



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES
DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) DE LAS COMUNIDADES ALTO
ANDINAS Y APLICACIÓN AL PROGRAMA DE MEJORA DE LA
CALIDAD DE LA FIBRA

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba por Para optar al grado de Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias.

Marcia Marisol Paredes Peralta

Dirigido por:

Dr. Andrés Muñoz Serrano

Dr. Alberto Membrillo del Pozo

Dr. Pedro Javier Azor Ortiz

Córdoba, Octubre de 2012

TITULO: *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE ALPACAS (Vicugna pacos) DE LAS COMUNIDADES ALTO ANDINAS Y APLICACIÓN AL PROGRAMA DE MEJORA DE LA CALIDAD DE LA FIBRA*

AUTOR: *MARCIA MARISOL PAREDES PERALTA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS:

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE POBLACIONES DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) DE LAS COMUNIDADES ALTO ANDINAS Y APLICACIÓN AL PROGRAMA DE MEJORA DE LA CALIDAD DE LA FIBRA

DOCTORANDO/A: MARCIA MARISOL PAREDES PERALTA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

La Tesis Doctoral realizada y presentada por Dña. Marcia Marisol Paredes Peralta en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba aborda el estudio de variabilidad genética de poblaciones de alpacas que siguen métodos de crianza tradicional en las regiones alto andina utilizando marcadores de ADN de tipo microsatélite. Se han detectado asociaciones alélicas con caracteres de interés como el diámetro de la fibra lo que supone un gran avance en las investigaciones sobre un carácter productivo con gran repercusión en el sector de los camélidos sudamericanos. Derivados de la presente Tesis Doctoral se han publicado los siguientes trabajos en revistas de impacto científico JCR: *Genetic Parameters and Fixed Effects Estimation for Fibre Traits in Alpaca Huacaya (Lama pacos)*. *J. Animal. Vet. Adv.* 10, 1484-1487. *Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (Vicugna pacos) from Peru*. *Small Rumin. Res.* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.09.017>. *Genetic diversity and association of microsatellite markers with traits affecting fiber diameter in Peruvian alpacas (Vicugna pacos)*. *Sometido*.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral, en Córdoba a 30 de octubre de dos mil doce

Firma del/de los director/es

Fdo.: Andrés Muñoz Serrano

Fdo.: Alberto Membrillo del Pozo

Fdo.: Pedro Javier Azor Ortiz

A mis padres:

Por el gran amor que siempre me demostraron. Sus enseñanzas vitales, la entrega incondicional, el incansable trabajo, y sus ganas de ser felices...: son el motor que pone en marcha la consecución de mis metas y me anima a no desfallecer y seguir adelante.

Quiero dedicarles este trabajo porque es mérito de ustedes

A mi hermana Carmen y mi querido Cristian, ese par de loquillos, a los que tanto añoro.

*Familia son mi energía de cada día,
y mis metas logradas son también las suyas.*

*A la memoria de mi abuelita Octavia "Octita" estos logros también son tuyos
Siempre recordaré tu gran fortaleza y el corazón noble y alegre que demostraste
tener. Y en estos momentos tampoco puedo olvidar
a mis abuelos: Rosalía, Suplicio, Manuel y Tío Solanito*

*A la memoria de mi Director de Tesis: Dr. Andrés Muñoz Serrano.
Me faltan palabras para expresar todo mi agradecimiento y cariño.
Me llevo tus enseñanzas, tus muestras de cariño y tu inestimable apoyo para hacer
llevaderos y gratos estos años de estudio lejos de mi familia. De entre muchas cosas,
siempre recordaré nuestras charlas sobre las noticias llegadas de Perú,
acontecimientos cordobeses y aquellos intermedios del Té...
Me dejas muchos recuerdos y aprendizajes...*

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis Dr. Andrés Muñoz Serrano, por haberme dado la oportunidad de hacer esta Tesis doctoral, por el entusiasmo puesto y su confianza. Así mismo quiero agradecer a la Dra. Ángeles Alonso Moraga, a ambos, por forjarme en el camino de la investigación y hacer cortas las largas horas de trabajo y ante todo, por su cariño y cercanía, que han hecho posible en este tiempo de Tesis, que mi centro de trabajo sea mi segundo hogar.

A mi Codirector, Dr. Pedro Azor Ortiz, por su dedicación y disponibilidad para el mejor desarrollo de la presente Tesis, siempre con gestos de ánimo y amistad.

A mi Codirector, Dr. Alberto Membrillo del Pozo, mi inmensa gratitud por ser mi "Sensei", por enseñarme todo lo que sé en marcadores Microsatélites y estar siempre en cada momento apoyándome. Esto, junto a su amistad y buen humor, han hecho posible la presente Tesis doctoral.

Al Dr. Antonio Molina Alcalá por su infatigable apoyo para culminar la presente Tesis doctoral.

Al Dr. Francisco Peña del Dpto. Producción Animal de la Universidad de Córdoba.

Especial agradecimiento a los productores de alpacas de los departamentos de Arequipa y Puno que han participado en la presente Tesis.

Al Fundo Experimental Pacamarca S.A. de IncaTops, Arequipa por las facilidades brindadas.

Al Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo DESCOSUR-Perú, a través del proyecto: Contrato de Administración Parcial de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca, por su apoyo logístico en las comunidades de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca RNSAB - Arequipa, Perú.

A la Excm. Diputación de Córdoba por su valioso apoyo al presente trabajo.

Al Vicerrectorado de Internacionalización y Cooperación de la Universidad de Córdoba, por la concesión de los proyectos de Cooperación al Desarrollo.

También agradecer la importantísima ayuda del grupo de investigación MERAGEM AGR 158, a Mercedes, Nacho, Rocío, Marina, Sara, Gabriel, Jorge, Carmela, Maricarmen, Ester y a Cristóbal por su siempre valiosa disponibilidad para la óptima presentación del presente trabajo; la amistad de todos y sus constantes ánimos han sido fundamentales.

A mis amigos del Departamento de Genética Jaouad, Myriam, Mada, Zahira y Olga con quienes he compartido las jornadas de trabajo haciendo gratos esos momentos.

A toda la Institución Teresiana, donde he tenido la oportunidad de hacer grandes amistades, como las de Ocio, con su grata compañía en momentos especiales.

Mi agradecimiento lleno de cariño al equipo de dirección del Colegio Mayor Poveda: a Carmen Azaustre, Olga, Pilar Benítez, Manolita, M^a Ángeles, M^a Dolores, Paca, Chon, Pilar Ruíz, Esperanza y Ana. A todas gracias por haberme brindado su cariño y por confiar en mí para formar parte de este valioso equipo de dirección, recordare todos los momentos compartidos y por supuesto añorare las infaltables e interminables reuniones de equipo. Mi gratitud a todas porque han formado parte de esta Tesis doctoral.

No puedo dejar de manifestar el inmenso afecto que siento también por el personal del Colegio Mayor Poveda: Angustias (Que en Paz Descansa), Marina, Isa, M^a José, Mari, Rafa, Antonia, Araceli y Pili gracias por los mimos y estar pendientes de mi. Gracias a todas/o, por los valiosos momentos vividos que han sido importantes para el desarrollo de esta Tesis.

Mención especial a mi querida amiga Isa, por acompañarme en mis alegrías, tristezas y arrebatos en nuestro “sofá” desde aquí quiero decirle que siempre tendrá en mí a una hermana. Y por supuesto, no podría olvidar a mi querida Maribel por sus infinitas muestras de cariño y porque las tres somos “una para todas y todas para una”. Ustedes han formado parte también de esta Tesis doctoral.

Profundo agradecimiento a la Artista Isabel Serrano Castro por la dedicación puesta en la realización del retrato para la contraportada de esta Tesis.

A Rafael Bueno Rupérez por su amistad y valioso aporte a la presente Tesis.

A mis padres, por su aliento y en especial por hacer de los días en casa antes de partir a mi querida Córdoba, momentos alegres en lugar de tristes. A mi querido Cristian, siempre alegre y divertido conmigo y escuchándome cuando lo necesitaba y no parar hasta levantarme el ánimo, aunque eso le suponga terminar las tareas tarde (al final yo terminaba con remordimientos), pero siempre me decía: “No te preocupes Mama Marisol hablando contigo me relaja antes de hacer la tarea”. A mi hermana Carmen por su infinito amor y plena disponibilidad para ayudarme en todo. Gracias

familia por estar conmigo y apoyarme; y recordad que una vez más lo hemos hecho juntos.

A los aquí presentes y a todos aquellos amigos que nunca me fallaron, pero no están en estas líneas, les tengo presentes en mi corazón. A todos ustedes, gracias por haber sido mi familia, por darme su cariño, porque nunca me sentí sola estando en mi querida Córdoba, que es lo que me ha permitido disfrutar del desarrollo de esta Tesis doctoral. Muchas gracias por este tiempo.

Nota: Los capítulos que conforman el presente documento son artículos que han sido enviados y publicados en diferentes revistas de investigación. Los artículos se han editado en el presente documento a fin establecer una mayor claridad del contenido de la misma. Las referencias de cada artículo han sido compiladas al final del documento.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1. Los camélidos sudamericanos	6
1.2. Parámetros genéticos	15
1.3. Variabilidad genética y fenotípica de las poblaciones de alpacas	16
1.4. Marcadores Moleculares	21
1.5. Relación de Marcadores Moleculares Microsatélites y caracteres cuantitativos	29
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	30
CAPÍTULO I	
Estudio de parámetros genéticos y efectos fijos en una población de alpacas Huacaya (<i>Lama pacos</i>)	36
CAPÍTULO II	
Variación genética y fenotípica en cinco poblaciones de alpacas Huacaya (<i>Vicugna pacos</i>) del Perú	48
CAPÍTULO III	
Diversidad genética y asociación de marcadores microsatélites con el caracter del diámetro de la fibra en alpacas Peruanas (<i>Vicugna pacos</i>)	80
DISCUSIONES GENERAL	112
CONCLUSIONES GENERALES	122
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism.	MgCl ₂	Cloruro magnésico
AMOVA	Analysis of Molecular Variance.	min	minutes
ANOVA	Analysis of Variance.	mM	miliMolar
bp	Pares de bases.	ng	nanogramos
CSD	Camélidos Sudamericanos Domésticos.	NJ	Algoritmo neighbour-joining.
CV	Coefficiente de Variación	Nm	Numero efectivo de migrantes
CAP	Correct assignment percentage	Nm	Numero efectivo de migrantes
CF	Factor confort	NTP	Norma Técnica del Perú
dNTP	desoxinucléotido	P	Nivel de significancia
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.	PCR	Polymerase Chain Reaction.
FD	Diámetro de la fibra.	PIC	Contenido de Información Polimórfica.
F _{IS}	Defecto o exceso de heterocigotos promedio en cada población.	QTL	Quantit
F _{IT}	Defecto o exceso de heterocigotos promedio en las poblaciones	ative Trait Loci.	
F _{ST}	Coefficiente de diferenciación genética.	RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA.
GLS	General Local Statistic.	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism.
GLM	Generalized linear model	RNSAB	Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca.
H _E	Heterocigosidad Esperada.	s	segundos
H _O	Heterocigosidad Observada.	SD	Desviación Estándar.
HW	Equilibrio Hardy-Weinberg.	SSR	Simple Sequence Repeat
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agraria. Perú.	STR	Short Tandem Repeat.
IPAC	Instituto Peruano de la Alpaca y Camélidos	Taq	ADN polimerasa
ISAG	International Society of Animal Genetics.	UNIDO	Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial.
LD	Desequilibrio de ligamiento	UNIDO	United Nations Industrial Development Organization.
M.S.N.M.	Metros Sobre el Nivel del Mar.	UPGMA	Unweighted Pair-Group Method Arithmetic.
MFD	Medida del Diámetro de la Fibra.	µm	Micras

RESUMEN

El presente trabajo, busca contribuir a los programas de mejora genética que se están emprendiendo en el sector de los Camélidos Sudamericanos para la mejora de la capacidad productiva de la alpaca, incidiendo sobre todo en la calidad de la fibra. Las poblaciones de Alpacas peruanas del presente trabajo proceden de ganaderías localizadas en las comunidades más representativas de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca (RNSAB) que son referentes de producción en la región Arequipa, así como también de ganaderías de la región Puno; otras poblaciones de alpacas (animales con valoración de datos genéticos) proceden de la empresa privada Fundo Experimental Pacamarca de Incatops S.A. Para llevar a cabo la finalidad del estudio se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Estimar los parámetros genéticos en una población de Alpacas de la raza Huacaya, para conocer los valores de la heredabilidad, las correlaciones genéticas y los efectos fijos de las características productivas del vellón.
2. Diagnosticar la variabilidad genética y fenotípica de cinco poblaciones de alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*) del Perú, mediante el uso de Marcadores Microsatélites y medidas del diámetro de la fibra.
3. Estimar la diversidad genética en poblaciones de alpacas de las razas Huacaya y Suri y la asociación de 69 marcadores microsatélites con un gen mayor que afecta a la característica del diámetro de la fibra de alpaca.

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se emprendió un estudio preliminar en poblaciones de alpacas de crianza tradicional, en el que se han estimado los parámetros genéticos, las correlaciones entre caracteres del vellón y los efectos fijos. Los resultados señalan altos valores de heredabilidades para los caracteres del diámetro de la fibra y peso de vellón. Por otro lado, la

correlación entre los caracteres del peso del vellón y diámetro de fibra fue baja; en cuanto a los efectos fijos se han encontrado valores significativos de la edad con los caracteres del diámetro de la fibra, peso del vellón y longitud de la mecha, y del color de la capa con el diámetro de la fibra y peso del vellón.

Una vez conocido el potencial de mejora mediante los resultados obtenidos sobre los parámetros genéticos, correlaciones y efectos fijos, se planteó la realización del estudio de variabilidad molecular y asociaciones de *loci* al carácter cuantitativo diámetro de la fibra de alpaca. Los resultados nos muestran una alta variabilidad genética en las localidades de San Juan de Tarucani, Estación Pillones, Chalhuanca, Palca y Lampa, encontrando los más altos niveles de diversidad genética en las localidades de Lampa (0.712) y Chalhuanca (0.749), por otro lado se halló una variación genética del 79% dentro de poblaciones. Se han encontrado asociaciones espurias entre el carácter de diámetro de la fibra y tres *loci* microsatélite CVRL07, LGU68 y LCA65.

Con el objetivo de establecer las primeras bases para una saturación del genoma de la alpaca tendente a la búsqueda de mejores aproximaciones de *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTL), se realizó el estudio con poblaciones de alpacas de las razas Huacaya y Suri, previamente valoradas para un gen mayor que afecta a dos caracteres de calidad: el diámetro de la fibra y el factor confort. También se estimó la diversidad genética existente en estas dos poblaciones. El estudio ha mostrado niveles favorables de variabilidad genética para las razas de alpacas Huacaya y Suri. Se encontraron asociaciones significativas de los *loci* LCA68, VOLP59, LCA90 y GLM6 con valores genéticos favorables para el carácter cuantitativo del diámetro de la fibra de alpaca.

Los resultados hallados nos permiten concluir, que las poblaciones de alpacas peruanas del presente estudio son un importante recurso genético susceptible para emprender planes de mejora al poseer alta diversidad genética. Por otro lado las asociaciones alélicas de marcadores microsatélite con el diámetro de la fibra abren la posibilidad de emprender planes de mejora en las granjas élite de alpacas.

