Estudio de la variabilidad genética mediante microsatélites en una población de vicuñas criadas en semicautiverio

Study of genetic variability through microsatellites in a population of vicuñas raised in semicautiverio

 Elmer René Chávez Araujo1\*; Heber Max Robles Castillo2

1 Facultad de Ciencias de Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica, Paturpampa s/n – Ciudad Universitaria, Huancavelica, Perú.
2 Facultad de ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n- Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

\* Autor correspondiente: elmer92@hotmail.com (E. Chávez)

ResumEN

Esta investigación, se realizó en el laboratorio de la Universidad Nacional de Huancavelica, a 3680 m.s.n.m. El objetivo fue estudiar la variabilidad genética de las vicuñas en semicautiverio del Centro de Investigación y Producción de Camélidos Sudamericanos Lachocc – Huancavelica, se utilizó sangre de vicuñas, capturadas en un evento denominado chaccu, el lugar de crianza se denomina Saccsalla, ubicada a una altura de 4450 m.s.n.m con una población de 205 vicuñas entre machos y hembras, adultos y crías; se tomaron muestras de 28 vicuñas, que fueron transportadas en tubos de ensayo de 5 ml con anticoagulante. Las muestras fueron procesadas para extraer ADN con el método de Fenol-cloroformo. Se cuantificó el ADN por espectrofotometría y se determinó la calidad del ADN extraído en gel de agarosa; luego se amplificó el ADN por PCR convencional, utilizando los siguientes PRIMERS: LCA 37, LCA 19, LCA 5, LCA 22, LCA 90, YWLL 29, YWLL 40, YWLL 43, VOLP 4, VOLP 72, VOLP 92 y VOLP 77. Encontrándose una variabilidad alta, mostrándose en el análisis que este grupo de vicuñas en semicautiverio presenta mayor número de alelos con el marcador VOLP-92.

**Palabras clave:** Variabilidad genética; PCR; microsatélites; Vicuñas.

abstract

This research was carried out in the laboratory of the National University of Huancavelica at 3680 m.s.n.m. The objective of this study was to study the genetic variability of vicuñas in semi-captivity of the Lachocc – Huancavelica Center for Research and producction of South American camelids, vicuñas blood was used, capture in na event called chaccu, the place of breeding is called Saccsalla, located at an altitude of 4450 m.s.n.m with a population of 205 vicuña between males and females, adults and youngs; 28 vicuñas were sampled and transported in 5 ml test tubes with anticoagulant. The samples were processed to extract DNA using the phenol-chloroform method. The DNA was quantified by spectrophotometry and the quality of DNA extracted DNA on agarose gel was determined; Then the DNA was amplified by conventional PCR using the following primers: **LCA 37, LCA 19, LCA 5, LCA 22, LCA 90, YWLL 29, YWLL 40, YWLL 43, VOLP 4, VOLP 72, VOLP 92 y VOLP 77.** A high variability was found, showing in the analysis that this group of vicuñas in semi-captivity present a greater number of alleles with the marker VOLP-92.

**Keywords:** Genetic variability; PCR; microsatellites; Vicuñas.

1. INTRODUCCIÓN

Muchos planes de explotación de las vicuñas, en la actualidad, incluyen el cautiverio de animales en pequeños criaderos (en Argentina) o en corrales grandes (hasta 1000 ha, en Perú). Algunos efectos que puede generar el encierro de estos animales silvestres son: Desde el punto de vista genético, existen tres fenómenos probabilísticos en pequeñas poblaciones: entrecruzamiento, deriva génica y selección artificial con el riesgo de la expresión de genes deletéreos que previamente estaban enmascarados por los genes dominantes epistáticos (Price 1984). El cautiverio, además, genera la disminución de la elección de pareja de los animales, así como de los mecanismos de selección sexual. De ahí que se inicien mecanismos de selección artificial, por lo general sin conciencia del domesticador (Müntzing 1959). La tasa de cambios fenotípicos como consecuencia de la selección artificial es mucho mayor que la tasa lenta de cambios en poblaciones libres de animales silvestres (Barrat et al. 1998).

