todas las comunidades y los de menor frecuencia fueron los de 139 pb y 141 pb. Solo la población de Huachon presentó un alelo exclusivo de 123 pb (0.0092) (Figura 13, Tabla 9).



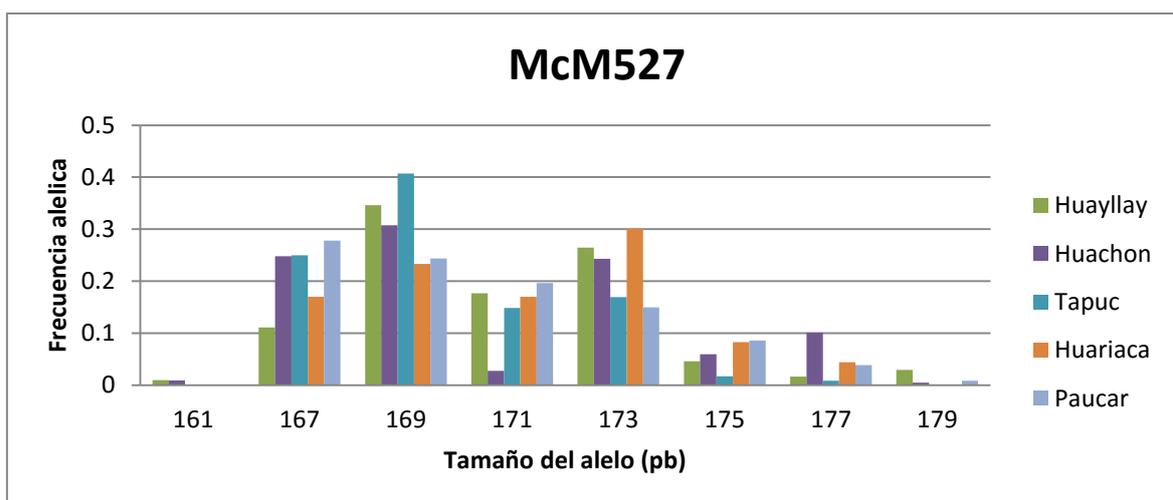
**Figura 13.** Distribución de frecuencias alélicas del locus MAF65 por comunidad

**Tabla 9.** Frecuencias alélicas del locus MAF65 por comunidad

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
121	0.0359	0	0.0127	0.0049	0
123	0	0.0092	0	0	0
125	0.1961	0.2156	0.2754	0.3204	0.2543
127	0.3987	0.2202	0.2627	0.4515	0.3621
129	0.1569	0.2339	0.1992	0.0922	0.2241
131	0.0654	0.1147	0.0212	0.0291	0.0819
133	0	0.0505	0.0085	0.0049	0
135	0.1405	0.1147	0.1525	0.0631	0.0647
139	0.0033	0.0321	0.0678	0.034	0.0129
141	0.0033	0.0092	0	0	0

**g. Locus McM527:**

De los 8 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 169 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 179 pb. Ninguna de las comunidades presentó alelos exclusivos (Figura 14, Tabla10).



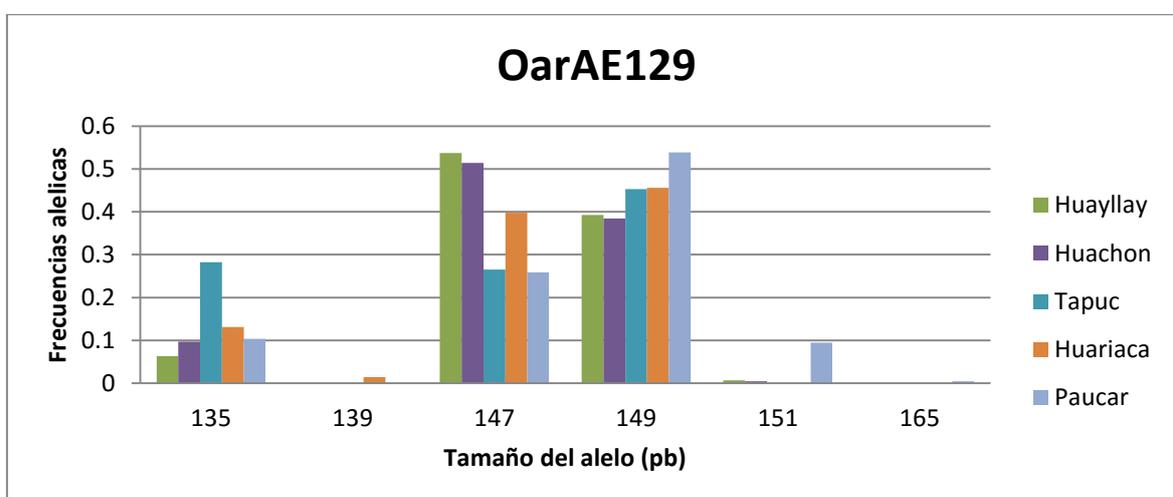
**Figura 14.** Distribución de frecuencias alélicas del locus McM527 por comunidad.