INTRODUCCIÓN



1.1. LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Los camélidos sudamericanos derivan de especies originadas en Norteamérica que fueron desapareciendo de esa región hace 11 millones de años. Antes de su desaparición, algunos camélidos ancestrales migraron hacia el Sur del continente para evolucionar hacia los actuales camélidos sudamericanos. Hoy día, habitan en Sudamérica cuatro especies de camélidos: dos silvestres (vicuña y guanaco) y dos domésticos (alpaca y llama) (Bonavia, 1996; Gentry *et al.*, 2004), reconociéndose para estos últimos un tiempo de domesticación de alrededor de 5.000 años (Wheeler, 1991; Reigadas, 2001).

Tradicionalmente la alpaca (*Lama pacos*, Linneaus, 1758), la llama (*Lama glama*, Linneaus, 1758), y el guanaco (*Lama guanicoe*, Müller, 1776), han sido especies clasificadas como cercanas al género *Lama*, mientras que la vicuña (*Vicugna vicugna*, Molina, 1782) fue encuadrada en un género separado *Vicugna*. Estudios más recientes usando ADN mitocondrial sugieren que la vicuña y el guanaco fueron los antecesores de la alpaca y la llama respectivamente, por lo que se ha propuesto una nueva clasificación taxonómica para la alpaca de *Vicugna pacos* (Kadwell *et al.*, 2001; Gentry *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2007).

Las dos especies de camélidos domésticos son importantes para el desarrollo rural. Los productos de la alpaca (fibra y carne) y la llama (carne) constituyen el principal medio de sustento económico de las familias alto andinas, siendo en su mayoría de escasos recursos económicos en los países andinos centrales de Sudamérica como Perú, Ecuador, Bolivia, Argentina y Chile (Quispe *et al.*, 2009), lugares donde principalmente se desarrollan estas ganaderías. Actualmente el aprovechamiento de las fibras producidas por los camélidos silvestres como el guanaco y la vicuña, también está tomando importancia (Bustínza, 2001).

1.1.1. La alpaca

La alpaca se distribuye geográficamente entre los paralelos 8 a 20 de latitud sur y los meridianos 68 a 80 de longitud oeste, y entre altitudes que van de 3.800 a 5.000 metros sobre el nivel del mar. Se encuentra poblando la cordillera de los andes de Sudamérica en la parte central y sur del Perú, noroeste de Bolivia y extremo norte de Chile (Bustínza, 2001), así como en el área Altiplánica de las provincias de Jujuy, Salta y Catamarca de Argentina (Frank, 1997)

La alpaca es el camélido productor de fibra más importante, tiene un peso ligero y es fuerte. (Wuliji *et al.*, 2000). Concretamente, en Perú la alpaca es considerada como Producto Bandera de la que se describen dos tipos de vellones en de esta zona provenientes de las dos razas fundamentales: Huacaya (figura 1) y Suri (figura 2). La alpaca Huacaya se caracteriza por tener un vellón compacto, esponjoso y con fibras finas, suaves y onduladas. La alpaca Suri presenta fibras de gran longitud organizadas en rizos colgantes (Hoffman y Fowler, 1995; Antonini *et al.*, 2004 y FAO, 2005).

Renieri *et al.* (2009) mencionan que tanto las razas de alpaca como de llama son razas “primitivas” o “primarias” que derivan de la primera diferenciación intra específica post-domesticatoria. Por su parte, Presciuttini *et al.* (2010) identifican a cada raza de alpaca (Huacaya y Suri) según el tipo de vellón. Según la FAO, (2012), la clasificación de raza puede ser menos relevante en algunas especies como en los camélidos, sin embargo la categoría de raza puede ser utilizada como una estructura general que abarque todos los tipos de poblaciones domésticas.



De los cuatro camélidos sudamericanos domésticos, la alpaca es la que cobra una mayor relevancia económica por el importante valor comercial que representa su fibra, además de la carne (llama) y piel. En Perú, la población total de alpacas de la raza Huacaya representa el 85% (blanco 95% y color 5%), y la raza Suri sólo un 15% cuyo efectivo poblacional está disminuyendo (Brenes *et al.*, 2001; INIA, 2006). Por otro lado, la carne de alpaca tiene demanda local (Pumayalla y Leyva, 1988), aunque es la fibra el producto de inigualable calidad textil. Sin embargo, poco se ha hecho para mejorar su calidad y cantidad, siendo la capacidad térmica de la fibra mundialmente conocida como superior a la lana de oveja, así como el brillo, longitud de la fibra, sobresaliente flexibilidad, suavidad y tenacidad, entre otras características.

Llamas y alpacas han visto incrementado su censo en otros países, incluyendo Norteamérica (USA y Canadá), Australia, Nueva Zelanda y en Europa (Reino Unido, Alemania, Italia y Francia), donde se mantienen comúnmente para la producción de fibra y como animales de compañía (Tibary, 2005).

1.1.2. Producción y comercialización de la fibra de alpaca

Condiciones socioeconómicas

El Perú cuenta con los mejores ejemplares de alpacas y vicuñas del mundo gracias a las particulares condiciones climáticas de las zonas alto andinas. Sumando el 90% de la población mundial de alpacas, lo que representa aproximadamente 4.900.000 individuos (tabla 1), siendo el primer productor mundial de fibra de alpaca (UNIDO, 2010).

Tabla 1. Población de Alpacas en El Perú

Departamentos	Nº de Alpacas
Puno	2,711.726
Cusco	584.824
Arequipa	395.883
Ayacucho	218.756
Otros	987.576
Total	4,898.765

Fuente: Ministerio de Agricultura-Elaboración IPAC

Los sistemas de crianza actuales siguen siendo tradicionales y de baja productividad, como consecuencia de la problemática de tenencia de tierras, marginación, limitaciones tecnológicas, mecanismos inadecuados de

comercialización de la fibra y carne y caracteres socioculturales, entre otros, que establecen tres sistemas básicos de producción:

1. Comunidades o parcialidades, que se ubican a nivel de comunidades campesinas, concentrando el mayor porcentaje de alpacas de la población total con una tasa de natalidad muy baja.
2. Pequeños y medianos productores, que poseen una tecnología de crianza mejorada.
3. Empresas asociativas, que corresponden a las antiguas haciendas alpaqueras de propiedad privada poseedoras de tecnología más moderna y buenas tasas de natalidad (FAO, 2005).

Tipo de productor	Participación en la producción de fibra	Rendimiento por alpaca
Pequeños Productores	85%	3,5 Libras/año
Medianos Productores	10%	5,0 Libras/año
Empresas Privadas	5%	5,0 Libras/año

Fuente: CONACS

Figura 3. Sistemas de crianza de alpacas

La crianza de alpacas para los pequeños productores constituye su actividad económica principal, estimándose que alrededor de 100.000 familias alto andinas están dedicadas directamente a esta actividad, con ingresos económicos muy bajos que las ubican en situación de pobreza (UNIDO, 2006 y 2010).

Aspectos comerciales

La industria textil se refiere a la fibra de alpaca como fibras especiales y las prendas textiles manufacturadas con estas fibras están clasificadas como artículos de lujo (Wang *et al.*, 2003). Dentro de las principales propiedades de la fibra de alpaca están la flexibilidad, suavidad al tacto, bajo afieltramiento e hipoalergénicas (Incalpaca TPX, 2012). La fibra de alpaca tiene una alta resistencia a la tracción, importante en el proceso industrial; logrando mantener la temperatura corporal por contener “bolsillos” microscópicos de aire en la medula, lo que permite que las prendas textiles puedan ser usadas en un amplio rango de climas (Xing *et al.*, 2004; Xungai *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2006).

La producción de fibra de alpaca se exhibe en 23 tonalidades diferentes clasificadas por la industria textil que van desde el blanco puro a tonalidades de cremas, marrones, plata, grises y negras (FAO, 2005; Oria *et al.*, 2009). Tradicionalmente la comercialización de la fibra en los camélidos sudamericanos fue determinada por el color (Villarroel, 1991). El precio de las fibras de color entre 1969 y 1981 fue alrededor del 65,9 % superior al precio de la fibra blanca (Velarde, 1988), pero posteriormente fue decayendo (Antonini y Vinella, 1997).

Perú es el principal proveedor de fibra de alpaca en el mundo, abasteciendo una demanda del 80%, lo que representa una producción de 6.500 toneladas de fibra, con ingresos que superan los 50 millones de dólares anuales. Bolivia aporta un 15%, y el 5% restante otros países. La fibra de alpaca se comercializa en el mercado internacional en presentación de tops e hilados, siendo los principales mercados demandantes China, Corea, Japón, Taiwán, Italia, Reino Unido, Alemania, Japón, entre otros (IPAC Instituto Peruano de Alpacas y Camélidos).

1.1.3 Caracteres cuantitativos de la fibra de alpaca

Desde un punto de vista genético, los caracteres de la producción de fibra pueden ser subdivididos en caracteres cuantitativos y caracteres cualitativos o mendelianos. Los objetivos de selección de la fibra de alpaca son para las características cuantitativas: peso del vellón, finura, porcentaje de la medulación de la fibra y rizo. Para las características mendelianas, los objetivos son el tipo de fibra (Suri vs Huacaya) y el color de la capa. (Renieri *et al.*, 2004).

Los caracteres que determinan la calidad de la fibra en los camélidos sudamericanos domésticos son el diámetro de la fibra, color, longitud de la fibra, y la uniformidad del diámetro y de la longitud. Otra característica que puede afectar el valor de la fibra en ambas razas de alpacas es el factor confort (porcentaje de fibras menores a 30 μ m) (Frank *et al.*, 2006). La sensación de picazón de la fibra aumenta a medida que disminuye el porcentaje de confort de la fibra de alpaca (Lupton *et al.*, 2006)

Diámetro de la fibra

La finura de la fibra se expresa en el diámetro (micras μ m), siendo éste el parámetro más importante para definir la calidad de la fibra en relación al confort y la ligereza de la prenda textil. El diámetro de la fibra representa el factor más importante en el precio de las balas producidas (Villarroel, 1991; Antonini y Vinella, 1997). La finura de la fibra depende del grado de selección genética, del medio ambiente, de la alimentación y la edad.

La Norma Técnica del Perú (2004) NTP 231.301 (fibra de alpaca clasificada), clasifica la fibra de alpaca para su comercialización de acuerdo a las siguientes calidades (tabla 2).

Tabla 2. Cuadro comparativo de la fibra de alpaca y otras fibras medulares

Categoría	Diámetro en micras (μm)	Factor Confort (%)	Aplicación	
			Punto	Plano
Alpaca baby	menor o igual a 23,00	90	xxxx	xxxx
Alpaca Suri	26,00	70		xxxx
Alpaca fleece	23,1 a 26,5	70	xxxx	xxxx
Alpaca medium fleece	26,6 a 29,0			
Alpaca huarizo	29,1 a 31,5	55		
Alpaca gruesa	mayor a 31,5	25		xxxx
Cashmere	16,00	98	xxxx	xxxx
Mohair Kid	25,00	80	xxxx	xxxx
Mohair Young	28-31	65	xxxx	xxxx
Mohair Adult	35-37	25		xxxx
Vicuña	12,00	95	xxxx	xxxx

Fuente: IPAC

Es altamente probable que la sensación de picazón de las prendas textiles de alpaca esté relacionada con la incidencia del diámetro de la fibra, es decir, fibras con unos diámetros mayores a 30 μm o alrededor de 32 μm (Swinburn *et al.*, 1995). Por su parte, Villarroel (1991), refiere que en el caso de la fibra de camélidos esto está relacionado con el tipo de vellón, si no que la sensación de la picazón es debida a la doble capa de los vellones la cual requiere la separación de las fibras primarias de esos vellones, lo que se denomina descender.

El diámetro de la fibra se ve afectado por diversos factores. Para Bustínza (2001) y Frank *et al.* (2006) estos factores son la edad, raza, color de la capa, año de producción, condición nutricional y estación. Según Wuliji *et al.*,

(2000), McGregor y Butler, (2004), Melo, (2007) y Catacora *et al.*, (2010) el sexo no tiene efecto en la finura. Existen referencias contradictorias sobre la influencia del color de la capa en el diámetro de la fibra: Según Ruiz De Castilla y Olaguibel de Olivera (1991), el blanco es más fino que el negro, aunque otros investigadores demuestran que no hay un efecto significativo entre el color de la capa (Trejo, 1986; Renieri *et al.* 1991).

Peso del Vellón

El peso del vellón es una característica de especial importancia para los productores de alpacas y junto con el diámetro de la fibra, cobra un significativo valor económico en el momento de la comercialización. Se han desarrollado estudios al respecto con la finalidad de mejorar esta característica en la selección, señalando que el peso del vellón depende del sexo y la edad del animal. Los machos producen más fibra que las hembras y su peso aumenta con la edad (Mac Gregor, 2006; Lupton *et al.*, 2006; Quispe *et al.*, 2008). Wuliji *et al.* (2000) señalan un resultado similar, siendo el vellón de los machos (2.57 kg) de mayor peso que el de las hembras (1.76 kg).

En los últimos diez años la población de alpacas está en crecimiento, sin embargo, la productividad de fibra se encuentra muy por debajo de su techo genético. En promedio se obtienen 2,3 kg de fibra por alpaca cuando se puede llegar a 5,4 kg con un buen manejo de los hatos. (UNIDO, 2006).

Longitud de fibra

La longitud de fibra en el vellón de alpaca juega un rol importante como factor de calidad ya que esta característica permite clasificarla como apta para el proceso textil. Esta medida varía de acuerdo a la edad (disminuye a medida que avanza la edad) y está escasamente afectada por el sexo y la raza. La raza

Huacaya proporciona longitudes que varían de 12,5 cm a 16,9 cm y la raza Suri valores de 13,15 cm a 16,9 cm (Bustínza, 2001), en alpacas del Perú. En su estudio, Wuliji *et al.* (2000), reporta una longitud de fibra de 9,9 cm en una población de alpacas de Nueva Zelanda.

1.2. PARAMETROS GENETICOS

Una de las dificultades en la estima de los parámetros genéticos es que sus valores no son constantes. La heredabilidad y la correlación genética cambia como consecuencia de la selección y/o la consanguinidad (Bulmer, 1971). Es indispensable disponer de estimas de los parámetros genéticos de una población estudiada antes del comienzo de una selección o de la aparición de la consanguinidad. La utilización de la metodología de los modelos mixtos permite obtener soluciones insesgadas (Henderson, 1975).

La estima de los parámetros genéticos representa datos importantes para todo programa de mejora genética. En las diferentes especies ganaderas se estiman la heredabilidad y las correlaciones genéticas para los principales caracteres productivos que afectan el rendimiento de una población animal. En ovinos el estudio para el carácter del peso vivo ha determinado bajos niveles de variación genética y heredabilidad, sugiriendo que el progreso genético de estos caracteres es factible pero lento (Zishiri *et al.*, 2012); por otro lado, en el estudio realizado por Valera *et al.* (2007) para caballos de Pura raza Española se estimaron los parámetros genéticos de variables biocinemáticas, destacando las altas heredabilidades encontradas para estas variables.

En poblaciones de alpacas de diferentes orígenes se han realizado estudios para la estimada de la heredabilidad para los caracteres de longitud de la mecha, diámetro de la fibra y peso del vellón. Las más altas heredabilidades fueron encontradas para el diámetro del vellón de 0.73 (Wuliji *et al.*, 2000)

aunque se encontraron valores bajos de 0.18 en el trabajo de León Velarde y Guerrero (2001).