Es interesante destacar que muchos usos de fauna silvestre pueden ser económicamente Sustentables sin serlo ecológicamente. El valor comercial de una especie no significa entonces que asegure su conservación (Vilá y Cassini, 1994) y aquí hay que tener en cuenta que cualquier explotación de fauna silvestre debe ser rigurosamente regulada y manejada en niveles comunales, nacionales e internacionales. Por otro lado, el valor de mercado de la fauna puede aumentar la probabilidad de conservación si se maneja correctamente, pero esto implica que los beneficios económicos se mantengan en el área particularmente beneficiando a las comunidades locales (Tapper y Reynolds, 1994).

El Perú posee el 80% de la población mundial de vicuñas, con aproximadamente 140 mil cabezas, este camélido sudamericano vive hasta 20 años y está adaptado al clima de la puna, entre los 3,500 y 5,000 m.s.n.m., su fibra es tan fina y suave como la seda, cuyo valor llega a los $ 300 por kg. El manejo de vicuñas es una magnífica opción para el desarrollo de los pobladores andinos, pero la caza indiscriminada de estos hermosos e inteligentes animales está en peligro de extinción a causa de personas inescrupulosas que las matan para obtener su fibra. Según el compendio estadístico de la región de Huancavelica, 2008; Huancavelica contaba con 13,812 números de vicuñas y en el año 2005 tenía una población de 14,709 vicuñas la cual se observa que ha ido disminuyendo el número de vicuñas.

Las poblaciones silvestres de vicuñas poseen bajos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones y altos niveles entre poblaciones (O´Ryan et al. 1998; Barrat et al. 1998), por lo menos en las poblaciones peruanas, que son las más numerosas de la especie (Wheeler, 1995).

Las hipótesis actualmente vigentes sobre cuál es la relación genética entre cada una de las especies de CSA, considerando las especies silvestres y domésticas, están basadas en estudios moleculares (principalmente aquellos realizados por la Dra. Jane Wheeler, de la Universidad de San Marcos, Lima (Stanley et al. 1994; Wheeler,1995). Estos antecedentes, basados en la comparación de secuencias de genes muy conservados en la escala filogenética (entre otros, genes mitocondriales como el citocromo b) sugieren que ha existido un activo proceso de hibridización interespecífico. Más aún, se sugiere que es muy probable que el tradicional modelo de evolución, en que se suponía al guanaco como el ancestro de la llama y de la alpaca (Herre, 1952; Houston, 1982) esté equivocado, ya que se encuentra un mayor grado de similitud entre alpaca y vicuña (equivalente a lo sugerido por Wheeler 1991 y Steinbacher1953, basados en la morfología de huesos y dientes, y en estudios conductuales, respectivamente), así como entre guanaco y llama.

Existen varios métodos de extracción del ADN genómico, como el método de fenol cloroformo, cloruro de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), etc. Para diversas muestras extraídas del animal como la sangre, la saliva, el pelo, las heces y los músculos. El cual el método de fenol -cloroformo ha sido y es el método más usado para obtener ADN genómico, pero este método es lento y laborioso, por el cual necesitamos establecer un método de extracción de ADN genómico que sea una alternativa simple, fácil, rápida y no contaminante que permita obtener ADN genómico de buena calidad y en cantidades suficientes.

Una vez obtenido ADN genómico de alta calidad, se puede estudiar a los genes asociados a la fibra, enfermedades infecciosas, enfermedades parasitarias y consanguinidad de los camélidos sudamericanos silvestres, dentro de la región para prevenir altos índices de consanguinidad, altas tasas de mortalidad de los camélidos, y aportar en el mejoramiento genético.

El uso del PCR (Polimeraze Chain Reaction), permiten al análisis del potencial genético en animales, de una comunidad o una población sea determinada con mayor precisión, antes de la expresión de su fenotipo. De este modo se puede estimar la diversidad genética necesaria, inclusive para aquellas especies en riesgo de extinción (Lopera-Barrero, 2008). Sin embargo, la viabilidad de estos estudios es frecuentemente limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, desde pequeñas muestras que pueden ser de músculos, sangre, semen, uñas, saliva, etc. (Etienne Jacqueline, 2001; Dolores- Ramos, 2008; Echegaray et al. 2005).