**Tabla 10.** Frecuencias alélicas del locus McM527 por comunidad.

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
161	0.0098	0.0092	0	0	0
167	0.1111	0.2477	0.25	0.1699	0.2778
169	0.3464	0.3073	0.4068	0.233	0.2436
171	0.1765	0.0275	0.1483	0.1699	0.1966
173	0.2647	0.2431	0.1695	0.301	0.1496
175	0.0458	0.0596	0.0169	0.0825	0.0855
177	0.0163	0.1009	0.0085	0.0437	0.0385
179	0.0294	0.0046	0	0	0.0085

#### h. Locus OarAE129

De los 6 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 149 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 151 pb. La población de Huariaca presentó un alelo exclusivo de 139 pb (0.0146); de igual modo, en Paucar se presentó un alelo exclusivo de 165 pb con una frecuencia de 0.0043 (Figura 15, Tabla 11).



**Figura 15.** Distribución de frecuencias alélicas del locus OarAE129 por comunidad.

**Tabla 11.** Frecuencias alélicas del locus OarAE129 por comunidad.

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
135	0.0638	0.0972	0.2821	0.1311	0.1034
139	0	0	0	0.0146	0
147	0.5369	0.5139	0.265	0.3981	0.2586
149	0.3926	0.3843	0.453	0.4563	0.5388
151	0.0067	0.0046	0	0	0.0948
165	0	0	0	0	0.0043

### i. Locus OarcP49

De los 24 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 81 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 107 pb. La comunidad de Huayllay presentó tres alelos exclusivos de 111 pb (0.01), 123 pb (0.0033) y de 137 pb (0.0067); de igual modo, la comunidad de Huachon presentó un alelo exclusivo de 119 pb (0.055). La comunidad de Huariaca y Paucar también presentaron los alelos exclusivos de 121 pb (0.0097) y 103 pb (0.0085) respectivamente (Figura16, Tabla 12).