Se han llevado a cabo escasos estudios de correlaciones fenotípicas en poblaciones de alpacas. Wuliji *et al.* (2000) en alpacas de Nueva Zelanda señalan correlaciones entre los caracteres del diámetro de la fibra y peso del vellón de 0.45; por su parte Bustínza (2001), trabajando con alpacas Peruanas, muestra correlaciones para los caracteres del diámetro de la fibra con la longitud de la mecha de 0.40. Sólo un estudio publicado, realizado por Cervantes *et al.* (2010) en poblaciones de alpacas, muestra correlaciones genéticas para diferentes caracteres de la fibra, señalando índices de correlaciones genéticas entre el diámetro de la fibra y el factor confort de -0.97 y de -0.98, para las razas Huacaya y Suri, respectivamente.

El conocimiento de las variaciones genéticas de caracteres productivos resulta de ayuda para los programas de mejora, que requieren una mayor evaluación genética de los animales (Mortimer *et al.*, 2009). Los cambios logrados en el rendimiento de caracteres productivos de una ganadería por medio de la selección genética son pequeños pero permanentes y acumulativos (Sölkner *et al.*, 1998).

1.3. VARIABILIDAD GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE ALPACAS

El mantenimiento de elevados niveles de variabilidad genética es el principal objetivo en los planes de conservación. Esta variación genética es un prerequisite para que las poblaciones sean capaces de hacer frente a los cambios ambientales que se pueden producir en el futuro y asegurar a largo

plazo la respuesta a la selección, natural o artificial para caracteres de interés económico o cultural (Ballou y Lacy, 1995; Oldenbroek, 1999; Barker, 2001).

La calidad de la fibra ha ido decreciendo en las últimas décadas, lo que sugiere un empobrecimiento genético de la especie (Kadwell *et al.*, 2001). Con la colonización española, a partir del año 1532, los rebaños nativos de alpacas fueron diezmados y desplazados a la puna (Novoa y Wheeler, 1984). En su estudio Wheeler *et al.* (1995), demuestran que en la época de la pre-conquista española había una acción selectiva para el mejoramiento de la finura en alpacas finas y súper finas y casi todos los animales eran uniformemente pigmentados.

Se considera que la calidad de los vellones de alpaca del Perú se ha deteriorado en lugar de haber mejorado, principalmente en lo referente a finura y peso del vellón (UNIDO, 2006). Los vellones producidos en sistemas comunitarios de crianza tradicional son de bajo peso, siendo la producción anual por alpaca de 1,9 kg (Toro *et al.*, 2001) y bianual de 2,1 kg, mientras que en condiciones medianamente tecnificadas es posible una producción anual de 2,3 kg (Jauregui y Bonilla, 1991; Nieto y Alejos, 1999). Sin embargo es posible encontrar rebaños con buena calidad de fibra, como en los estudios realizados por Braga *et al.* (2006), Montes *et al.* (2008) y Paredes *et al.* (2011) con medidas para el diámetro de fibra de 22,9 μm , 22,7 μm , 19,6 μm en las regiones Peruanas de Cuzco, Huancavelica y Arequipa, respectivamente.

Sobre la base de la demanda industrial, se ha asistido en los últimos decenios a un progresivo aumento de animales blancos respecto a los de color (Novoa, 1981 y 1990; Fernández Baca, 1994). Estudios actuales señalan que la población total de alpacas del Perú tiene aproximadamente un 80% de animales blancos. Como consecuencia de esta reducción de la variabilidad del color de

la fibra se crea el nacimiento de centros de conservación de animales de color (Ruiz y Castillo, 1991).

Renieri *et al.* (2009) sugieren que ningún programa de mejora genética puede plantearse sin tener como base una raza. Es importante que esta dinámica racial en la alpaca comience a producirse a nivel de las comunidades y de áreas ecológicas bien definidas, que permita conocer la estructura genética real de la población primaria existente para adecuarla a las direcciones colectivas de cualquier población.

Los camélidos sudamericanos domésticos son un recurso genético nativo de alto valor socioeconómico en la zona alto andina; sin embargo, la condición actual de los sistemas productivos no es motor para una mejora de los medios de vida de sus productores. Para modificar ésta situación es necesario que se intervenga en un marco

en el que interactúen la investigación, la extensión y el desarrollo. Los grandes desafíos abarcarán, entre otras acciones, la valoración de la producción, manejo innovador de las potencialidades de los criadores y la variabilidad genética que ofrecen los camélidos sudamericanos (Quispe *et al.*, 2009).

La necesidad de llevar a cabo investigaciones mediante herramientas de genética molecular (marcadores moleculares) orientadas al estudio de la variabilidad genética de los camélidos sudamericanos domésticos es importante, a fin de diseñar planes de manejo tendentes a conservar el reservorio genético de estos camélidos y mejorar sus características productivas. A partir de estudios previos como los de caracterización (Wheeler *et al.*, 2001; Sarno *et al.*, 2004; Maté *et al.*, 2005) es posible inferir la existencia de una marcada diferencia en los niveles de diversidad genética y estructura poblacional entre los camélidos sudamericanos silvestres y

domésticos, así como de variabilidad genética en poblaciones de alpacas que proporcionen al productor alpaquero los datos suficientes para emprender programas de mejora genética en sus rebaños a mediano o largo plazo.

La variabilidad genética puede ser estimada, a través de una gran diversidad de estadísticos, dependiendo su idoneidad en cada caso del propósito del estudio. Clásicamente ha sido estimada de forma indirecta a nivel faneróptico, morfológico o productivo, más modernamente a nivel de ADN y recientemente a nivel de expresión génica (Molina *et al.*, 2007).

Una de las fuentes para estimar el nivel de diversidad genética de una población es la información genealógica. A partir de ella podemos calcular varios parámetros que nos ofrecen indicios de la variabilidad genética retenida por el individuo, así como con el conocimiento de su grado de endogamia a partir del cálculo de matrices de parentesco. Una revisión de éstos puede encontrarse en Azor y Goyache (2007). Cuando los registros genealógicos no son fiables o simplemente no existen, debe recurrirse a otras estrategias para estimar el nivel de diversidad genética y prevenir su pérdida. En la actualidad, esto puede resolverse mediante el uso marcadores moleculares de ADN.

El uso de los marcadores moleculares ha permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos y estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. Un marcador molecular se puede definir como un factor polimórfico heredable según un modelo mendeliano simple, con interpretación clara y reproducibilidad, que puede ser utilizado como referencia para diferentes tipos de estudios genéticos (Awise, 1994). Estos factores polimórficos heredables pueden ser marcadores proteicos (antígenos e isoenzimas) o marcadores basados en el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida).

La importancia que, desde el punto de vista de la producción animal, tienen los marcadores genéticos radica en su aplicación a la identificación individual y al control de filiación, al garantizar la fiabilidad de los documentos genealógicos, material fundamental para emprender las tareas de conservación y mejora de las razas, así como el estudio de la variabilidad genética de la población y su cercanía con otras poblaciones y razas (Azor y Goyache, 2007).

El desarrollo de las técnicas moleculares de análisis del polimorfismo del ADN, a partir del descubrimiento de la técnica denominada PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis *et al.*, 1986), ha permitido evaluar diferencias de variabilidad genética entre animales, razas y especies. Ésta puede detectarse en genes responsables de caracteres cualitativos (marcadores moleculares Tipo I) y en *loci* que no codifican proteínas (marcadores neutros o Tipo II). Esta variabilidad permite también acotar áreas cromosómicas donde se encuentran genes responsables de caracteres cuantitativos (QTL). En cuanto a los marcadores Tipo II, el polimorfismo de los microsatélites del ADN está jugando un papel muy importante tanto en la identificación individual y el control de filiación como en el estudio de la variabilidad intra y entre poblaciones y la diferenciación racial, aspectos todos ellos esenciales a la hora de establecer una estrategia de conservación de una raza.

Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad: buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, y debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios. El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de estos marcadores, compartan todos sus alelos. Para elegir el tipo

de marcador a utilizar, éste debe presentar, además de las características anteriormente descritas, una herencia estable (baja tasa de mutación), ser muy reproducible y preciso, presentar pocos alelos “nulos”, una información del genotipo no limitada únicamente a muestras frescas, no requerir grandes cantidades de ADN, y segregarse independiente de otros marcadores (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

1.4. MARCADORES MOLECULARES

El polimorfismo del ADN se puede clasificar según su propia naturaleza y el sistema de detección. Así, entre otros, se pueden distinguir varios tipos de marcadores moleculares: como los RFLP o polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (del inglés, “restriction fragment length polymorphism”), RAPD o polimorfismo del DNA amplificado al azar (del inglés, “random amplified polymorphic DNA”, AFLP o polimorfismo del longitud tamaño de fragmentos amplificados (del inglés, “amplified fragment length polymorphism”) y SNP o polimorfismo nucleotídico (o de sitios nucleotídicos) (del inglés, “single nucleotide polymorphism”). Además existen los elementos repetitivos del genoma. Se estima que más de un 50% está constituido por secuencias repetitivas (Venter *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). El ADN repetitivo se puede clasificar en función del patrón de distribución de la secuencia repetida en el genoma en dos grupos: secuencias que se encuentran dispersas por el genoma y secuencias que se repiten en tándem. El primer grupo a su vez se puede subdividir en otros dos en función del tamaño de la unidad de repetición: LINEs (del inglés, “long interspersed elements”) y SINEs (del inglés, “short interspersed elements”).

Los elementos repetitivos en tándem se conocen como ADN satélite y también se clasifican según su tamaño (Jiménez-Gamero, 2003).

Los diferentes tipos de ADN repetido en tándem existentes revelan una tendencia del ADN genómico a ser repetitivo, gracias a mecanismos internos como el sobrecruzamiento desigual durante la mitosis y el deslizamiento de la ADN polimerasa durante la síntesis del ADN. Estos mecanismos generan polimorfismos de longitud que pueden ser puestos de manifiesto mediante electroforesis. El ADN repetido se clasifica en función del grado de repetición y del tamaño de la unidad iterativa (Tautz, 1993). Por sus aplicaciones en estudios de polimorfismo destacan los minisatélites y los microsatélites. Los minisatélites o VNTRs (del inglés, "variable number of tandem repeats") son repeticiones en tándem de unidades de entre 9 y 100 pb.

Hoy día los marcadores más usados en estudios de estimación de la variabilidad genética y gestión de la misma son los microsatélites.

Los Marcadores Microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como STR (del inglés, "short tandem repeat") y SSR (del inglés, "simple sequence repeat"), son repeticiones en tándem de unidades de uno a seis nucleótidos, del tipo (A)_n, (GT)_n, (CAC)_n o (GATC)_n, etc., la Figura 4 muestra un microsatélite con repeticiones en tándem dinucleótido (GT). La variación del número de repeticiones y por tanto, el tamaño de los fragmentos, constituye la base del polimorfismo (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). Se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma, son muy abundantes y se han detectado microsatélites dentro de regiones codificantes de algunos genes, formando parte de intrones y de exones. Este tipo de marcador muestra un elevado polimorfismo fácil de detectar, que se pone de manifiesto mediante amplificación por PCR (ya que

están flanqueados por secuencias únicas de DNA) y posterior electroforesis. Además tienen herencia codominante y se prestan a la automatización. Estas características los han convertido en los marcadores genéticos de elección para una gran cantidad de aplicaciones, como la realización de mapas genéticos, la caracterización de poblaciones y la realización de pruebas de identificación individual y control de filiación, entre otros. Estas características han hecho que la FAO haya propuesto su utilización sistemática para la realización de un programa global para la gestión de recursos zoogenéticos (Barker *et al.* 1993).

En función de su estructura, se dividen en tres categorías: perfectos (sin interrupciones entre las secuencias repetidas), imperfectos (con una o más interrupciones) y compuestos (con dos o más secuencias cortas diferentes repetidas en tándem y adyacentes). Los más polimórficos son los perfectos. Weber (1990) observó en microsatélites perfectos tipo (GT)*n* humanos, que el grado de polimorfismo de estos marcadores depende de *n*. Para “*n*” similares en microsatélites imperfectos, el grado de polimorfismo observado se ve reducido. Esta relación también se ha encontrado en microsatélites tri y tetranucleotídicos (Edwards *et al.*, 1991; Band y Ron, 1996).

La tasa de mutación de los microsatélites, estimada entre 10^{-3} y 10^{-5} , es alta si se compara con la de las mutaciones puntuales (del orden de 10^{-9} a 10^{-10}). Existen dos hipótesis que explican el mecanismo por el que mutan: recombinación entre moléculas de ADN por un sobrecruzamiento desigual durante la meiosis (Smith, 1976) y deslizamientos durante la replicación del ADN (Levinson y Gutman, 1987; Schlötterer y Tautz, 1992). Si bien ambos mecanismos son posibles y pueden actuar conjuntamente, existe una serie de evidencias que aboga en favor del segundo como principal causante

de la aparición de nuevas formas alélicas. Así, la mayoría de las mutaciones de los microsatélites que afectan a su longitud, suponen la pérdida o ganancia de unidades de repetición simples y la distribución de los microsatélites en función de su longitud es congruente con un tipo de mutación “stepwise” (del inglés, paso a paso) (Bell y Jurka, 1997). Además, los microsatélites más largos son más informativos (presentan más alelos, es decir, han sufrido más mutaciones) y la interrupción de la secuencia genera una reducción del polimorfismo (Weber, 1990) y de la tasa de mutación (Petes *et al.*, 1997).

No se conoce exactamente la función de los microsatélites, pero el hecho de que su posición respecto a diversos genes se haya conservado entre mamíferos tan divergentes como los primates, los roedores y los artiodáctilos aboga en favor de una función particular (Moore *et al.*, 1991; Stallings, 1995; Shariflou y Moran, 2000). Esta conservación también afecta a las secuencias flanqueantes de los mismos, de manera que a menudo los cebadores utilizados para la amplificación de una secuencia dada en una determinada especie funcionan bien en otras especies cercanas evolutivamente (Pépin *et al.*, 1995). Esta funcionalidad parece estar relacionada con su estructura y no con la longitud de la secuencia (Sun y Kirkpatrick, 1996). Una de las funciones que se les han atribuido es el mantenimiento de la estructura de los cromosomas, gracias a la capacidad que tienen algunas secuencias tipo (CA)_n de tomar la conformación de Z-DNA (Nordheim y Rich, 1983). También han sido relacionadas con puntos de alta frecuencia de recombinación (Murphy y Stringer, 1986) y con el empaquetamiento del DNA durante la condensación cromosómica en la meiosis (Gross y Garrad, 1986). También se han asociado con la regulación génica, pues se han encontrado en zonas cercanas a promotores de genes, regulando la expresión por sí mismos o actuando como

sitios de unión de proteínas reguladoras (revisado por Kashi y Soller, 1999). La presencia de microsatélites en algunos genes menores reparadores de desapareamientos en el ADN sugiere que pueden funcionar como un “interruptor” que module la tasa de mutación en condiciones que requieran una rápida evolución (Chang *et al.*, 2001).