Por lo tanto este trabajo tiene como objetivo aplicar técnicas moleculares a fin de estudiar la variabilidad genética de las vicuñas criadas en semicautiverio en el Centro de Investigación y Producción de Camélidos Sudamericanos Lachocc - Huancavelica.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Objeto de estudio

Debido a que existe una escasez de estudios en caracterización y mejoramiento de especies en camélidos sudamericanos silvestres como la Vicuña, con una cantidad adecuada del ADN, se puede hacer una amplificación de segmentos-PCR, y la multiplicación de este material genético para sus posibles usos en el futuro. Y con más trabajos relacionados al tema y la extracción de ADN, el Perú podría ser el primer país que tendría el banco de genoma y cromosómico de camélidos sudamericanos en el mundo.

También la adecuada extracción de material genético de ADN, podría permitirnos determinar la variabilidad genética y optar por un mejor Sistema de crianza sin riesgos de perder el valor de la especie.

El uso del PCR (Polimeraze Chain Reaction), permite el análisis del potencial genético en animales, de una comunidad o una población y se determine con mayor precisión, antes de la expresión de su fenotipo. De éste modo se puede estimar la diversidad genética necesaria, inclusive para aquellas especies en riesgo de extinción como la vicuña (Lopera-Barrero, 2008). Sin embargo, la viabilidad de estos estudios es frecuentemente limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, desde pequeñas muestras que pueden ser de músculos, sangre, semen, uñas, saliva, etc.

2.2 Métodos y técnicas

**a)** Recolección de las muestras:

La población.

La población objeto de estudio lo constituyeron 205 vicuñas en estado de semicautiverio de la población total, de los cuales a 28 vicuñas entre adultos y crías, entre hembras y machos se les tomó muestras para el presente trabajo de investigación, para lo cual se obtuvo el número de muestras de sangre, utilizándose el software G-POWER, para determinar el grado de confiabilidad de las muestras en relación a la población total.Para el cálculo del tamaño muestral se usó G-Power para lo cual se consideró 0,5 para el tamaño del efecto (grado de desviación de la h0) y un nivel de significancia de 0,05 y una potencia de 0,70 tal como se observa en la figura 1.

**Figura 1**. De cálculo del tamaño muestral usando G- Power.

Muestra.

Para la toma de muestras de las 28 vicuñas entre crías y adultos machos y hembras se procedió a escoger aleatoriamente, las muestras fueron tomadas por punción de la vena yugular, usando tubos vacutainer de 5 ml. conteniendo EDTA, debidamente rotulados (número de arete y fecha).

b) Extracción de ADN genómico:

Las muestras de sangre se sometieron a distintos procesos para llegar ha extraer ADN genómico, se utilizó el siguiente método: Método de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook et.al., 1989).

**c)** Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Una vez extraído el ADN genómico se verificó la cantidad de ADN**,** mediante espectrofotometría, para lo cual, se realizaron las medidas de Absorbancia a 260 nm. y 280 nm., en un espectrofotómetro UV, se calculó la relación A260/A280 la cual debe tener un valor que oscile entre 1,8 a 2,0; de ésta forma se garantiza una desproteinización aceptable de la muestra.

**d)** Calidad de ADN por electroforesis

La calidad de ADN fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa a 1% durante 1 hora con 30 min. a 75 voltios; pasado el tiempo el gel corrido se llevó al transluminador UV para observar las bandas de ADN.

1. Se peso 1 g de agarosa en un erlenmeyer para un gel de calidad luego añadir 90 ml de tampón T10E1, calentar hasta ebullición en el agitador magnético, removiendo el erlenmeyer durante el calentamiento para disolver bien la agarosa después se añadió 15 µl de Bromuro de Etidio y mezclar bien. Luego se echó sobre el molde y colocar el peine. Una vez solidificado, se sumergió el gel en buffer T10E1 en la cubeta de electroforesis, luego se quitó el peine para proceder al cargado de las muestras.
2. Para cargar las muestras se pipetearon gotas de 2 μl de muestra de ADN y 8 ul de tampón de carga sobre un trozo de parafilm, se mezcló bien y luego se pipetearon dentro del pocillo.
3. Se conectó la fuente de alimentación a 75 voltios teniendo en cuenta que el DNA migra hacia el polo positivo, pasado el tiempo se evidenció las bandas de ADN en el transiluminador.