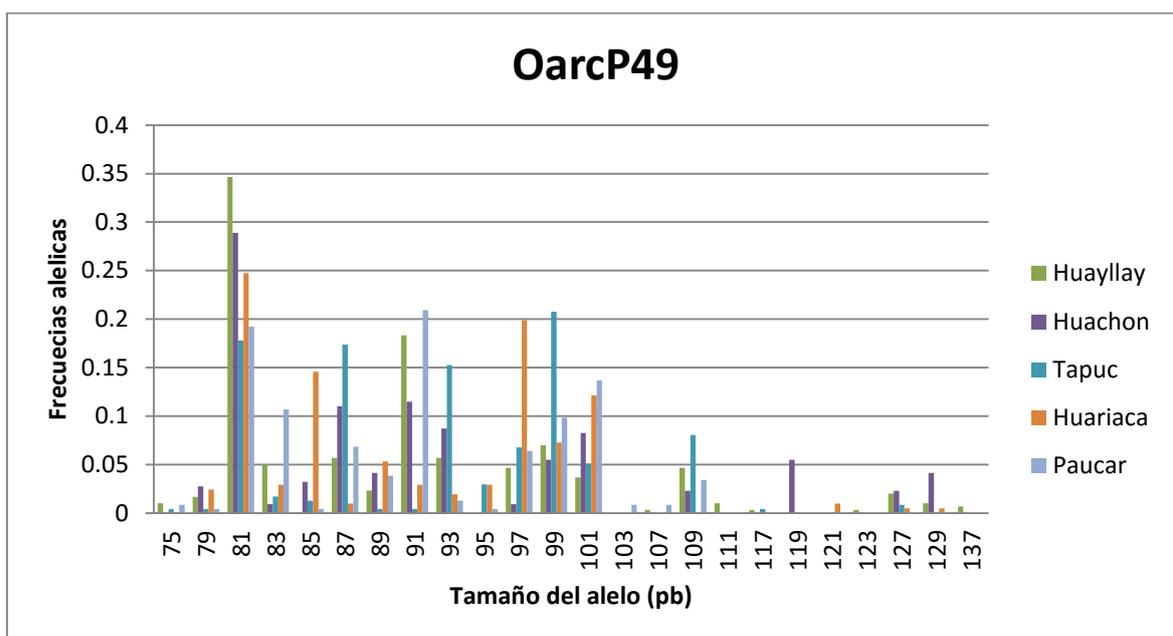


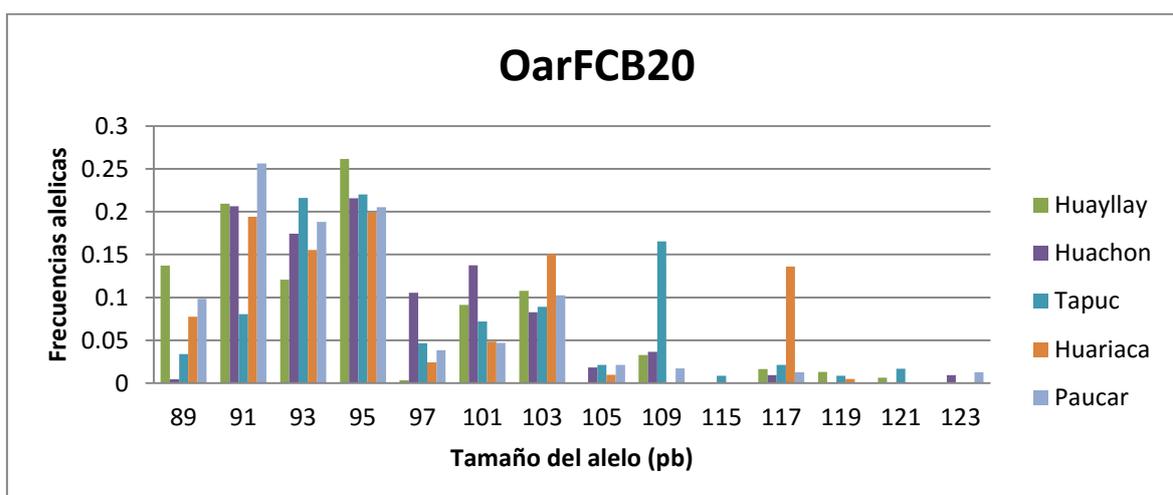
Figura 16. Distribución de frecuencias alélicas del locus OarcP49 por comunidad.

**Tabla 12.** Frecuencias alélicas del locus OarcP49 por comunidad.

<b>(N)</b>	<b>Huayllay</b>	<b>Huachon</b>	<b>Tapuc</b>	<b>Huariaca</b>	<b>Paucar</b>
75	0.01	0	0.0042	0	0.0085
79	0.0167	0.0275	0.0042	0.0243	0.0043
81	0.3467	0.289	0.178	0.2476	0.1923
83	0.05	0.0092	0.0169	0.0291	0.1068
85	0	0.0321	0.0127	0.1456	0.0043
87	0.0567	0.1101	0.1737	0.0097	0.0684
89	0.0233	0.0413	0.0042	0.0534	0.0385
91	0.1833	0.1147	0.0042	0.0291	0.2094
93	0.0567	0.0872	0.1525	0.0194	0.0128
95	0	0	0.0297	0.0291	0.0043
97	0.0467	0.0092	0.0678	0.199	0.0641
99	0.07	0.055	0.2076	0.0728	0.0983
101	0.0367	0.0826	0.0508	0.1214	0.1368
103	0	0	0	0	0.0085
107	0.0033	0	0	0	0.0085
109	0.0467	0.0229	0.0805	0	0.0342
111	0.01	0	0	0	0
117	0.0033	0	0.0042	0	0
119	0	0.055	0	0	0
121	0	0	0	0.0097	0
123	0.0033	0	0	0	0
127	0.02	0.0229	0.0085	0.0049	0
129	0.01	0.0413	0	0.0049	0
137	0.0067	0	0	0	0

**j. Locus OarFCB20:**

De los 14 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 95 pb en todas las comunidades y el de menor frecuencia fue el de 97 pb para la comunidad de Huayllay. De igual forma, a comunidad de Tapuc fue la única en presentar un alelo exclusivo de 115 pb (0.0085) (Figura 17, Tabla 13).