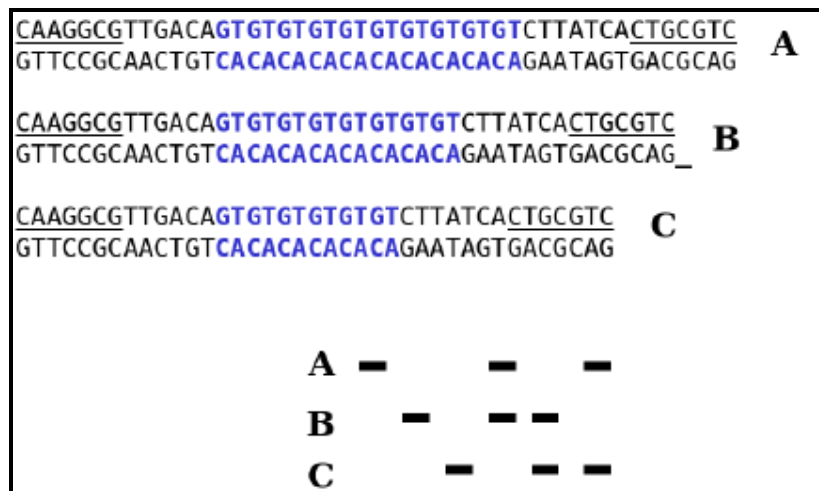
Dadas sus propiedades, estos marcadores se han impuesto para la caracterización genética de las poblaciones y los estudios de variabilidad genética (Jarne y Lagoda, 1996), existiendo un elevado número de trabajos en los que se estima la variabilidad genética de diferentes razas y la diversidad genética entre ellas.

Una de las principales utilidades de este tipo de marcadores, dado su gran polimorfismo, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética y diferenciación dentro y entre poblaciones (Arranz *et al.*, 2001). Como consecuencia, los microsatélites se han utilizado ampliamente en estudios demográficos (MacHugh *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2002; Hanotte *et al.*, 2002; Beja-Pereira *et al.*, 2003), debido a que con ellos se puede cuantificar la variación genética dentro y entre poblaciones o razas, permiten la identificación de introgresiones y también pueden usarse para asignar individuos dentro de una población, raza o especie (Bruford *et al.*, 2003), en razas de interés productivo, como en la identificación racial del cerdo Ibérico (Membrillo *et al.*, 2008, 2011). Estos marcadores son muy sensibles a procesos de selección y de cuellos de botella (Luikart y Cornuet, 1998), ambos casos recurrentes en poblaciones domésticas.

Adicionalmente, durante los últimos años se han realizado muchos estudios que han utilizado los microsatélites para análisis filogenéticos, concluyendo que, con un suficiente número de *loci* investigados y utilizando estimas de tasas de mutación apropiadas, los microsatélites pueden dar una

muy buena aproximación de la filogenia (Takezaki y Nei, 1996). Probablemente este es el campo en el cuál han sido más extensamente utilizados, mientras que su otro gran campo de acción ha sido el de la construcción de mapas genéticos (proyecto del genoma humano y diferentes proyectos de mapas genéticos en animales domésticos).

Figura 4. Esquema de un microsatélite con repeticiones en tándem dinucleótidos (GT) en una secuencia de ADN



A, B, C: distintos tamaños de microsatélite observables en electroforesis

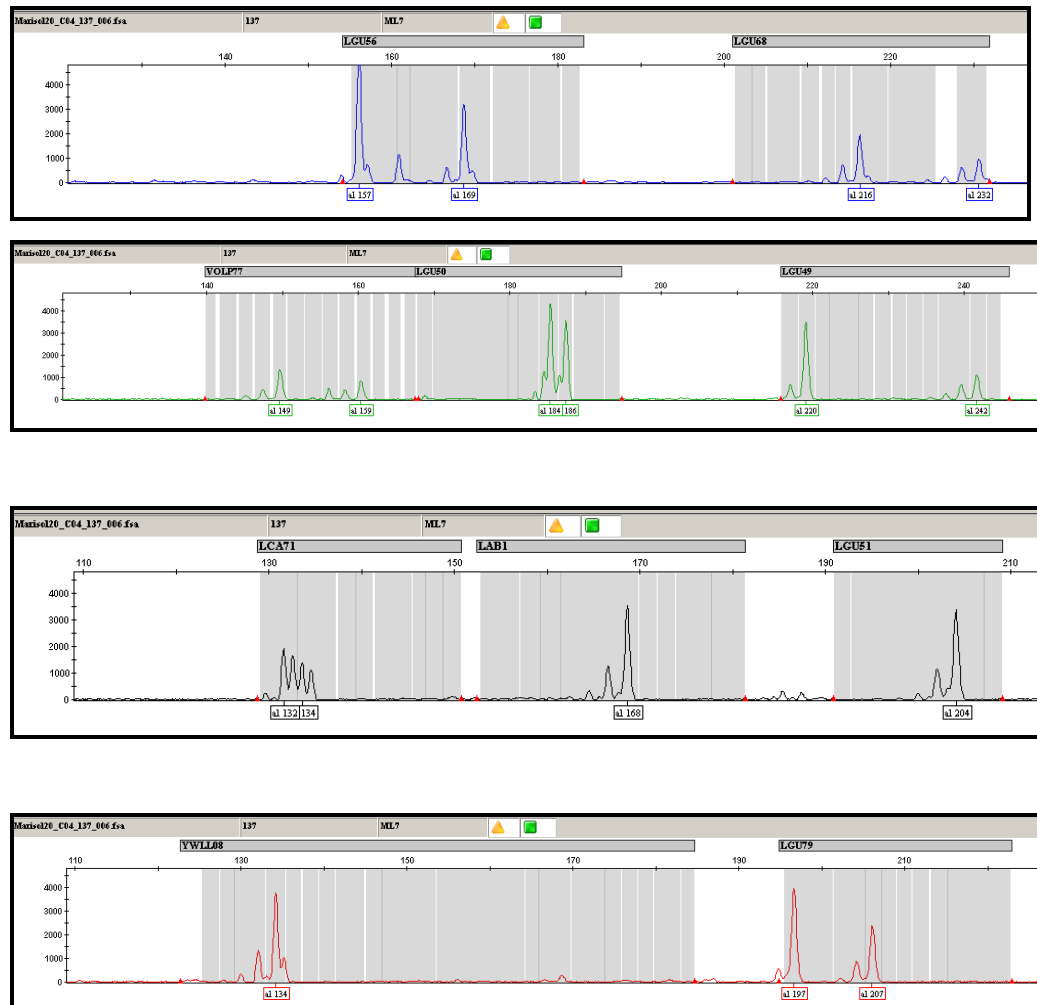
Uso de marcadores moleculares microsatélites en el estudio de los camélidos sudamericanos

En camélidos sudamericanos se han caracterizado una serie de marcadores microsatélites dinucleótidos (Bustamante *et al.*, 2003; Penedo *et al.*, 1998ab, 1999; Sarno *et al.*, 2000; MacPartlan *et al.*, 1997; Obrequé *et al.*, 1998, 1999; Lang *et al.*, 1996) y tetranucleótidos (Munyard *et al.*, 2009). Algunos de estos marcadores no sólo se han utilizado en la caracterización de

las diferentes especies de camélidos sudamericanos, sino también en estudios de diversidad genética, pruebas de parentesco y asociaciones para caracteres cuantitativos de la fibra de alpaca (Sasse *et al.*, 1999; Sarno *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2003; Maté *et al.*, 2005; Sarno *et al.*, 2009; Barreta *et al.*, 2012; Spencer *et al.*, 2010; Paredes *et al.*, en prensa), en estudios para revelar el origen de las formas domésticas de los camélidos (alpaca y llama) (Kadwell *et al.*, 2001) y en veterinaria legal, para determinar el origen de especímenes en la detección del tráfico ilegal de camélidos (Di Rocco *et al.*, 2011). Dichos marcadores se han mostrado altamente polimórficos en estas poblaciones (Spencer y Woolnough, 2010).

Existen menos de 150 marcadores microsatélites publicados para alpacas (Munyard *et al.*, 2009). Este dato contrasta con los 1.516 *loci* obtenidos de BLAST para *Bos taurus* (Reed y Chaves, 2008), Por lo que es necesario un mayor número de marcadores microsatélites para tener una amplia cobertura del genoma de la alpaca y poder mapear las características cuantitativas de especial interés como el diámetro de la fibra. En el caso del ganado bovino, Ihara *et al.* (2004) localizaron alrededor de 4,000 marcadores microsatélites para lograr una alta densidad de cobertura del genoma, y por su parte Watanabe *et al.* (1999) usó alrededor de 5,000 marcadores para el genoma de la rata.

Figura 5. Perfil genético de 10 marcadores microsatélites en PCR multiple obtenido por el GeneScan v3.7 y tipificado con el software GeneMapper 3.7.



1.5. RELACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES Y CARACTERES CUANTITATIVOS

El estudio y caracterización mediante marcadores microsatélites representa una herramienta de gran utilidad que permite el estudio de caracteres cuantitativos para orientar y desarrollar estrategias de apareamiento enfocadas al carácter productivo del diámetro de la fibra es decir la producción de fibra fina en la alpaca (Barreta *et al.*, 2012; Paredes *et al.*, en prensa).

En camélidos sudamericanos los marcadores microsatélites han sido utilizados para revelar los ancestros de las formas domésticas (alpaca y llama) como señalan Kadwell *et al.* (2001) en su estudio. Otros estudios se han desarrollado para determinar niveles de diversidad genética, estructura poblacional entre especies y entre poblaciones, el desarrollo de pruebas de parentesco, como en poblaciones de alpacas de Perú (Rodríguez *et al.*, 2004; Agapito *et al.*, 2008; La Manna *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, en prensa), Bolivia (Barreta *et al.*, 2012) y Australia (Munyard *et al.*, 2009) y en el estudio de asociación para un carácter cuantitativo de la fibra de alpaca (Paredes *et al.*, en prensa).

La FAO, (2011) propone directrices para la caracterización genética molecular de recursos genéticos animales. Esta propuesta busca aumentar el valor de los recursos animales y sus posibilidades de utilización para emprender programas de cruzamiento y sistemas de producción más eficientes. Se han propuesto 25 marcadores microsatélites para la caracterización genética en camélidos sudamericanos, publicados por Mariasegare *et al.* (2002), Obreque *et al.* (1998) y Lang *et al.* (1996).

El actual conocimiento de marcadores genéticos de ADN y los mapas de ligamiento en diferentes especies como por ejemplo la oveja (Maddox *et al.*,

2001; Ihara *et al.*, 2004), permiten la identificación de *loci* relacionados con caracteres cuantitativos (QTL Quantitative Trait *Loci*), que explican una parte significativa de las variaciones genéticas en los fenotipos de interés (Weller, 2001). Adicionalmente, Georges *et al.* (1995), puntualizan que los marcadores microsatélites permiten identificar patrones de herencia de segmentos ligados del genoma en poblaciones estructuradas. En camélidos sudamericanos aún no se han publicado estudios tendentes a identificar *loci* para caracteres cuantitativos; en el caso de la alpaca, el carácter que mayor importancia cobra es el diámetro de la fibra, ya que el valor de la fibra para la industria textil depende de la finura que ésta posea. Sin embargo, solamente se ha desarrollado un estudio sobre la existencia de un gen mayor que afecta el diámetro de la fibra (Pérez-Cabal *et al.*, 2010).

La mejora genética en las poblaciones de alpacas, se puede lograr aplicando un programa de selección para caracteres específicos como los fenotipos de color y el tipo del vellón, siendo necesarias más investigaciones para determinar la relación entre el peso del vellón, longitud de la mecha y diámetro de la fibra y los efectos medioambientales (Frank *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo, busca contribuir a los programas de mejora genética que se están emprendiendo en el sector de los Camélidos Sudamericanos para la mejora de la capacidad productiva de la alpaca, incidiendo sobre todo en la fibra (fibra fina).

La crianza de alpacas en Perú está formada en su mayoría por los sistemas de crianza tradicional (comunidades campesinas) y crianza mejorada (pequeños y medianos productores); y en menor escala por una crianza

tecnificada (grandes productores y centros de investigación). La presente tesis realiza el estudio con poblaciones de alpacas procedentes de comunidades campesinas, de pequeños y medianos productores y de la empresa Fundo Experimental Pacamarca de Incatops S.A. que lleva una crianza tecnificada contando con alpacas de elite en Perú. Este estudio pretende abordar distintos escenarios productivos y conocer los recursos genéticos existentes en las poblaciones de alpacas del Perú.

Los estudios de parámetros genéticos y la caracterización de la variabilidad genética en las diferentes poblaciones de alpaca, se consideran importantes para un programa de mejora, ya que permiten tener un conocimiento de la estructura genética de la población como reservorio de un importante recurso genético que nos asegure con certeza las características genéticas que poseen estos individuos. El contar con datos de valoraciones genéticas de una población de alpacas, en las cuales los efectos de genes mayores estarían presentes afectando a un carácter cuantitativo como el diámetro de la fibra, fueron motivos sustanciales por los cuales se emprendió el estudio sobre la posible localización de marcadores moleculares microsatélites que podrían estar asociados al diámetro de la fibra de Alpaca, ya que aún no se han publicado estudios de *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTL) de la fibra de Alpaca.

La crianza de alpacas constituye la principal actividad económica de los pobladores Altoandinos, destinada fundamentalmente a la producción de fibra. Es de vital importancia la mejora en la calidad de los vellones de alpacas para una fibra fina, que a un medio y/o largo plazo otorguen a las familias Alpaqueras la posibilidad de ofrecer al mercado textil vellones con características deseables cuyo beneficio se espera pueda verse reflejado en un incremento de sus ingresos económicos.

Las poblaciones de Alpacas del presente trabajo proceden de ganaderías localizadas en las comunidades más representativas de la Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca (RNSAB) que son referentes de producción en la región Arequipa, así como también de ganaderías de la región Puno, en la perspectiva de mejorar la calidad de su principal producto como es la fibra. Otras poblaciones de alpacas (animales con valoración de datos genéticos) fueron procedentes de la empresa privada Fundo Experimental Pacamarca de Incatops S.A.

Para llevar a cabo la finalidad del estudio se han desarrollado los siguientes objetivos:

1. Estimar los parámetros genéticos en una población de Alpacas de la raza Huacaya, para conocer los valores de la heredabilidad, las correlaciones genéticas y los efectos fijos de las características productivas del vellón.
2. Diagnosticar la variabilidad genética y fenotípica de cinco poblaciones de alpacas Huacaya (*Vicugna pacos*) del Perú, mediante el uso de Marcadores Microsatélites y medidas del diámetro de la fibra.
3. Estimar la diversidad genética en poblaciones de alpacas de las razas Huacaya y Suri y la asociación de 69 marcadores microsatélites con un gen mayor que afecta a la característica del diámetro de la fibra de alpaca.

CAPITULO I

Estima de parámetros genéticos y efectos fijos para en una población de Alpacas Huacaya (*Lama pacos*) del Perú.

Publicado:

M.M. Paredes-Peralta, A. Alonso Moraga, M. Analla, J. Machaca-Centty, A. Muñoz-Serrano. Genetic parameters and fixed effects estimation for fibre traits in alpaca Huacaya (*Lama pacos*). Journals of Animal and Veterinary Advances, 10 (11): 1484-1487,2011. Medwell Journals.

ABSTRACT

Alpaca (*Lama pacos*) is one of the two species of South American Camelids, being Huacaya the most important breed, due to its higher fibre production. Appropriate knowledge of genetic parameters for production traits is important in order to predict the selection response and also to establish selection strategies. The purpose of the present study is to estimate the genetic parameters and the fixed effects for fibre production in a population of Huacaya alpaca breed from the Toccra community (Arequipa region, Peru). The animal population consisted of 286 descendents, 38 sires and 188 dams. The analyses carried out showed that the effects of sex, colour, and year of shearing were not significant; while, the age at shearing was significant on all traits. Fleece weight showed the highest heritability values, while diameter and length fibre showed an intermediate value. Genetic and phenotypic correlations were all positive, with high values between fibre diameter and length. Therefore, a promising panorama is depicted for a selection program, as it will be possible to obtain a good response to the selection.