**e) Amplificación de ADN por PCR**

Para cada muestra de ADN la mezcla de PCR estuvo compuesta por 2,5 μl de buffer 10X (Promega), 1,25 μl de MgCl2, 0,5 μl de cada dNTPs (Biogenica), 1 μl de Primer Forward, 1 μl de Primer Reverse, 14,75 μl de Agua y 0,5 μl de ADN polimerasa. Una vez hecha la mezcla se tomaron 23 μl del tubo para depositarlos dentro un tubo de PCR, más 2 μl de ADN extraído de las muestras de vicuña, para tener un volumen final de 25 μl.

Las reacciones se colocaron en el termociclador, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94ºC por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 92ºC por 20 segundos, hibridación a 45ºC por 20 segundos y extensión 72ºC por 10 segundos, con una extensión final a 72ºC por 4 minutos. Las amplificaciones de los genes se verificarán en geles de agarosa al 1% por medio de electroforesis durante 45 minutos a 75 voltios.

1. Resultados y discusión

3.1 Cantidad de ADN

**Tabla 1.** Promedio y desviación estándar para el método de fenol-cloroformo en la extracción de ADN genómico.

| **MÉTODO DEL FENOL-CLOROFORMO** | **VALORES** |
| --- | --- |
| Media | 1,58 |
| Mediana | 1,63 |
| Moda | 2,00 |
| Desviación estándar | 0,35 |
| Varianza de la muestra | 0,12 |
| Rango | 1,75 |
| Mínimo | 1,00 |
| Máximo | 2,00 |
| Cuenta | 28,00 |
| Nivel de confianza (95.0%) | 0,14 |

Los resultados para la extracción del ADN genómico con el método del Fenol- Cloroformo que se muestra en la tabla 1 fueron: para la media realizada entre todas las pruebas para la extracción del ADN genómico es de 1,58 de absorbancia en el espectrofotómetro obtenido al dividir A260 nm / A280 nm, la moda es de 2 al repetirse muestras con igual resultados en la absorbancia, y una desviación estándar de +/- 0,35 con respecto a la media. Al igual que encontramos una absorbancia mínima de 1,00 y un máximo de 2,00, entre el rango de calidad del ADN de 1,8 a 2,0 libre de proteínas y RNAsa, trabajadas con 28 muestras a un nivel de confianza de 95%.

El desarrollo de las técnicas moleculares ha llevado a la necesidad de crear métodos de extracción de ADN genómico más simples y eficientes, sin embargo, variaciones en la eficiencia de la lisis, afectan en el rendimiento y la pureza del ADN genómico, por lo que en el presente trabajo de investigación se logró obtener una buena calidad y cantidad de ADN genómico con el método del fenol cloroformo con un promedio de 1,8 de absorbancia ubicada dentro del rango de pureza del ADN, lo que no coincide con Lopera- Barrero, 2008, quien obtuvo buenos resultados con el método del Cloruro de Sodio en comparación con el método del Fenol- Cloroformo para la obtención del ADN genómico; y esto se puede deber a la muestra y a los protocolos ejecutados en cada laboratorio por lo que se seleccionó este método de fenol cloroformo, para el análisis de microsatélites por ser un método rápido y económico.

**Tabla 2.** Estadística Descriptiva de tres métodos de extracción de ADN.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **DATOS ESTADÍSTICOS** | **MÉTODO FENOL-CLOROFORMO** | **MÉTODO CLORURO DE SODIO** | **MÉTODO ACETATO DE AMONIO** |
| Media | 1,8 | 1,61 | 1,16 |
| Desviación estándar | 0,35 | 0,12 | 0,08 |
| Varianza de la muestra | 0,12 | 0,01 | 0,007 |
| Nivel de confianza (95,0%) | 0,14 | 0,07 | 0,04 |

En la tabla 2 se muestra que el método de fenol cloroformo tiene una media de 1,8 la cual significa el grado de pureza obtenido al extraer ADN genómico el cual es mejor con respecto al método cloruro de sodio la cual es de 1,61 y para el método Acetato de Amonio la media es de 1,16.