**Figura 17.** Distribución de frecuencias alélicas del locus OarFCB20 por comunidad

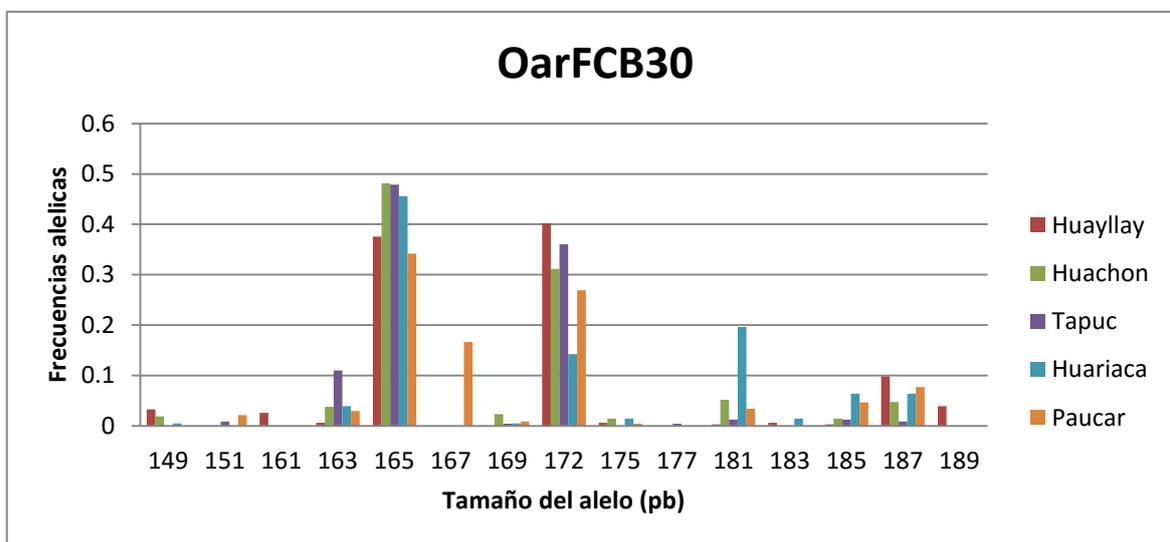
**Tabla 13.** Frecuencias alélicas del locus OarFCB20 por comunidad

(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
89	0.1373	0.0046	0.0339	0.0777	0.0983
91	0.2092	0.2064	0.0805	0.1942	0.2564
93	0.1209	0.1743	0.2161	0.1553	0.188
95	0.2614	0.2156	0.2203	0.199	0.2051
97	0.0033	0.1055	0.0466	0.0243	0.0385
101	0.0915	0.1376	0.072	0.0485	0.047
103	0.1078	0.0826	0.089	0.1505	0.1026
105	0	0.0183	0.0212	0.0097	0.0214
109	0.0327	0.0367	0.1653	0	0.0171
115	0	0	0.0085	0	0
117	0.0163	0.0092	0.0212	0.1359	0.0128
119	0.0131	0	0.0085	0.0049	0
121	0.0065	0	0.0169	0	0
123	0	0.0092	0	0	0.0128

**k. Locus OarFCB30:**

De los 15 alelos registrados en este locus, el de mayor frecuencia fue el alelo de 165 pb en todas las comunidades y los de menor frecuencia fueron los de 181 pb y 185 pb para la comunidad de Huayllay. La comunidad de Paucar presentó un alelo exclusivo de 167 pb (0.1667), de igual forma la comunidad de Tapuc presentó un alelo exclusivo de 177 pb (0.0042) y la comunidad de Huayllay

presentó dos alelos exclusivos de 161 pb (0.0261) y 189 pb (0.0392) (Figura 18, Tabla 14).