Key words: alpaca, fleece, diameter, fibre, age, colour, Peru.

1. INTRODUCTION

Animal production in Peruvian Altiplano is based on the breeding of South American camelids, mainly Huacaya alpaca breed. This breeding constitutes the major living activity in this area. The breeding system suffers from several deficiencies like losing of fibre thinness and colour, decrease of the population and the poor managerial techniques. In fact, only about 20% of individuals produce thin fibres (below than 17 μm diameter).

A major difficulty in estimating the genetic parameters is the lack of constancy of their values. Heritability and genetic correlations change as a consequence of selection and consanguinity (Bulmer, 1971). Therefore, it is a mandatory to dispose of estimates of such parameters, before selection starts as it is necessarily followed by an increase of consanguinity. The use of mixed model methodology allows obtaining unbiased solutions (Henderson, 1975). On the other hand, these parameters are necessary in order to choice the more suitable traits for selection, and to evaluate, afterward, the future progenitors on the basis of their additive breeding values (Ponzoni *et al.*, 1999).

Concerning wool traits, fibre diameter is the most important factor affecting the balls produced (Villaroel, 1991; Antonini and Vinella, 1997). The average diameter value in the alpaca Peruvian population is 23.8 μm and 24.02 μm for the Suri and the Huacaya breeds, respectively (Sumar, 1991). In the New Zealand alpaca, the value is between 28.0 and 31.9 μm (Wulliji *et al.*, 2000). This diameter is affected by factors like breed, age, colour, year and season of production (Bustínza, 2001; Frank *et al.*, 2006). On the other hand, the sex of the animal specially affects the thinness (Wuliji *et al.*, 2000; McGregor and Butler, 2004).

With respect to genetic parameters, different estimates of heritability are shown in table 1. The highest heritability corresponds to fibre diameter with a

value of 0.73 ± 0.19 (Wuliji *et al.*, 2000); although much lower values (0.18) were also reported (Léon-Velarde and Guerrero, 2001). On the other hand, fibre diameter as well as fleece weight show a moderate value of heritability. The estimates vary from 0.21 ± 0.01 (Roque *et al.*, 1985) to 0.43 ± 0.39 (Mamani, 1991) for fibre length; and from 0.21 ± 0.07 (Roque *et al.*, 1985) to 0.35 ± 0.02 (Velasco, 1980) for fleece weight. The estimated heritability for fibre traits in the Huacaya breed is between 0.25 and 0.41 (Cervantes *et al.*, 2009). No estimates for genotypic or phenotypic correlations are available. These estimates are necessary for the fine tuning of a multi-trait selection scheme.

The objective of the present work is to estimate genetic parameters in a population of alpaca from the Huacaya breed, in order to know the heritability and the genetic correlations of the most important traits of the alpaca wool.

Table 1. Available estimates of heritability for fibre diameter, fibre length and fleece weight.

Trait	Estimate	Reference
Fibre diameter	0.67 ± 0.30	Ponzoni <i>et al.</i> (1999)
	0.73 ± 0.19	Wuliji <i>et al.</i> (2000)
	0.18	Léon-Velarde and Guerrero (2001)
Fibre length	0.21 ± 0.01	Roque <i>et al.</i> (1985)
	0.43 ± 0.39	Mamani (1991)
	0.31	Léon-Velarde and Guerrero (2001)
Fleece weight	0.35 ± 0.02	Velasco (1980)
	0.22	Bravo and Velasco (1983)
	0.21 ± 0.07	Roque <i>et al.</i> (1985)
	0.31 ± 0.17	Ruiz de Castilla <i>et al.</i> (1992)

1. MATERIAL AND METHODS

Animals corresponded to a population of alpaca from the Tocra community of Arequipa region in the Peru. This population consisted of 286 young animals from 38 sires and 188 dams. The wool traits analysed corresponded to the first shearing during 2005 and 2006. Data relative to fleece weight and fibre length were collected by breeders. Samples for diameter analysis were obtained for the mid flank by the own breeder and analysed in the laboratory of textile fibres of the National Agricultural University of La Molina in Lima (Perú).

Best linear unbiased estimates of fixed effect and estimates of variances components were obtained via the following multi-trait linear model:

$$\begin{bmatrix} d \\ l \\ w \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu d \\ \mu l \\ \mu w \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Sd_i \\ Sl_i \\ Sw_i \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Yd_j \\ Yl_j \\ Yw_j \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Ad_k \\ Al_k \\ Aw_k \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Cd_m \\ Cl_m \\ Cw_m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Bd_n \\ Bl_n \\ Bw_n \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Ed_n \\ El_n \\ Ew_n \end{bmatrix}$$

where:

d, l and w stand for analysed traits, i.e. fibre diameter, fibre length and fleece weight, respectively.

S, Y, A and C are fixed effect affecting traits, i.e. sex of the animal, year of shearing, age of the animal and the colour of the cape, respectively.

B and E are the random effects, namely B the animal effect, which variance structure was proportional the additive components according to the numerator relationship matrix; and E the residual or the environmental effect, which variance structure was proportional to the residual components according to an identity matrix.

where:

The additive variance-covariance components are
$$\begin{bmatrix} a_d^2 & a_{dl} & a_{dw} \\ & a_l^2 & a_{lw} \\ & & a_w^2 \end{bmatrix}$$

The environmental variance-covariance components are
$$\begin{bmatrix} e_d^2 & e_{dl} & e_{dw} \\ & e_l^2 & e_{lw} \\ & & e_w^2 \end{bmatrix}$$

a is the component corresponding to additive variance of each trait (on diagonal), or additive covariance between two traits (above diagonal).

e is the component corresponding to environmental variance of each trait (on diagonal), or environmental covariance between two traits (above diagonal).

The BLUEs and variances components were obtained by using the Wombat software for general linear model and variance components estimation (Meyer, 2006; 2007).

2. RESULTS AND DISCUSSION

Estimation of fixed effects

The blues of fixed effects are shown in Table 2. It can be seen that neither sex nor years of shearing have shown any significant influence on the analysed traits. Nevertheless, the analysis of coat colour suggests that white animals produce about 14% more wool than the coloured, with the same diameter and length of the fibre. On the other hand, age of animals affected significantly all the traits under analysis. Yet age increased the fibre diameter, bearing in mind that a diameter less than 22 μm is still a good value (McGregor, 2006); and breeder should delay shearing until the animals are one

year olds to take profit from the increase in fibre length (about 15%) and in fleece weight (about 37%). Lupton *et al.* (2006) have reported that sex, age and colour all affected fibre traits with a significant interaction between sex and age. Similarly, Frank *et al.* (2006) found a clear evidence of the effect of age and colour on fleece weight and fibre diameter.

Table 2. GLS means according to sex, year of shearing, age and coat colour of the analysed wool traits

Factors		Data Number	Fibre Diameter	Fibre Length	Fleece Weight
Sex	Male	113	19.67 a	10.26	1.476
	Female	101	19.81 a	a 10.27 a	a 1.437 a
Year	2005	112	20.09 a	10.34	1.516
	2006	102	19.35 a	a 10.19 a	a 1.394 a
Age	9 months	17	18.77 a	9.53 a	1.275
	10 months	78	19.02 a	10.06	a
	11 months	88	20.19	b	1.315
	12 months	31	ab 20.76 b	10.33 b 10.98 c	b 1.518 c 1.748 d
Colour	White	155	19.90 a	10.18	1.489
	Coloured	59	19.30 b	a 10.48 a	a 1.376 b

Estimation of heritability

Values of heritability are shown in table 3. The highest value of heritability was obtained for fleece weight (0.71). Such a value is much higher than those reported in the literature, where the highest value (0.35) was reported by Velasco (1980). This is a good finding since fleece weight is the main quantitative component of production and should be included as a selection objective. Fibre length show a moderate heritability smaller than that reported by Mamani (1991) and León-Velarde and Guerrero (2001), but higher than the value reported by Roque *et al.* (1985). Nevertheless, there is no need to change the mean of this trait as it shows an adequate value according to the textile industry in the Peru. Fibre diameter is an important economical trait, since it is the scale of wool quality. It should be maintained below 22 μm (McGregor, 2006) to ensure a good

quality to wool. Thus, the reduction of this trait should also be included in the selection objectives. However, its heritability is moderate (about 0.30), and therefore selection would not be as efficient as when applied for fleece weight.

Estimation of correlations

The values of additive and phenotypic correlations are also shown in table 3. All the phenotypic correlations showed lower values (between 0.16 and 0.18). Concerning additive correlations, the highest value (0.60) was obtained between fibre diameter and length. The lowest value (0.28) was obtained between fibre diameter and fleece weight. This is a favourable feature since it suggests that selection in the opposite direction for diameter and weight is possible. Lastly, the correlation between fleece weight and fibre length was moderate with a value of 0.37. A selection criterion could be the increase on

fleece weight, keeping fibre diameter at the limit value imposed by the textile industry. However, other genetic tools of improvement should be investigated like QTL affecting wool traits, as some QTL of notable effect were already described in sheep (Bidinost *et al.*, 2008).

Table 3. Heritabilities (\pm S.E.) on diagonal, genetic correlations (\pm S.E.) above diagonal and phenotypic correlation (\pm S.E.) below diagonal for fibre diameter, fibre length and fleece weight.

	Fibre Diameter	Fibre Length	Fleece Weight
Fibre Diameter	0.36 \pm 0.20	0.60 \pm 0.26	0.28 \pm 0.16
Fibre Length	0.18 \pm 0.07	0.28 \pm 0.18	0.37 \pm 0.17
Fleece Weight	0.15 \pm 0.07	0.16 \pm 0.07	0.71 \pm 0.25

Conclusion

In order to improve the economical conditions of habitants of the Toca community of Arequipa region in the Peru, a selection program for improvement of wool traits of the alpaca in this region should be implemented. Such an improvement could be achieved by selecting animals on the basis of their breeding value for increasing fleece weight keeping constant the fibre diameter. On the other hand, the age at first shearing should be applied at least one year, because of its beneficial drawbacks on production.

CAPITULO II

Variación genética y fenotípica en cinco poblaciones de alpacas
Huacaya (*Vicugna pacos*) del Perú

Publicado:

M.M. Paredes, A. Membrillo, P.J. Azor, J.E. Machaca, D. Torres, A. Muñoz Serrano. Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. Small Ruminant Research DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.09.017.

ABSTRACT

Five Peruvian alpaca populations from South Peru (San Juan de Tarucani, Estación Pillones and Chalhuanca from Arequipa Region and Palca and Lampa from Puno Region) were analysed at 20 microsatellite markers in order to estimate the genetic diversity. The association between the microsatellite genotypes and the fiber diameter traits was also examined in the alpacas of first shearing. A total of 230 alleles were observed from 272 DNA samples across the five populations. Gene diversity for each population ranged from 0.749 to 0.712 in Chalhuanca and Lampa populations respectively being the most diverse in the alpaca populations San Juan de Tarucani and Chalhuanca. The overall F_{IS} value (0.15) was moderate and different from zero, the significant deficit of heterozygotes occurred in seven out of twenty surveyed loci within sampled alpacas. Considering the individual populations, the lowest heterozygote deficit was observed in Palca (0.123). Absence of genetic bottleneck was found in the five investigated populations. The global F_{ST} value among the five alpaca populations were 0.02, San Juan de Tarucani and Palca were the least differentiated populations at the genetic level (0.012) and the highest level gene flow (Nm) of 19.66. The analyses of variance showed a higher value of genetic differentiation within populations (79%) than among populations (19%). The correspondence analysis, the genetic differentiation and the phylogenetic tree exhibited the same pattern of clustering, although the results of the phylogenetic relationships are not in accordance with the geographical location. This non-geographical sharing of the gene pools may be related to trading of male alpacas from the Lampa Province to the Chalhuanca and San Juan de Tarucani localities. The ANOVA showed that there were no significant differences in fiber diameter among the five populations with an overall mean of 18.96 μm . The DUNCAN test showed

in the total population the association between the fiber diameter and the alleles of the CVRL07, LGU68 and LCA65 microsatellite loci. Although to discard the spurious origin of this higher sample size relationship; and number of microsatellite loci should be screened in further studies.

Short title: Microsatellite and fiber variability of alpacas

1. INTRODUCTION

Peru is the first camelids fiber producer (90% of world production) with more than four million alpacas (*Vicugna pacos*). Australia and USA also have alpaca populations with high quality fiber, although Peru has preserved a very large variety of color phenotypes and an important genetic resources bank for the Suri and Huacaya breeds. The Puno, Cuzco, Arequipa Huancavelica, and Ayacucho departments lead the production of alpaca breeding (UNIDO, 2010). The animal production in the Peruvian high-Andean zones is based on the breeding of Domestic South American Camelids (alpacas and llamas), the alpacas are mainly bred in these zones. The alpacas are mainly bred to produce fiber for the textile industry; the fleece weight and fiber diameter are the traits with major economic value. For this reason the genetic improvement of these animals in the high-Andean zones is very important, in order to basically improve the fibre quality traits. The breeding zones for camelids in Peru are located in provinces with more poverty and marginalization (UNIDO, 2006). Consequently, the support for the improvement of the main economic activity (fiber production) is important in the high-Andean families from Peru, as integrated biological-human communities living in the puna environments can profit from the genetic and phenotypic studies of naïve variability.

The alpaca populations have undergone selection pressures during many generations for fiber and color traits (Presciuttini *et al.*, 2010). This fact along with the possible founding effects in some breeds could lead to a possible loss of genetic variability in the alpaca breeds. About this, recent studies (Agapito *et al.*, 2007; Barreta *et al.*, 2012) indicated favorable data from the genetic variability in the alpaca populations. The estimation of the levels of genetic diversity in a population is important and necessary to support the variability of the populations. The loss of genetic diversity diminishes the aptitude to recover threatened species and to support and improve the performance of livestock

(Aranguren and Jordana, 2001). The main problem in the livestock populations is the increase of the inbreeding level and consequently inbreeding depression producing a reduction of average phenotypic values of the traits (Falconer and Mackay, 1996). The application of molecular biology studies (genetic variability, location of QTL and candidate genes) can contribute to breeding programs to improve the production traits that are sought. The maintenance of the genetic variability is the ultimate purpose of appropriate management of the animal genetic resources and the revealing of high levels of genetic diversity is a hallmark of a well done maintenance of the genetic resources.

Microsatellite markers are considered the best tools for genetic identification, evaluating the genetic relationships within and among populations as well as for parentage testing in breeds (Schlötterer and Harr, 2001). Quantitative Trait Loci detected and confirmed in commercial populations represents a first step towards the implementation of marker-assisted selection (Spelman and Bovenhuis, 1998; Dekkers and Hospital, 2002). QTL studies may result in direct economic benefit for commercial populations (Boichard *et al.*, 2006). Several microsatellites have been characterized in South American camelids and are useful for studies of parentage analysis in Peruvian alpaca populations (Lang *et al.*, 1996; Penedo *et al.*, 1998a,b; Obreque *et al.*, 1999 and Agapito *et al.*, 2007). These microsatellite markers were also used with phylogenetic purposes to reveal common ancestors of the alpaca and llama (Kadwell *et al.*, 2001). Genealogical information is a tool to estimate the level or genetic diversity of a population, although when the information is not reliable we have to use molecular tools (Azor *et al.*, 2007). Fewer than 150 characterized microsatellite markers are published for alpacas (Lang *et al.*, 1996; McPartlan *et al.*, 1998; Obreque *et al.*, 1998, 1999; Penedo *et al.*, 1998a,b; Sarno *et al.*, 2000). More markers are

needed to create uniform coverage of the genome and thus facilitate accurate mapping of traits. Ihara *et al.* (2004) placed almost 4000 microsatellite markers into the bovine map to create a high density of genome coverage; and Watanabe *et al.* (1999) used over 5000 markers to form a radiation hybrid map of the mouse genome. A genome map will be a tool for future studies to develop genetic tests for disease as well as for coat colour and fiber quality (Munyard *et al.*, 2009). The genetic resources of domestic animals in developing countries are conditioned by the practices of the indigenous communities who manage their breeds according to their knowledge and in tune with the environmental constraints. Nevertheless, today traditional farming and global pressures are modifying the population structure conformed by the local producers. The results obtained in this type of studies should be spread to other similar communities in order to recover their ancient extreme quality fiber values (Wheeler *et al.*, 1995).