En este trabajo de investigación con el método del Fenol-Cloroformo se obtuvo un promedio adecuado de la calidad del ADN genómico, siendo la absorbancia promedio de 1,8 de espectrofotometría, por lo que debemos tener en cuenta la propuesta de (Sambrook et.al., 1989) quien señala que el método de Fenol- Cloroformo usando con un kit comercial se puede obtener ADN genómico de buena calidad capaz de ser utilizado en pruebas moleculares o usar in kit para extracción de AND en un equipo automático que garantiza un ADN genómico de calidad.

**Tabla 3.** Comparación del tiempo de procesamiento, material de partida, concentración, y pureza entre las muestras de ADN extraídas por los 3 métodos.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **MÉTODO DE EXTRACCIÓN** | **MATERIAL DE****PARTIDA (UL)** | **CONCENTRACIÓN****DE ADN (UG/UL)** | **PUREZA** |
| Método de Fenol-Cloroformo | 500 | 0,095 | 1,80 |
| Método de Cloruro de Sodio | 500 | 0,111 | 1,62 |
| Método de Acetato de Amonio | 500 | 0,109 | 1,16 |

En la comparación de los tres métodos de extracción del ADN genómico mostradas en la tabla 3, se puede observar que tenemos un mejor promedio a nivel de absorbancia con el método del fenol cloroformo, en comparación con el método del cloruro de sodio y el método de acetato de amonio, debido a los métodos y al tejido de muestra trabajado (sangre), pues que ambos métodos como del cloruro y del acetato de amonio se pueden extraer buena cantidad de ADN genómico pero de muestras de músculos.

3.2 Calidad de ADN

En la figura 2 se puede observar la presencia de bandas de ADN la cual significa que por el método de fenol cloroformo se obtiene ADN libre de impurezas.

En la figura 3 se puede observar la presencia de bandas de ADN degradado la cual significa que por el método de cloruro de sodio se obtiene ADN pero con impurezas.

**Figura 2**: Gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad de ADN extraído por el

Figura 3: Gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad de ADN extraído por el método cloruro de sodio.

3.3 Amplificación por PCR

**Tabla 4.** Frecuencias alélicas de 12 microsatélites en vicuñas del Centro de Investigación y producción de camélidos sudamericanos Lachocc – Huancavelica.

| **LOCUS** | **TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR** | **ALELOS** | **FRECUENCIA** | **SECUENCIA DE PRIMERS (5′-3′)** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| LCA 37 | 212 | 7 | 2,2599 % | 5`AAA CCT AAT TAC CTC CCC CA 3` 5` CCA TGT AGT TGC AGG ACA CG 3` |
| LCA 19 | 137 | 6 | 1,5676 % | 5` TAA GTC CAG CCC CAC ACT CA 3` 5` GGT GAA GGG GCT TGA TCT TC 3` |
| LCA 5 | 135 | 16 | 10,3424 % | 5`GTG GTT TTT GCC CAA GCT C 3` 5`ACC TCC AGT CTG GGG ATT TC 3` |
| LCA 22 | 194 | 10 | 2,0370 % | 5`TTA AGA GTC TAA AAG AGA AAG GCG 3` 5`CAG ATG ACA GCT GGG ATT GA 3` |
| LCA 90 | 223 | 3 | 0,4528 % | 5`TAT AAC CCT GGT CTC GCC AA 3` 5`CCA AGT AGT ATT CCA TTA TGC G 3` |
| YWLL 29 | 128 | 5 | 9,4175 % | 5` GAA GGC AGG AGA AAA GGT AG 3` 5` CAG AGG CTT AAT AAC TTG CAG 3` |
| YWLL 40 | 94 | 6 | 2,8038 % | 5` CAC ATG ACC ATG TCC CCT TAT 3` 5`CCA GTG ACA GTG TGA CTA AGA 3` |
| YWLL 43 | 126 | 14 | 1,4226 % | 5` ATA CCT CTC TTG CTC TCT CTC 3` 5` CCT CTA CAA CCA TGT TAG CCA 3` |
| VOLP 4 | 187 | 12 | 6,1326 % | 5`GCA TTT CTC CGT AAT CAT TG 3` 5`TGA CAC CTT TTG TTT CCA TT 3` |
| VOLP 72 | 272 | 5 | 3,4880 % | 5`ACC AGG AAA CCC AAC TAC TCT T 3` 5`GTC AAG GGG CAG GAT GT 3` |
| VOLP 92 | 171 | 24 | 8,0130 % | 5`AGT TAT CTT ACT TCC AAT TAA AAT 3` 5`AAC ATA GAA ACA GCA TTG AG 3` |
| VOLP77 | 183 | 2 | 4.2049 % | 5`TAT TTG GTG GTG ACA TT 3` 5`CAT CAC TGT ACA TAT GAA GG 3` |