**Figura 18.** Distribución de frecuencias alélicas del locus OarFCB30 por comunidad

**Tabla 14.** Frecuencias alélicas del locus OarFCB30 por comunidad.

<b>OarFCB30</b>					
(N)	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
149	0.0327	0.0189	0	0.0049	0
151	0	0	0.0085	0	0.0214
161	0.0261	0	0	0	0
163	0.0065	0.0377	0.1102	0.0392	0.0299
165	0.3758	0.4811	0.4788	0.4559	0.3419
167	0	0	0	0	0.1667
169	0	0.0236	0.0042	0.0049	0.0085
172	0.402	0.3113	0.3602	0.1422	0.2692
175	0.0065	0.0142	0	0.0147	0.0043
177	0	0	0.0042	0	0
181	0.0033	0.0519	0.0127	0.1961	0.0342
183	0.0065	0	0	0.0147	0
185	0.0033	0.0142	0.0127	0.0637	0.047
187	0.098	0.0472	0.0085	0.0637	0.0769
189	0.0392	0	0	0	0

### 4.2.3. Equilibrio Hardy Weinberg (EHW)

De los once microsatélites evaluados, BM1258 y OarFCB20 mostraron estar en equilibrio de H-W en el total de localidades evaluadas. De igual forma, los microsatélites CSRD247, HSCA, INRA63, MAF65, McM527, OarAE129, OarCP49 y OarFCB304 mostraron estar en equilibrio H-W en al menos 4 o 3 localidades de todas las evaluadas.

Por el contrario, solo el microsatélite BM1258 mostró desviación significativa del equilibrio H-W.

**Tabla 15.** Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) evaluado mediante la Prueba exacta calculada para cada locus en cada comunidad.

	Huayllay	Huachon	Tapuc	Huariaca	Paucar
Locus	p-val	p-val	p-val	p-val	p-val
<b>BM1258</b>	***	***	***	***	***
<b>BM1818</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>CSRD247</b>	ns	ns	ns	***	**
<b>HSCA</b>	ns	ns	ns	***	ns
<b>INRA63</b>	ns	ns	ns	***	ns
<b>MAF65</b>	ns	ns	ns	**	ns
<b>McM527</b>	ns	ns	*	ns	ns
<b>OarAE129</b>	***	ns	**	*	ns
<b>OarCP49</b>	***	ns	ns	ns	ns
<b>OarFCB20</b>	ns	ns	ns	ns	ns
<b>OarFCB304</b>	ns	***	ns	ns	*

\* P-val = valor de significancia, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, ns=no significante.

#### 4.2.4. Heterocigosidad (Nei 1984) y PIC

La heterocigosidad observada promedio (0.739) mostró un valor alto. Específicamente el locus BM1818 (0.881) fue quién mayor valor mostró en la evaluación, mientras que el locus BM1258 (0.504) mostró el menor valor de heterocigosidad observada. En cuanto a la heterocigosidad esperada (valor estadístico teórico) el mayor valor también lo obtuvo el locus BM1818 (0.905) y el menor valor OarAE129 (0.626).

Por otro lado, el Contenido de Información Polimórfica (PIC) mostró valores mayores a 0.5 para todos los loci utilizados.

**Tabla 16.** Estimación de Heterocigosidad, PIC, calculadas para la población Total.

<b>Locus</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>PIC</b>
<b>BM1258</b>	0.504	0.805	0.782
<b>BM1818</b>	0.881	0.905	0.896
<b>CSR247</b>	0.7	0.739	0.715
<b>HSC</b>	0.857	0.878	0.865
<b>INRA63</b>	0.761	0.788	0.761
<b>MAF65</b>	0.776	0.773	0.739
<b>McM527</b>	0.767	0.784	0.75
<b>OarAE129</b>	0.508	0.626	0.55
<b>OarCP49</b>	0.844	0.883	0.873
<b>OarFCB20</b>	0.852	0.857	0.841
<b>OarFCB304</b>	0.681	0.718	0.678
<b>Promedio</b>	0.739	0.796	0.768

### **4.3. Discusión de los resultados**

La extracción de ADN fue exitosa siguiendo el protocolo de Sambrook et al. (2001). La concentración de ADN así como la calidad fueron suficientemente buenas para lograr una buena amplificación de fragmentos por PCR.

La PCR a su vez, al ser llevada a cabo en multiplex (más de dos marcadores amplificando a la vez), garantizó una buena amplificación de los fragmentos deseados así como también una gran eficiencia. Lo dicho último, se refiere a que en una sola corrida de PCR podemos amplificar un conjunto de marcadores microsatélite utilizando una cantidad mínima de reactivos para todos ellos (buffer de PCR, enzima Taq polimerasa, etc), lo cual es mucho más rentable que amplificar un marcador microsatélite a la vez que a su vez va a gastar mucha más cantidad de reactivos (Konomi et al. 2000).