The aim of this research was to analyze the genetic and phenotypic variability of some Peruvian alpaca populations by means of microsatellite markers (genetic analysis) and fiber diameter measurement (phenotypic analysis). Both analyses offer the possibility for using this variability to improve and establish the possible relationships between quantitative and molecular variables.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study site

The present study was conducted in five populations of alpacas from two Peruvian high-Andean regions. The three alpaca populations from the Arequipa region (San Juan de Tarucani district, Arequipa province; Estación Pillones and

Chalhuanca communities from the Caylloma province) are placed inside the Salinas and Aguada Blanca National Reserve (SABNR) and the left two alpaca populations were sampled in the Puno Region (Lampa and Palca districts, placed in the Lampa province). The SABNR and the Lampa province have a dry Puna ecosystem, although, Lampa province has also semi-humid areas (Torres *et al.*, 2011). The five localities are situated at an altitude of 3500 to 4500 m above sea level and with temperatures reaching as low as -15 °C (UNIDO, 2010).

The SABNR has an extension of 366.936 ha. and contains 14 rural communities with a population of 6,779 people. The breeding of alpacas is their main activity; it represents 77% of the economic activities (Plan Maestro RNSAB, 2006). The high-Andean zones from the Arequipa and Puno regions have big populations of alpacas in Peru, 9.4% and 59.0% respectively (UNIDO, 2010). The geographical distribution of the five sampled populations is shown in Fig. 1.

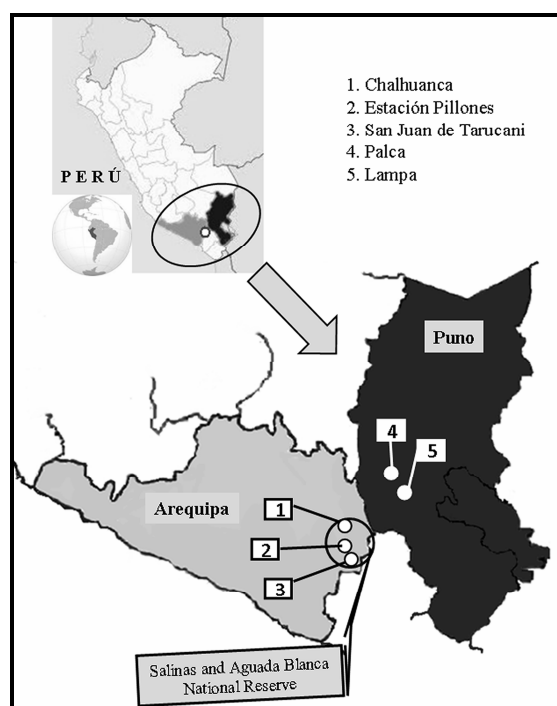


Fig 1. Geographical distribution of the five sampled alpaca populations in the Arequipa and Puno regions (Peru).

2.2. Biological samples

2.2.1. Fiber samples

For diameter measurement analyses, alpaca fiber samples were taken from five alpacas population of the Huacaya breed. A total of 272 fiber samples were taken from the San Juan de Tarucani (N=103), Estación Pillones (N=33), Chalhuanca (N=58), Lampa (N=44) and Palca (N=34) localities. The fiber samples belong to animal from the ages of 1 - 2 years (first shearing), both sexes (male and female) and obtained from the mid flank of each alpaca. Measurements were carried out using a Digital Image Analysis System (Nikon Eclipse 50i microscopy, model DS-Ri1 NIS-AR 3.0 software).

2.2.2. DNA samples

A total of 272 ear samples (male and female alpacas) were collected for the extraction of genomic DNA using a special ear tags (DNA Crotal, Allflex-Azasa, Spain). The tags were applied using a specific tagger plier as indicated by the manufacturer (Allflex-Azasa, Spain). A portion of 3mm diameter of ear sample was collected from each alpaca and only half a portion from this ear sample was used to obtain 100 µl genomic DNA (20ng/µl). A total of 103, 33, 58, 44 and 34 ear samples were collected from San Juan de Tarucani, Estación Pillones, Chalhuanca, Lampa and Palca localities respectively.

2.2.3. DNA extraction and PCR amplification

The genomic DNA from the ears was extracted using the i-genomic CTB[®] Kit following the manufacturer's protocol but in the lysis step, the incubation was carried out at 65°C for 24 hours. Twenty microsatellite loci previously designed for *Camelidae* species were amplified in the present study (Lang *et al.*, 1996; Obrique *et al.*, 1998 and 1999; Penedo *et al.*, 1998ab; Bustamante *et al.*, 2003; Sarno *et al.*, 2000; Mariasegaram *et al.*, 2002) (Table 1).

The microsatellites were amplified in six multiplex reactions. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 5min; 35 cycles of 94°C for 30s, annealing at 55.2 – 57.8°C for 90s, 72°C for 60s; an extension at 72 °C for 30 min and a final extension at 25 °C for 60 min. PCR reactions were performed in a Mastercycler Ep gradient (Eppendorf[®]) thermocycler. The total reaction volume of 25 µl contained approximately 20 ng of DNA. The final concentrations were: 10x reaction buffer, MgCl₂ 2.0 mM, dNTPs 4mM, Taq DNA polymerase 5U (BIOTOOLS B&M LABS S.A) and 5mM of each primer

(forward primers labeled with fluorochromes at its 5' end, 6-FAM, NED, PET and VIC). The PCR products were kept at -20°C. (Table 2).

The PCR reactions were run in an automated DNA sequencer (Applied Biosystems, ABI 3130 Avant). DNA fragments were scored with the aid of the Gene Mapper software (Version 4.01) (Applied Biosystems).

Table 1. Summary data of the 20 camelids microsatellites used in the present work.

Locus	Primer (5' - 3') Forward and Reverse	Size range (bp)	Reference	Alleles (n)
VOLP12	F:TTGTTCTCAACAGGGACTGC R:TCTGGCCCACTACTAA	136-148	Obreque et al.,1998	2
CVRL06	F:TTTTAAAAATTCTGACCAGGAGTCTG R:CATAATAGCCAAAACATGGAAACAAC	196-200	Mariasegaram et al., 2002	3
VOLP01	F:CCCATTGGCGATTATTTAGG R:AACAGGGGTAACAAACAGGAC	240-256	Obreque et al.,1999	5
LCA23	F:TCACGGCAAAGACGTGAATA R:CCAGGAAACACACACCCAC	131-159	Penedo et al., 1998a	11
LCA65	F:TTTTTCCCCTGTGGTTGAAT R:AACTCAGCTGTTGTCAGGGG	165-191	Penedo et al., 1998b	14
CVRL07	F:AATACCCTAGTTGAAGCTCTGTCCT R:GAGTGCCTTTATAAATATGGGTCTG	272-306	Mariasegaram et al., 2002	9
VOLP04	F:GCATTTCTCCGTAATCATTG R:TGACACCTTTTGTTCATT	226-258	Obreque et al.,1999	13
CVRL05	D:CCTTGGACCTCCTTGCTCTG R:GCCACTGGTCCCTGTCATT	155-176	Mariasegaram et al., 2002	6
CVRL01	F:GAAGAGGTTGGGGCACTAC R:CAGGCAGATATCCATTGAA	196-242	Mariasegaram et al., 2002	13
CVRL08	F:AATTCCTGTGATTTTATACACA R:CATGTCATGAAAGCTACAGTA	207-209	Mariasegaram et al., 2002	2

Table 1. Summary data of the 20 camelids microsatellites used in the present work.

Locus	Primer (5' - 3') Forward and Reverse	Size range (bp)	Reference	Allele s (n)
LGU56	F:TTGCTGTACCGGAGATGTTG R:TTGAGGCAAGAATGCAGATG	160-180	Sarno et al., 2000	5
LGU68	F:CATCTACATGCCCTGTGTG R:TGCAGGGAGGACTAACAGGT	209-221	Sarno et al., 2000	6
VOLP77	F:TATTTGGTGGTGACATT R:CATCACTGTACATATGAAGG	144-168	Obreque et al.,1999	11
LGU50	F:CTGCTGTGCTTGTCACCCTA R:AGCACCACATGCCTCTAAGT	185-195	Sarno et al., 2000	5
LGU49	F:TCTAGGTCCATCCCTGTTGC R:GTGCTGGAATAGTGCCAGT	224-248	Sarno et al., 2000	9
LCA71	F:CAGACATATACTGTATCCGTATCTA R:TTCAGTGTTTCCTCGCAATG	136-150	Penedo et al., 1998b	6
LAB1	F:AGAGGATCAATCCCTCTGAGAT R:ATTAGAGGCCAGTATAACAATC	161-181	Bustamante et al., 2003	9
LGU51	F:CCTTCCTCTTGCAAATCTGG R:GCACCTGATGTCATTTATGAGG	201-213	Sarno et al., 2000	5
YWLL08	F:ATCAAGTTTGAGGTGCTTTCC R:CCATGGCATTGTGTTGAAGAC	135-177	Lang et al .,1996	13
LGU79	F:TAAGGTAGGAGCGAGCCAAA R:ACCTGCTCGCTAATCTCTGC	198-224	Sarno et al., 2000	7

Table 2. Summary data for PCR conditions and fragment size ranges for the 20 microsatellites amplified in five populations of Peruvian alpacas studied in the present paper

Locus	Size range (bp)	Fluorescent dye	Anneling temperature (°C)	Multiplex PCR
VOLP12	151-163	PET	55.2	1
CVRL06	213-235	PET		
VOLP01	248-266	PET		
LCA23	127-157	6-FAM	55.2	2
LCA65	162-190	6-FAM		
CVRL07	269-283	PET		
CVRL01	168-236	VIC	55.8	3
VOLP04	219-253	6-FAM	55.2	
CVRL05	124-144	VIC		
CVRL08	199-213	NED		
LGU56	157-181	6-FAM	55.2	4
LGU68	202-230	6-FAM		
VOLP77	143-167	VIC		
LGU50	170-192	VIC	57.8	5
LGU49	220-244	VIC	55.2	
LCA71	132-148	NED		
LAB1	154-190	NED	55.2	6
LGU51	192-208	NED		
YWLL08	126-184	PET		
LGU79	197-223	PET		

2.3. Statistical analysis

The genetic variability in each population was measured using the number of alleles per locus, observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity (Nei, 1978), Hardy-Weinberg (HW) equilibrium based on 1000 permutations and the polymorphism information content (PIC) value. The Bonferroni correction was applied for multiple comparisons and data were analyzed using the CERVUS 3.0 software (Marshall *et al.*, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007). The

genetic bottleneck effect was inferred for the five populations using the mode shift analysis under the assumption of the two-phase model (TPM) with 90% stepwise mutation, implemented in the program BOTTLENECK ver. 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1996).

The statistical package GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) was used to estimate the fixation indices (F_{IS} , F_{ST} and F_{IT}) per locus and the genetic structure of the alpaca populations related to the differentiation within and between the studied alpaca populations. The fixation indices were calculated according to Weir and Cockerham (1984) with the Jackknife procedure applied over the loci and a confidence interval of 95% computed with 1000 bootstraps. The genetic structure of the alpaca populations was analyzed with Wright's F statistics using the pairwise distance (F_{ST}), inbreeding coefficients (F_{IS}) and gene flow (number of migrants in each generation, N_m). To evaluate the partitioning of genetic variability among and within the five population the hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was conducted using the software package GenAlEx v6.5 (Peakall and Smouse, 2012).

The PHYLIP 3.6 software (Felsenstein, 2004) was used to build the phylogenetic tree, based on the Reynold's genetic distance and using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The statistical package GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) was used to perform the correspondence multivariate analysis in order to investigate the relative positions of the alpaca populations, taking into consideration a likely occurrence admixture between some alpaca populations.

The genetic structure of the populations was investigated using the software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). The software infers the number of populations into which the analyzed genotypes can be divided, by

estimating the natural logarithm of the probability that a given genotype (X) is part of a given population (K): $\ln \Pr(X | K)$. In order to choose the appropriate number of inferred clusters (K) ten runs were performed, fitting K from 1 to 8 and at $K=10$. All runs used a burn-in period of 100000 iterations and a period of data collection of 300000 iterations.

The GLM procedure from SAS 9.0 (SAS Institute Inc., 2003) was applied to analyze the fiber diameter by means of an ANOVA and the subsequent DUNCAN test was used to detect significant associations between first-shearing fiber diameter and twenty microsatellite loci. The general linear model (PROC GLM) was used to calculate and separate means (DUNCAN test) and least square means for the main characteristic (fiber diameter) recorded in this study. The original linear model included three effects: marker microsatellite (20), sex (2) and population (5). Subsequently, the effects that were not significantly removed (sex and population) from the model, leaving the main effect (microsatellite marker).

3. RESULTS

3.1. Genetic variability

Twenty microsatellite markers were successfully amplified in the five Peruvian alpaca populations. A total of 230 alleles were observed from 272 DNA samples analyzed with 20 microsatellite loci across studied populations (Table 3). The number of alleles per locus varied from 5 (CVRL05) to 25 (YWLL08) with a global average of 11.5 alleles per locus. The majority of the markers were highly polymorphic, with two loci (CVRL01 and YWLL08) exhibiting more than 20 alleles. In contrast, only in four markers (CVRL05, CVRL08, LCA71 and VOLP12) less than 7 alleles were detected.