En la tabla 4 se ilustra la alta variabilidad genética que presenta esta población de vicuñas criadas en semicautiverio, mostrándose el análisis de un grupo de vicuñas con el marcador VOLP-92. Además, se muestra una serie de casos en que las crías no coinciden con los supuestos progenitores, usualmente el macho, pues alguno de los alelos no es compartido entre ambos.

Como queda demostrado en la tabla 4 que para la mayoría de microsatelites usados en la investigación, la frecuencia es alta en las vicuñas en estudio y como los miembros de esta población se cruzan entre si, comparten un grupo de genes llamado reservorio génico,y tratándose de una población pequeña y en semicautiverio debemos tener en cuenta los datos de ADN*mt* y microsatelites de (Lade *et al.*, 1996; Frankham, 1997), en donde indican que la diversidad genética fue más grande en el continente, confirmando la tendencia general que las poblaciones continentales de mamíferos exhiben más variación genética que las poblaciones isleñas.

A nivel de la población de vicuñas en estudio el LCA 5, YWLL 29 y VOLP 92 son los que presentan mayor frecuencia de repeticiones de alelos esto indica que son los que presentan mayor variabilidad genética y se debe a que las vicuñas son altamente polígamos (Franklin, 1982) y el sistema social de la vicuña parece ser mucho más rígido que el del guanaco, de este modo la variación genética en el nivel poblacional en esta especie, puede ser ampliamente diferente, por esto justificamos estrategias de manejo radicalmente distintas.

Estudios previos sobre la dinámica poblacional de la vicuña indican que es denso-dependiente (Kock, 1994; Sánchez, 1984; Bowles, 1994) y que en estado silvestre tiene una alta tasa de preñez y tasas de crecimiento que van desde el 16% hasta el 23% (Cattan y Glade, 1989; Sanchez 1984). Estudios a largo plazo de herbívoros indican que muchas especies también muestran el patrón de ser densidad dependientes (Houston, 1982; Clutton- Brock *et al*., 1985; Skogland, 1985). Bajo este patrón, poblaciones que se encuentran en bajas densidades, como en el Centro de Investigación y producción de Camélidos Sudamericanos Lachocc- Huancavelica la población se estabiliza y la tasa de crecimiento baja cuando la población llega a su capacidad de carga. Bajo esta teoría, aumentar la densidad artificialmente utilizando corrales debería de bajar la tasa de crecimiento de la población. Esto puede tener repercusiones demográficas negativas en la población, ya que una población pequeña está expuesta a procesos estocásticos (Caughley y Sinclair, 1996) lo que incrementa la probabilidad de su extinción. Bosch y Svendsen, 1987 presenta un modelo donde demuestra que una cosecha de animales a bajas densidades puede ser perjudicial, aunque superficialmente puede parecer que sea sostenible. Este es un tema que falta investigar para la vicuña. Lo que sí es probable es que al tener animales en corrales y tener que vigilarlos, los comuneros tendrán menos tiempo para vigilar las poblaciones silvestres.