Así mismo los marcadores microsatélites seleccionados para el presente trabajo han mostrado ser bastante informativos para las poblaciones de ovinos criollos, y esto se debe a que la International Society of Animal Genetics (Sociedad Internacional de Genética Animal) así como otros investigadores, recomiendan el uso de dichos marcadores microsatélites para el estudio de caracterización genética de ovinos (ISAG 2013, Rosa et al. 2013, Peraza et al. 2013).

#### 4.3.1. Parámetros de variabilidad genética

##### *Número de alelos y frecuencias alélicas*

Para la población de ovinos criollos del departamento de Pasco presentó una gran cantidad de alelos (152) así como un promedio alélico significativo (13.82), el cual se puede considerar como indicador que estaría dando indicios de un alto grado de diversidad en la población de ovinos evaluada.

De igual forma, las frecuencias alélicas de los once marcadores microsatélites evaluados en la población de ovinos nos muestran la gran variación con la que aparecen presentes en una u otra localidad evaluada del departamento de Pasco. Es lógico encontrar predominio de ciertos alelos en la población ya que en algún grado los ovinos de diferentes localidades presentan rasgos genéticos diferentes. Además, el predominio de algunos alelos puede estar más relacionado con las características físicas de los ovinos. Por ejemplo: se pudo ver que en la localidad de Huayllay las ovejas evaluadas presentaban cuernos, característica que es rara de encontrar en ovinos criollos; sin embargo, podría estar relacionada a la predominancia de alguno de alelos o gen (Mueller 1985). Para confirmar mejor esta hipótesis haría falta realizar estudios, tales como la evaluación específica del gen relacionado, pero que el presente trabajo no ha contemplado.

Por otro lado, el promedio de número de alelos de la población de ovinos criollos del departamentos de Pasco ( $n_{\text{promedio}}=13.82$ ) mostró valores que superan en gran distancia a poblaciones de ovinos de India ( $n_{\text{promedio}}=5.7$ ; Arora 2006) y mostró tener valores muy parecidos a los de poblaciones de ovinos de África ( $n_{\text{promedio}}=13.6$ ; Wafula 2005).

### *Equilibrio Hardy – Weinberg*

La prueba de EHW se basa en la hipótesis nula de que las poblaciones están en equilibrio cuando cumplen condiciones, tales como, ser una población suficientemente grande, presentar un apareamiento aleatorio, presentar bajos índices de presión selectiva, presencia de mutación, etc. En el presente trabajo se ha podido obtener, a través de la prueba de EHW, que mayoría de las poblaciones de ovinos evaluadas se encuentran en equilibrio y por lo tanto cumplen las condiciones de la hipótesis nula ya mencionada (Sánchez 2012).

Por el contrario, solo el microsatélite BM1258 mostró desviación significativa del equilibrio H-W, por lo que se puede entender que para este microsatélite la población no reúne las características antes mencionadas.

### *Heterocigosidad Observada y Esperada*

En todos los microsatélites analizados se obtuvo que la  $H_o$  fue menor que la  $H_e$ , lo que indicaría que hay una mayor frecuencia de ovinos homocigotos que heterocigotos, y es sabido que la mayor diversidad genética la producen los individuos heterocigotos. A pesar de esto, se ha observado tanto en la  $H_e$  así como en la  $H_o$  que los valores obtenidos son altos en cada uno de los loci utilizados. Basándonos en estudios previos, tales como: el de Wafula et al. (2005) quién encontró en poblaciones de ovinos de africanos valores de  $H_e=0.706$ , o trabajos como los de Arora y Bhatia (2006) quienes encontraron en poblaciones de ovinos de la India valores de  $H_e=0.864$ , o también trabajos como el de Paiva et al. (2005), quién encontró en poblaciones de ovinos brasileros valores de  $H_e=0.75$ ; todos estos investigadores indicaron que dichos valores de heterocigosidad se consideran como indicadores de alta diversidad genética. Por tal motivo, los valores de heterocigosidad obtenidos por el presente

trabajo para las poblaciones de ovinos criollos ( $H_e = 0.796$ ) están indicando presencia de una alta diversidad genética en la población estudiada

La presencia de una alta diversidad genética en los ovinos criollos, debe estar relacionada a la rusticidad, capacidad de adaptación al clima frío, factores de estrés, etc., lo cual hace a estos animales importantes para la conservación de genes de resistencia y adaptación.