Table 3. Variability parameters. Total number of alleles detected per locus (n), total number of private alleles (PA), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), significance of Hardy–Weinberg equilibrium (HW) test and F -statistic (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) according to Weir and Cockerham (1984) values for 20 microsatellite markers analyzed in the five Peruvian alpaca populations from the regions of Arequipa and Puno

Locus	Alleles (n)	PA	H_O	H_E	HW	$F_{IS}(f)^a$	$F_{ST}(\theta)^a$	$F_{IT}(F)^a$
CVRL01	22	5	0.377	0.723	*** ⁽¹⁾	0.13608	0.02457	0.15730
CVRL05	5	1	0.537	0.530	NS	0.15847	0.02537	0.17982
CVRL06	8	0	0.344	0.392	NS	0.15354	0.02442	0.17421
CVRL07	8	0	0.193	0.802	***	0.11859	0.02358	0.13937
CVRL08	6	0	0.619	0.657	NS	0.15699	0.02513	0.17817
LAB1	18	1	0.650	0.822	***	0.14977	0.02459	0.17067
LCA23	13	0	0.691	0.882	***	0.14949	0.02396	0.16987
LCA65	15	1	0.815	0.868	NS	0.15848	0.02522	0.17971
LCA71	7	2	0.526	0.557	NS	0.15642	0.02492	0.17745
LGU49	13	0	0.822	0.853	NS	0.16031	0.02461	0.18097
LGU50	8	2	0.693	0.715	NS	0.15863	0.02548	0.18007
LGU51	8	0	0.698	0.725	NS	0.15863	0.02505	0.17971
LGU56	9	1	0.651	0.644	NS	0.16075	0.02404	0.18093
LGU68	10	0	0.684	0.705	NS	0.15864	0.02536	0.17997
LGU79	12	1	0.831	0.878	NS	0.15953	0.02454	0.18015
VOLP01	9	0	0.430	0.826	***	0.13533	0.02213	0.15447
VOLP04	16	1	0.837	0.866	NS	0.15985	0.02568	0.18142
VOLP12	7	0	0.694	0.746	NS	0.15734	0.02485	0.17828
VOLP77	11	0	0.781	0.848	***	0.15761	0.02463	0.17835
YWLL08	25	0	0.588	0.932	***	0.13839	0.02494	0.15988
Total	230	15						
Average	11.5		0.623	0.748		0.15252	0.02468	0.17353

⁽¹⁾* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ and ^{NS} $P \geq 0.05$ non-significant deviation

^a Jackknifing estimates over the loci

Over all populations seven microsatellites (CVRL01, CVRL07, LAB1, LCA23, VOLP01, VOLP77 and YWLL08) showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium. The lowest observed heterozygosity value

was 0.193 for the CVRL07 locus and the highest was 0.837 for the VOLP04 locus, with a mean heterozygosity value of 0.623. The expected values of heterozygosity ranged from 0.530 (CVRL05) to 0.932 (YWLL08) with a mean value of 0.748 for the 20 markers. The expected heterozygosity was higher than the observed heterozygosity within the five alpaca populations resulting in 7 loci that showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. The polymorphic information content (PIC) values ranged from 0.38 (CVRL05) to 0.92 (YWLL08), and the average value was 0.719 (data not shown).

Genetic variability within populations was relatively high as indicated from gene diversity measures (Table 4). San Juan de Tarucani and Chalhuanca populations exhibited the highest number of alleles (10.85 and 9.65 respectively), the Lampa population is the less diverse in terms of number of alleles (7.8). In total, 15 private alleles were observed, and these were distributed across 5 of the alpaca populations studies. The maximum number of private alleles was observed in the San Juan de Tarucani (10) followed by Pillones (2), Chalhuanca (2) and Lampa (1) populations. The observed heterozygosity (H_O) for the five populations ranged from 0.602 (Estación Pillones) to 0.633 (San Juan de Tarucani) whereas the gene diversity (mean H_E) values varied from 0.712 (Lampa) to 0.749 (Chalhuanca) (Table 4).

Table 4. Mean number of alleles (MNA), number of private alleles (PA), average expected (H_E) observed (H_O) heterozygosity and inbreeding coefficient (F_{IS}) for 20 microsatellite markers analyzed in the five alpaca populations from Arequipa and Puno regions.

Sampling location	Sample size	Total no. of alleles	MNA	PA	H_O	H_E	F_{IS}
Arequipa region							
San Juan de Tarucani	103	217	10.85	10	0.633	0.738	0.143
Estación Pillones	33	159	7.95	2	0.602	0.735	0.184
Chalhuanca	58	193	9.65	2	0.625	0.749	0.166
Puno region							
Lampa	44	156	7.80	1	0.606	0.712	0.150
Palca	34	169	8.45	0	0.629	0.716	0.123

The inbreeding coefficient (F_{IS}) was estimated for each locus in the total population (Table 3) and individually for each populations (Table 4). Table 3 showed the overall means of F_{IS} , F_{ST} and F_{IT} obtained from jackknifing over loci. For the individual markers the F_{IS} values were similar with a range from 0.118 (CVRL07) to 0.160 (LGU49). An overall deficit of heterozygotes (F_{IS}) of 15.2% had occurred in surveyed loci within the samples. Whereas the total alpaca populations (F_{IT}) exhibited 17.3%. Considering the individual populations, the lowest heterozygote deficit was observed in Palca (0.123) and the highest in Estación Pillones (0.184) (Table 4). The bottleneck analysis was performed for all five populations. The microsatellite data was subjected to mode shift test, under the assumption of the two-phase model to assess whether a decreasing in numbers had an impact on the maintenance of genetic variation

within these populations. The tests of Sign, Standardized differences and Wilcoxon, could not detect any significant departure from mutation-drift-equilibrium in the populations. The normal mode-shift had a normal L-shaped distribution (Fig. 2).

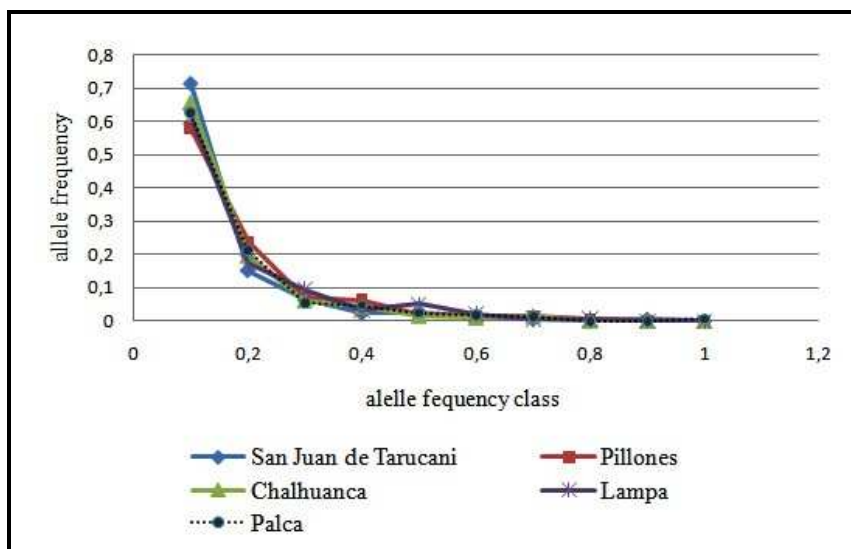


Fig. 2. Normal L-shaped curve revealing no mode shift and absence of genetic bottleneck in Huacaya and Suri alpaca breeds.

3.2. Genetic differentiation

The F_{ST} values and Nm for the pairs of the analyzed populations are showed in Table 5. Pair-wise genetic differentiation (F_{ST}) ranged from 0.012 between San Juan de Tarucani and Palca to 0.040 between Estación Pillones and Lampa populations. According to the global F_{ST} values, 2% of the genetic variation accounted for population differences and 98% for variation among individuals. The gene flow (Nm) between the alpaca populations ranged from 6.22 (between Lampa and Estación Pillones) to 19.66 (between Palca and San Juan de Tarucani). The hierarchical AMOVA revealed a low level of genetic

differentiation among the five alpaca populations ($F_{ST} = 0.021$). The analyses of variance showed higher value within populations (79%) than among populations (19%).

Table 5. F_{ST} estimates (above the diagonal) and Nm (below the diagonal) between the five alpaca populations from Arequipa and Puno regions.

Populations	San Juan de Tarucani	Estación Pillones	Chalhuanca	Lampa	Palca
San Juan de Tarucani	-	0.029	0.016	0.038	0.012
Estación Pillones	8.46	-	0.025	0.040	0.027
Chalhuanca	15.47	9.85	-	0.032	0.017
Lampa	6.56	6.22	7.65	-	0.032
Palca	19.66	9.21	14.05	7.71	-

The consensus phylogenetic tree (Fig. 3) showed a typology of three groupings according to the neighbor-joining method. The first group was formed by the Lampa alpaca population. The second group consisted of the Estación Pillones population. The third group was formed by three populations of alpaca (San Juan de Tarucani, Palca and Chalhuanca).

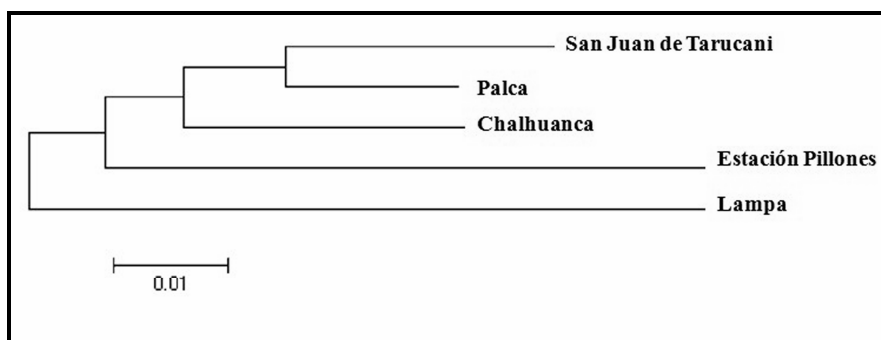


Fig. 3. Neighbor –joining dendrogram showing the genetic relationships among the five alpaca populations using Reynolds genetic distance.

According to the correspondence analysis, the first three components explain the 82.83% of the variation. The first axis explains the 36.13% of the total variation and separates the Lampa population from the other four populations. The second axis represents 26.05% of the total variation; this finding showed the isolation of the Estación Pillones alpaca population. In contrast, the third axis represents 20.65% of the total variation and regroups the remaining three alpaca populations (Palca, Chalhuanca and San Juan de Tarucani). In this last group, San Juan de Tarucani is discriminated from the two former populations (Fig. 4).

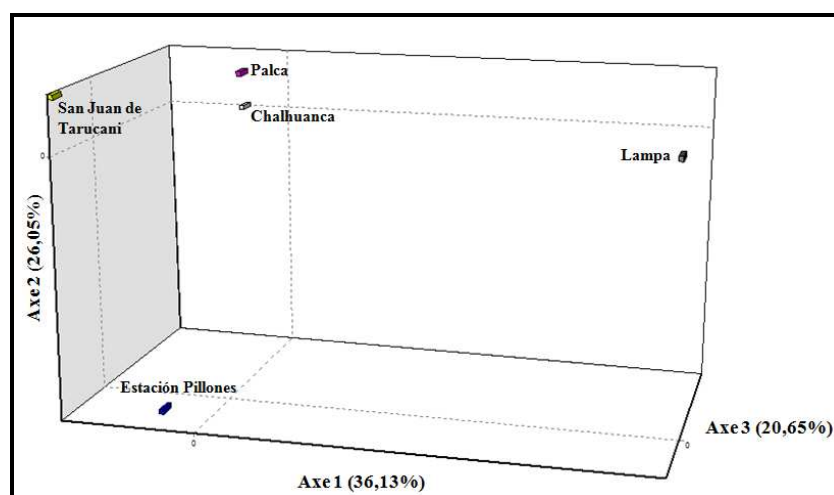


Fig. 4. Spatial representation of the populations as defined by the factorial correspondence analysis for the five alpaca populations.

According to the STRUCTURE analysis, the best value of $\ln \Pr(X | K)$ was obtained for $K = 5$. The graphical representation of the clustering outcomes that suggested $K = 5$ is showed in Fig. 5, whereas the proportion of

membership for each identified cluster is provided in Table 6. The analysis assigned to the San Juan de Tarucani, Estación Pillones, Chalhuanca, Lampa and Palca populations in five independent clusters, being Lampa (cluster 1) the most differentiated population, which is slightly influenced by the four left populations. The Palca population (cluster 4) showed the highest influence of the Chalhuanca and San Juan de Tarucani populations. The localities of Estación Pillones, San Juan de Tarucani, and Chalhuanca showed a mixed structure influenced by a certain membership proportion of the other clusters.

Table 6. Proportion of membership of each of the 5 alpaca populations in the fifth clustering using STRUCTURE software.

Population	Cluster				
	1	2	3	4	5
San Juan de Tarucani	0.087	0.203	0.349	0.197	0.165
Estación Pillones	0.111	0.300	0.110	0.135	0.344
Chalhuanca	0.107	0.166	0.143	0.257	0.327
Lampa	0.640	0.112	0.067	0.100	0.081
Palca	0.144	0.188	0.127	0.380	0.161

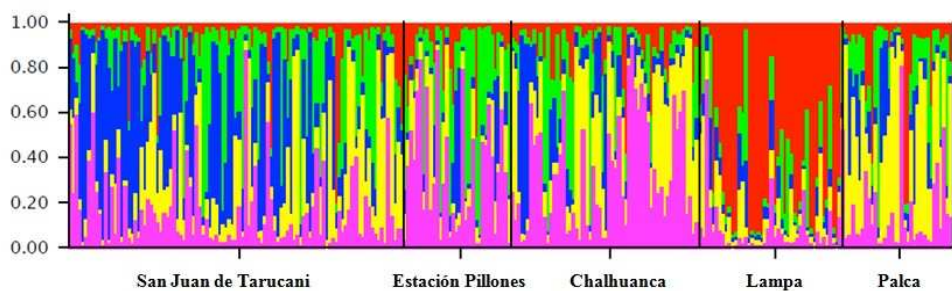


Fig. 5. Graphical representation of the clustering outcomes suggested by the structure analysis for K = 5.

The results of the ANOVA for fiber diameter showed that there were no significant differences among the five populations with respect to this quantitative trait, with an overall mean of 18.96 μm .

The DUNCAN test was applied to the detected significant associations between the fiber diameter of the first shearing and twenty microsatellite loci, in this case, the genotypes and alleles unique were eliminated. The present study found a significant association ($P \leq 0.05$) between the fiber diameter (thin-fiber) and alleles in the CVRL07, LGU68 and LCA65 microsatellite loci. The DUNCAN test results revealed the associations of the 273 and 269 alleles for the CVRL07 locus (16.1 μm and 18.2 μm , respectively), the 216 allele at the LGU68 locus (18.2 μm) and the alleles 168 and 180 at the LCA65 locus (18.2 μm and 18.4 μm , respectively).

4. DISCUSSION

The genetic diversity and structure of five Peruvian alpaca populations were evaluated using 20 microsatellite marker loci. The results revealed herein high levels of variability genetic. The majority of the markers were highly polymorphic. Barker (1994) suggests that in diversity studies, loci with at least four different alleles should be used in order to reduce the standard error of the estimated genetic distances. The total number of alleles per locus in the present study ranged from 5 to 25 and only two loci (CVRL05, CVRL08) showed 5 and 6 alleles, respectively. Mariasegaram *et al.* (2002) showed similar values for these loci in *Camelus dromedaries*. Low values of allelic variability were found herein comparable to the results showed by Barreta *et al.* (2012) on alpacas from Bolivia and similar or even higher than previous studies on different alpaca populations (Lang *et al.*, 1996; Obreque *et al.*, 1998 and 1999; Penedo *et al.*, 1998a,b; Bustamante *et al.*, 2003; Sarno *et al.*, 2000;

Mariasegaram *et al.*, 2002; Agapito *et al.*, 2007). In some of these previous studies the sample sizes were lower than 70 animals. The five sampled alpaca populations showed a higher allelic diversity and average number of alleles per locus.

Takezaki and Nei (1996) showed that optimal markers for measuring genetic variation in a population should have an average of heterozygosity ranging from 0.3 to 0.8. In the present study, the measured genetic variation indicated a high level (0.748) in the five sampled alpaca populations. Seven markers showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium, caused by a defect of heterozygotes. Mariasegaram *et al.* (2002) indicated that differences between the observed and expected heterozygosity may be related to the presence of null alleles and specifically could be caused by the CVRL05 locus. Nevertheless this locus is in Hardy-Weinberg equilibrium in all the five populations of Peruvian alpacas sampled in the present study. Natural selection is discarded as a directional agent acting on the alpacas populations as the Hardy-Weinberg disequilibrium is always detected as a defect of heterozygotes. This deviation may be the result of the Wahlund effect as the alpaca samples were pooled from different subpopulations in the present study.