De los estudios basados en marcadores de microsatélites presentados en este trabajo, éstos son los marcadores que presentan la mayor dificultad para su desarrollo, pero que a la vez entregan los mejores resultados al aplicarlos para identificación genética de individuos, estudios poblacionales o mapeo genético. Sin embargo, dado que una vez que se cuenta con buenos partidores de PCR para su estudio estos marcadores son de alta reproducibilidad y heterocigocidad, hay varios grupos en el mundo trabajando en su desarrollo, entre los que se comparte información en forma muy activa. Además, se está organizando algo similar a lo que se ha dado en una serie de especies vegetales: un Consorcio Internacional dedicado específicamente al desarrollo de microsatélites de CSA. Posteriormente, cada miembro de este grupo usaría la información para cualquier propósito: Filiación genética (identificación de progenitores y crías), estudios ecológico-poblacionales, mapeo genómico, etc. Para la identificación de las secuencias de microsatélites (y el diseño de partidores de PCR que se usan para su análisis) primero se debe preparar una genoteca de los animales, es decir aislar fragmentos de su genoma que sean lo mas representativo posible, luego se debe identificar clones que tengan estas secuencias repetidas (hibridación con sondas específicas). Finalmente, de entre los clones que tienen secuencias repetidas se seleccionan aquellos que tienen el mayor número de alelos, determinado en grupos de animales de cada especie.

1. CONCLUSIONES

La población de vicuñas criadas en semicautiverio en el Centro de Investigación y Producción de Camélidos Sudamericanos Lachocc- Huancavelica muestra una alta variabilidad con los Primers LCA5, YWLL29, VOLP92 y VOLP4.

Para la aplicación de la técnica de PCR es necesario la pureza del ADN extraído y esto se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se obtuvo ADN libre de contaminación con ARN, no degradado, correspondiéndose la intensidad de la banda de ADN con la concentración de las muestras medidas por espectrofotometría.

La extracción del ADN genómico a partir de muestras de sangre con el protocolo de fenol-cloroformo, definieron igualmente que el uso de una baja concentración de ARNsa puede provocar la obtención de ADN de baja calidad. Por tanto, es indispensable el uso de ARNsa en protocolos de extracción de muestras en tejidos.

La temperatura de 56ºC utilizada durante la digestión de las muestras no afectó la calidad y cantidad de ADN extraído en el protocolo usado en este estudio (fenol-cloroformo).

Todos los pasos del protocolo descrito anteriormente depende directamente del tejido colectado, que en este caso fueron suficientes para una eficiente obtención del ADN genómico.

En este estudio, la sangre de vicuña representó una fuente de ADN genómico, tan conveniente como la de otros tipos de tejidos (músculo, hígado, saliva, bulbo pilosos y heces) presentando alta cantidad y calidad total de ADN genómico aislado.

Las muestras aisladas de ADN genómico de buena calidad (relación DNA/RNA 1,8-2,0) es apto para ser usado con éxito en la amplificación de los marcadores moleculares como microsatélites.

Para los estudios a nivel poblacional, es necesario considerar el tamaño efectivo de la población, es decir el número de animales que actualmente se están reproduciendo y por ende “están pasando sus genes a las generaciones futuras”.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Huancavelica, en especial al equipo de trabajo del laboratorio de Biología Molecular.

A la Universidad Pública de Navarra de Pamplona España por su orientación y capacitación con sus docentes en las diferentes técnicas de extracción de ADN y pruebas de PCR a través del proyecto de fortalecimiento de capacidades.

Al Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos Lachocc - Huancavelica, por permitirnos recolectar muestras de sangre de vicuñas en el evento que se realiza cada año nominado como “Chaccu”.

REFERENCIAS BibliogrÁFICAS

Barrat, E.; Gurnell, J.; Malarky, G.; Deaville, R.; Bruford, M. 1998. Genetic structure of fragmented populations of red squirrel (*sciurus vulgaris*) in Britain. M*ol. Ecol*. 12:55–65.

Bosch, P.; Svendsen, G. 1987. Behaviour of male and female vicuña and its relation to reproductive effort. J. Mammal, 68 (2), 425-429.

Bowles, D. 1994. Wildlife trade: a conserver or exploiter? Chapman & Hall. Londres.

Cattan, P.; Glade, A. 1989. Management of the Vicugna vicugna in Chile: Use of a matrix model to assess harvest rates. Biological Conservation 49: 131-140.