A su vez, estos resultados confirman los valores obtenidos del número promedio de alelos, los cuales ya venían indicando la presencia de una alta diversidad genética en la población de ovinos. De esta forma, el presente trabajo, pionero en Perú y uno de los pocos que se han realizado en América del Sur, se convierte en una fuente importante del conocimiento de la diversidad genética de los ovinos criollos del departamento de Pasco.

#### *Contenido de Información Polimórfica (PIC)*

Los valores del contenido de información polimórfica (PIC) obtenidos muestran ser superiores a 0.5; lo cual indica que todos los microsatélites (11) utilizados son considerados polimórficos y muy informativos. Así mismo se puede decir que los marcadores utilizados en el presente trabajo son bueno para detectar variabilidad genética en esta especie (Guo y Elston 1999).

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES**

Utilizando once marcadores microsatélites se concluye que la población de ovinos criollos del departamento de Pasco presenta una alta diversidad genética.

La presencia de alta diversidad genética en la población de ovinos criollos del departamento de Pasco se debe a la rusticidad, capacidad de resistencia y adaptación que presentan los ovinos criollos a su hábitat.

Los marcadores microsatélites BM1258, BM1818, CSRD247, HSC, INRA63, MAF65, McM527, OarAE129, OarCP49, OarFCB20 y OarFCB304 resultaron ser muy informativos y útiles para el estudio de caracterización genética de ovinos criollos.

## **CAPITULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

Hace falta expandir este tipo de estudios de caracterización genética en poblaciones de ovinos criollos de otras zonas del Perú, para que así puedan ser complementadas con la vasta información a nivel morfométrica que existe.

Los ovinos criollos estudiados son buenos candidatos para un estudio más específico de genes de resistencia y adaptación a factores de estrés.

Es posible e importante realizar el mejoramiento genético de los ovinos, pero también es importante rescatar la diversidad genética presente en estas poblaciones ya que es por este factor que dichas poblaciones tienen la capacidad de resistencia y adaptación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Albano DC, Lalueza C, et al. 2006. The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. PNAS 103 (21) 8113-8118
- Alencastre R. & Gómez N. 2005. Comportamiento reproductivo del ovino criollo en el Altiplano peruano. Archivos Zootecnia. 54: 541-544
- Arora R y Bhatia S. 2006. Genetic diversity of magra sheep from India using microsatellite analysis. Asian-Australian Journal Animal Science. Vol. 19, No. 7: 938 – 942.
- Baumung R, Cubric V, Schwend K, et al. 2006. Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. Journal of Animal Breeding Genetics, 123: 265–271.
- CENAGRO. (en línea) 2012. Censo Nacional Agropecuario. URL: <http://censos.inei.gob.pe/Cenagro/redatam/> (Visitado en Junio del 2015)
- Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. Euphytica 142: 169-196
- Dalvit C, Sacca E, Cassandro M, et al. 2008. Genetic characterization of alpine sheep breeds. Acta agriculturae Slovenica, suplement 2, 79–84.
- Díaz R. & Oviedo F. 2013. Cadena productiva de ovinos. Dirección General de Competitividad Agraria. Dirección de Información Agraria.
- Eguiluz ML. 2014. Identificación de marcadores microsatélites para el estudio de la diversidad genética de taenia solium. Tesis para optar el grado de magister en bioquímica y biología molecular. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 114 pp.
- FAO. 2010. Parte 1: Situación de la biodiversidad en el sector ganadero. Roma
- Ferreira M, & Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, DF.
- Freeland JR. 2005. Molecular Ecology. John Wiley and Sons Inc. USA. pag. 110-111.
- Gonzalez LF. 2008. Evaluación de la diversidad genética en una colección de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de ruanda (África)

evaluación de la diversidad genética en una colección de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) de Ruanda. 130pp.

Guo X & Elston RC. 1999. Linkage Information Content of Polymorphic Genetic Markers. *Human Heredity* 49 (2): 112–18.

Guo SW & Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48:361–372

Hajeer A, Worthington J, & John S. 2000. SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. Eaton Publishing, Manchester, U.K.

Hedrick PW & Kalinowski ST. Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology System* 2000; 31:139–62.

ISAG. (en línea) 2013. The International Society for Animal Genetics (La Sociedad Internacional para Genética Animal). URL: <http://www.isag.us/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true> (Visitado en Enero 2016)

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, Vol. 16, No 5, p. 1099-1106.