Caughley, G.; Sinclair, A. 1996. Wildlife Ecology and Management**.** Blackwell Science, Cambridge, USA.

Clutton-Brock, T.; Major, M.; Guinness, F. 1985. Population regulation in male and female red deer**.** Journal of Animal Ecology. 54:831-846.

Conopa. 2006. Informe Técnico Final Subproyecto: "Identificación y Rescate de Alpacas Genéticamente Puras de la Amenaza de Extinción”. Lima. 16-24.

Dolores-Ramos, E. 2008. Estandarización de una técnica de extracción de ADN en sementales porcinos para evaluar la Frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP. Cienc. Inv. RCCV. 2(1): 39-50.

Echegaray, J.; Illana, A.; Hernando, A.; Martinez De Lecea, F.; Bayona, J.; De La Torre, J.; Paniagua, D.; Vilá, C. 2005. El Lobo en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Uso del ADN fecal para el seguimiento de sus poblaciones**.** Dirección de Biodiversidad del Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente del Gobierno Vasco.

Etienne, J. 2001. Bioquímica Genética, Biología Molecular. 3ra Edición, Editorial Masson, S.A.

Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? Heredity 78:211-327.

Franklin, W. 1982. Biology, ecology and relationship to man of the South American camelids. Laboratory and University of Pittsburg. 6: 457-489.

Franklin, W. L.; Bas, F.; Bonacic, C.; Cunazza C. 1997. Striving to manage Patagonia guanacos for sustained use in the grazing agroecosystems of southern Chile. Wildl. Soc. Bull. 25:65-73.

Herre, W. 1953. Studien über die wilden und domestizierten Tylopeden Südamerikas. Zoologische Garten N. F. 19:70-98

Houston, D. B. 1982. The Northern yellowstone Elk: Ecology and Management. Macmillan, New York.

Kock, M. 1994. A model for the sustainable use of wildlife and the development of innovative wildlife management prectices. Chapman & Hall. Londres.

Lade, J.; Murray, N.; Marks, C.; Robinson, N. 1996. Microsatellite differentiation between Philip Island and mainland Australian populations of the red fox Vulpes vulpes. Mol. Ecol. 5:81-87.

Lopera-Barrero, N. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Cienc. Inv. Agr. Vol. 35: 77-86.

Müntzing, A. 1959. Darwin's view on variation under domestication in the light of the present-day knowledge. *P. Am. Philos. Soc.* 103:190–220.

O´Ryan, C.; Harley, E.; Bruford, M.; Beaumont, M.; Wayne, R.; Cherry, M. 1998. Microsatellite analysis of genetic diversity in fragmented South African buffalo populations. *Anim. Conserv*. 1:124–131.

Price, E. 1984. Behavioural aspects of animal domestication. *Q. Rev. Biol.* 59(1):1–32.

Sambrook, I.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloaning: a Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor.

Sanchez, E. 1984. Sobre-población y Necesidad de Extracción de Vicuñas en Pampa Galeras. La vicuña. Lima. Editorial Los Pinos.

Skogland, T. 1985. The Effects of Density-Dependent Resource Limitations on the Demography of Wild Reindeer. Journal of Animal Ecology. 54:359-374.

Stanley, H.; Kadwell, M.; Wheeler, J. 1994. Molecular Evolution of the Family Camelidae: a Mitochondrial DNA Study**.** Proc. R. Soc. Lond. B 256:1-6.

Steinbacher, G. 1953. Zur Abstammung des Alpakka, Lamma Pacos. Säugetierk. Mitteil. 1:78-79.

Tapper, S.; Reynolds, J. 1994. The Wild fur Trade: Historical and Ecological Perrspective. Vol 1: 28-44.

Vilá, B. L.; Cassini, M. 1994. Time Allocation During the Reproductive Season in Vicuñas. Ethology, 97: 226-235.

Wheeler, J. 1995. Evolution and Present Situation of the South-American Camelidae. Biological Journal of the Linnean Society 54(3): 271-295.

Wheeler, J. 1991. Origen, evolución y status actual. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sud-Americanos. Santiago, FAO.