Konomi N, Yamaguchi M, Naito H, et al. 2000. Simultaneous detection of Hepatitis B, C, and G viral genomes by multiplex PCR method. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 53: 70- 72

Lozano JM, Bouzada JA, Maya MR, et al. 2008. Control genealógico en la especie ovina mediante análisis de marcadores microsatélite de ADN. *Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*.

MINAG. 2013. Manual de ovinos y las buenas prácticas.

Mattiello S. 1998. El proceso de domesticación. Instituto de Zootécnia. Universidad de Estudios de Milán.

Morales C. 2004. Las Cordilleras del Perú (primera edición). Lima: Consejo Editorial USMP. p. 201.

Mueller J. 1985. Genética del Merino mocho Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche. Presencia, 1.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.

- Paiva SR, Faria DA, Silvério VC, et al. 2005. Genetic variability among brazilian sheep using microsatellites. FAO, The Role Of Biotechnology: 1-5 March.
- Peraza P, Gonzalo R, Ravagnolo O, Dalla RM, Kelly L. 2013. Desarrollo de un multiplex de microsatélites para diagnóstico de paternidad en ovinos Corriedale del Uruguay. Agrocienza Uruguay - Volumen 17 1:114-119
- Roizès G. 2000. Identification of Microsatellite Markers: Screening for Repeat Sequences and Mapping Polymorphisms, p. 152, En A. Hejeer, et al., eds. SNP and microsatellite genotyping: markers for genetic analysis. Biotechniques Books, USA.
- Rosa AJ, Sardina MT, Mastrangelob S, Toloneb M, Portolano B. 2013. Parentage verification of Valle del Belice dairy sheep using multiplex microsatellite panel. Small Ruminant Research 113 (2013) 62-65
- Salamanca I, Catachura A, Sánchez J, et al. 2014. Ovinos criollos y mestizos en el litoral sur peruano. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. 62-64 pp.
- Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez M. 2012. Inferencia Estadística Para El Equilibrio de Hardy-Weinberg En Estudios de Genotipado Con Datos Faltantes. Tesis para optar el grado de Máster en Estadística e Investigación Operativa. Universidad Politecnica de Catalunya.
- Wafula PO, Jianlin H, Sangare N, et al. 2005. Genetic characterization of West African Djallonke sheep using microsatellite markers. FAO, The Role Of Biotechnology: 1-5 March.

## **ANEXOS**

**Anexo 1. PROTOCOLO: Multiplex 1 (ETH3, ETH10, ETH225, BM1824, BM2113, SPS115, INRA023, TGLA122, TGLA227)**

	Con. Stock		Conc. Final		1 Rx.
H2O MQ					3.85
BUFFER	10	X	1	X	1.1
dNTPs	2.5	mM	0.25	mM	1.1
MgCl <sub>2</sub>	50	mM	2	mM	0.44
PRIMER F (ETH3, ETH10)	20	μM	0.2	μM	0.11
PRIMER R (ETH3, ETH10)	20	μM	0.2	μM	0.11
PRIMER F (BM1824, TGLA122, TGLA227, SPS115)	20	μM	0.28	μM	0.15
PRIMER F (BM1824, TGLA122, TGLA227, SPS115)	20	μM	0.28	μM	0.15
PRIMER F (BM2113, ETH225)	20	μM	0.16	μM	0.09
PRIMER R (BM2113, ETH225)	20	μM	0.16	μM	0.09
PRIMER 023F	20	μM	0.35	μM	0.19
PRIMER 023R	20	μM	0.35	μM	0.19
TAQ	5	U	0.5	U	0.10
DNA	5	ng/μL			2
Volumen /mix					
Volumen total					11

**Anexo 2. PROTOCOLO: Multiplex 2 (TGLA53-TGLA126)**

	Con. Stock		Conc. Final		1 Rx.
H2O MQ					4.91
BUFFER	10	X	1	X	1.1
dNTPs	2.5	mM	0.2	mM	0.88
MgCl <sub>2</sub>	50	mM	1.2	mM	0.264
PRIMER 53F	20	μM	0.35	μM	0.193
PRIMER 53R	20	μM	0.35	μM	0.193
PRIMER 126F	20	μM	0.35	μM	0.193
PRIMER 126R	20	μM	0.35	μM	0.193
TAQ	5	U	0.4	U	0.08
DNA	5	ng/μL			3
Volumen /mix					
Volumen total					11