The alpaca populations of San Juan de Tarucani and Chalhuanca showed the highest genetic diversity based on the number of alleles. Nei (1987) showed the gene diversity as a more appropriate measure of genetic variation within populations. A high gene diversity was also observed in Chalhuanca and San Juan de Tarucani populations.

The high genetic diversity was also observed in other alpaca populations from Peru (Agapito *et al.*, 2007), Bolivia (Barreta *et al.*, 2012), Australia (Munyard *et al.*, 2009) and USA (Sarno *et al.*, 2000; Mariasegaram *et al.*, 2002). The values of the observed and expected heterozygosity varied among

populations, and the observed heterozygosity was always lower than the expected one. The majority of the loci in all the alpaca populations showed heterozygote deficiency. The heterozygote deficiency observed in the majority of loci may be related to the management conditions of the flocks. Most of breeders, especially from SABNR, used their male alpacas and the community male alpacas for crossbreeding. The absence of genetic bottleneck was found in the five investigated populations, this result revealed no loss of alleles, thus the selection practices performed by alpaca breeders did not appear to have a deleterious effect in the genetic resources of the populations.

The moderate value of F_{IS} (0.15) suggested heterozygote deficit on the loci in the total populations. This may be a result of mating between relatives. Null alleles are most unlikely to be segregating at all the loci (Dixit *et al.*, 2010). Therefore, related populations (Estación Pillones, Chalhuanca and Lampa) could be the most reasonable causes of heterozygote deficit. Agapito *et al.* (2007) reported similar results with an observed heterozygote deficit in other Peruvian alpaca populations.

The measurement of genetic differentiation (F_{ST}) among the populations revealed a low level (2%), this implicated that 98% of the genetic variability of the studied alpacas was related to differences among the individuals within the populations. These results were supported by the analysis of molecular variance, being the highest genetic variation for the within populations component (79%), whereas the genetic variation among populations was 2.1%. The low genetic differentiation among the alpaca populations suggests that they may have common breeding practices. The results across five alpaca populations revealed that the Lampa population showed the highest value of pair-wise F_{ST} and the lowest value of N_m with other alpaca populations, indicating that this alpaca population has maintained an important genetic

isolation from the populations of Estación Pillones, Juan de Tarucani, Palca and Chalhuanca.

The Lampa alpacas were the most differentiated population which also indicated the lowest value of N_m compared with the other populations. This was confirmed by the NJ tree and PCA that exhibited the same pattern of clustering (Lampa; Estación Pillones; Palca, Chalhuanca and San Juan de Tarucani). The phylogenetic analysis and PCA plot could not cluster the alpaca populations per geographical location. Both analyses indicated relatively high levels of sharing of the gene pool between the alpaca populations of Palca, Estación Pillones and San Juan de Tarucani, where, the three alpaca populations were clustered together, although, the San Juan de Tarucani population was discriminated from the two other alpaca populations. The structure analysis confirmed the previous analyses. The five populations are not genetically differentiated, although Lampa was the most differentiated population among the studied populations.

This sharing of the gene pools may be related to the trading of reproductive male alpacas from the Palca district (Lampa province) to the localities of Chalhuanca and San Juan de Tarucani. This introduction of alpacas to Chalhuanca and San Juan de Tarucani, began approximately 14 years ago with projects of Public Institutions and Non-Governmental Organizations from Peru, to improve the quality of the flocks. It is well-known that the Puno Region breeders and, consequently those from Lampa province, have alpaca herds with thin fiber and the exchange of alpacas between these localities does not affect their productivity.

The results of phenotypic analysis indicated that there were no differences between the five alpaca populations. This suggests that the producers of these communities use similar methods for the alpaca selection.

The mean value of the fiber diameter (18.96 μm) found for the five populations is considered good by textile industry standards (McGregor, 2006). Similar results were showed in other Peruvian alpaca populations of first shearing: 22.9 μm (Braga *et al.*, 2006) and 19.67 μm (Paredes *et al.*, 2011). Nevertheless higher values were found in others alpaca populations of different ages: 29.9 μm for 2-3 years old alpacas from Australia (McGregor, 2006), 30.0 μm . for 2 years old from New Zealand (Wuliji *et al.*, 2000) and 27.85 μm . for 1 to ≥ 2 years old from USA (Lupton *et al.*, 2006).

The DUNCAN test found a significant association between the fiber diameter (thin-fiber) and some molecular markers in the total population. Nevertheless, we understand these associations between the thin fiber and some microsatellite alleles are just a spurious genetic association and consider that further studies with higher sample size and microsatellite number are needed to confirm the results. At present, there are no studies in the alpaca population that associates the microsatellite markers with the production traits of the fiber diameter described; these results are the first communication about these associations. An important future goal would be to confirm the possible association observed between thin-fiber with the microsatellite loci CVRL07, LGU68 and LCA65.

The incomplete coverage of the alpaca genome map and the non-chromosomal location of the microsatellite markers do not facilitate the mapping of genes associated with production traits. But many more markers are needed to saturate the genome. Around one hundred and fifty microsatellite markers of the alpaca are published (Munyard *et al.*, 2009). However, to create a high density of genome coverage, were placed almost 4000 microsatellite markers in the bovine (Ihara *et al.*, 2004) and the mouse (Watanabe *et al.*, 1999).

The fiber diameter is one of the traits of interest in the alpaca production, but other important traits are also being investigated. The study performed by Allain and Renieri (2010) indicated that there are many traits in the alpaca controlling the fiber quantity and fiber quality. Studies have been performed for the identification of genes associated with the colour of fleece (Cransberg and Munyard, 2011), and major genes affecting the fiber traits also were studied (Pérez-Cabal *et al.*, 2010). On the other hand, in sheep wool some genes have been identified for important traits influencing pigmentation, the wool quality and keratin protein (Sponenberg, 1997; Renieri *et al.*, 2008; Beraldi *et al.*, 2006; Itenge-Mweza *et al.*, 2007).

The high challenge for the molecular genetic studies is that its cost can be accessible to the alpaca breeders from the high Andean communities of Peru. One advantage of using these molecular tools is that the response time to the selection decreases, since the use of these analyses allows selection of the best parentales even before seeing their phenotypic response, and thus reduce the time to obtain results in improving production traits.

5. CONCLUSIONS

The high levels of genetic variability in the five alpaca populations from the Peruvian Puna showed by the allele number, genetic diversity and the moderate F_{IS} values allows us to inform on the rich genetic resources remaining in these five environments. The multivariate and phylogenetic analyses of the microsatellite genotype revealed the traditional net of managing practices between breeders that is confirmed by the relative homogeneity among populations.

The finding of the possible association between thin-fiber trait and the alleles at the CVRL07, LGU68 and LCA65 microsatellite loci, encourages us

to search for consistent associations by increasing the saturation of the alpaca genome. The results suggest an possible association and further studies in this trait (fiber diameter) would be needed to confirm these results and thus locate the possible associated QTL.

ACKNOWLEDGMENT

The present study was partially funded by the Vicerrectorado de Internacionalización y Cooperación Internacional of University of Córdoba, Spain, and by the Diputación de Córdoba. The authors specially thank the alpaca breeders for their significant support to this work, and are also grateful to the Regional South Program from Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo DESCOSUR, Peru.

CAPITULO III

Diversidad genética y asociación de marcadores microsatélites con
el carácter del diámetro de la fibra en alpacas Peruanas
(*Vicugna pacos*)

Enviado como: Marcia Marisol Paredes, Alberto Membrillo, Juan Pablo Gutiérrez, Isabel Cervantes, Pedro Javier Azor, Renzo Morante, Antonio Molina, Andrés Muñoz-Serrano. 2012. Genetic diversity and association of microsatellite markers with traits affecting fiber diameter in Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*). Journal Genetic Selection Evolution.

Abstract

A population of Peruvian alpacas composed of two breeds (Huacaya and Suri) was provided by the Pacamarca S.A. experimental farm. A total of 140 alpacas was analysed at 69 microsatellite markers in order to estimate the genetic variability and the association of loci which affect some alpaca fiber traits. A total of 599 alleles were observed from 140 DNA samples across the two breeds, with a global average of 8.68 alleles per locus. Average gene diversity on the whole population was 0.701, both breeds exhibiting similar values of 0.686 (Suri) and 0.695 (Huacaya). The values of the inbreeding coefficient (F_{IS}) for both breeds were 0.154 (Suri) and 0.162 (Huacaya). The bottleneck analysis was performed for the two breeds, wherein the occurrence of a normal curve L-shaped in both breeds revealed no loss of alleles in these populations, an absence of a genetic bottleneck is observed. According to the global F_{ST} values, the 2.2% of the genetic variation was accounted by the breed differences and the 97.8% for the variation among individuals. The gene flow (Nm) value between both breeds was 9.31. These results were supported by the hierarchical AMOVA that showed the higher genetic variation within populations (78%). Meanwhile the factorial correspondence analysis indicated low genetic differentiation between the two breeds, being the 6.81% the total genetic variation. The correct assignment percentage (CAP) suggested that most of individuals for both breeds Huacaya (100%), and Suri (97%) were correctly classified into their original populations (the Huacaya and Suri breed). The dendrogram obtained by the UPGMA method showed the association of the LCA68, GLM6, LGU50, VOLP59, LCA85 and LCA90 microsatellite markers closest to the two quantitative traits (fiber diameter and comfort factor). The DUNCAN test found associations between the fiber diameter trait as well as the indexed genetic values for four loci. Fifteen out of

nineteen alleles from the following loci LCA68 (199, 189, 201, 197, 203 and 205), VOLP59 (112 and 110), LCA90 (243, 229 and 227), GLM6 (143, 155, 151 and 157), showed negative indexed genetic values (decreasing fiber diameter), and only four alleles for the following loci LCA68 (195), LCA90 (231 and 249) and GLM6 (153) gave a positive genetic value (increasing fiber diameter, μm)

Short title: Microsatellite markers, alpaca, fiber traits, major gene

1. Introduction

The livestock production in the high-Andean zones of Peru is based on the domestic South American camelids breeding (alpacas and llamas). Two alpaca breeds (Huacaya and Suri) are the main breeding in this area. The Huacaya breed represents more than 85% of the alpaca population of Peru (Quispe *et al.*, 2009). Nowadays, the alpaca fiber is the most demanded product by the textile industry. One of the main goals in the alpaca breeding is the selection for the fiber diameter (thinner fiber), although other important traits are also being investigated. The study performed by Allain and Renieri (2010) indicated that there are many factors controlling the fiber quantity and fiber quality in alpacas as well as in some studies that have been carried out for the identification of genes associated with the color of fleece (Cransberg and Munyard, 2011).

The microsatellite markers are the best tool for, among others, the genetic identification, molecular relationships, parentage testing in breeds and the development of genomic maps used to localize loci associated to productive traits (Aranguren and Jordana, 2001). QTL studies using commercial populations may result in direct economic benefit as the results can be used immediately on the target population (Boichard *et al.*, 2006). At present, the knowledge of genetic markers and the linkage maps on sheep and cattle (Maddox *et al.* 2001; Ihara *et al.*, 2004) allowed the identification of quantitative trait loci (QTL) that explain a significant fraction of genetic variance in the phenotypes of interest (Weller, 2001).

QTL mapping opens the possibility of studying genes and causal polymorphisms for traits of agronomic importance (Seaton *et al.*, 2002). Previous studies focused on sheep crossbred and outbred populations found evidence of QTL associated to wool traits. QTL related to the staple strength, staple length, fiber diameter and coefficient of variation of the fiber diameter were detected on sheep (Rogers *et al.*, 1994; Allain *et al.*, 2006; Bidinost *et al.*,

2008; Itenge-Mweza *et al.*, 2007; Parsons *et al.*, 1994; Ponz *et al.*, 2001). In alpaca populations, spurious genetic associations of microsatellite markers with the fiber diameter were recently revealed (Paredes, *et al.*, in press). Around one hundred and fifty microsatellite markers of the alpaca are published (Munyard *et al.*, 2009) although many more markers are needed to saturate the genome. However, to create a high density of genome coverage, were placed almost 4000 microsatellite markers in bovine (Ihara *et al.*, 2004) and mouse (Watanabe *et al.*, 1999) species.

The study performed by Pérez-Cabal *et al.* (2010) in alpaca populations (*Vicugna pacos*) from the Huacaya and Suri breeds, reported for the first time the segregation of major genes that may be affecting the fiber traits: Mean Fiber Diameter (MFD), Standard Deviation of Fiber Diameter (SDFD), Variation Coefficient of Fiber Diameter (CVFD) and Comfort Factor (CF). The study indicated that two major genes may be involved, one major gene affecting the fiber diameter (FD and CF), and the second major gene affecting the diameter variability (SDFD and CV). The alpaca population used by Pérez-Cabal *et al.* (2010) was selected for the present study.

The objective of this work was the analysis of genetic variability and the association among 69 microsatellite markers and the fiber diameter from a Peruvian alpaca population already typified for segregating major genes affecting some fiber traits consisted of two breeds Huacaya and Suri.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The animals sampled for this study were selected following a selective genotyping strategy by taking the animals exhibiting the highest and the lowest

probability of being homozygotes for a hypothetical beneficial allele reducing the fiber diameter according to the results obtained by Pérez-Cabal *et al.* (2010). The alpacas were owned by the Pacamarca S.A. research farm located in the department of Puno in Southeast Peru, placed on the Altiplano at an altitude of 4,060 m above sea level where the temperature can decrease to -15° C (Gutiérrez *et al.*, 2009).

The alpaca breeding program implemented by Pacamarca S.A. started in 1992 and one of the main goals was to decrease the fiber diameter of the Peruvian alpacas. This research farm has developed a selection program for the Huacaya and Suri breeds using a textile value index as the selection criterion and its alpaca flocks are becoming elite alpacas in Peru (Pérez-Cabal *et al.*, 2010).

2.2. Collected phenotypic data

The phenotypic data (fiber diameter) used in this work belonged to the previous studies carried out by Pérez-Cabal *et al.* (2010) and Cervantes *et al.* (2010). The traits studied by Pérez-Cabal *et al.* (2010) were the Fiber Diameter (FD) measurement in microns, the Standard Deviation of Fiber Diameter (SDFD), the Coefficient of Variation of Fiber Diameter (CVFD) and the Comfort Factor (CF). The study showed the segregation of major genes affecting these traits (FD, SDFD, CV and CF) of the fiber in which two major genes may be involved. The fiber diameter and the comfort factor would be affected by one major gene, and on the other hand, the diameter variability (SDFD and CV) may depend on a second major gene. The data of the genetic value for each alpaca and measurement of the fiber diameter used in this work belong to the study of Cervantes *et al.* (2010).

The present study has been performed using the following three dataset: the probability of a major gene affecting two traits, i.e. the fiber diameter (FD) and the comfort factor (CF), the measurements of the diameter fiber and the genetic value. A total of 140 phenotypic data was used for both alpaca breeds, Huacaya (N=74) and Suri (N=66) corresponding to 46 and 42 animals carrying the major gene for the fiber diameter trait respectively.

2.3. Genomic DNA preparation

The 140 blood samples were collected by vein puncture on filter paper; five drops of blood per animal and each drop had a size of 2 cm. One drop was used to obtain 100 μ l genomic DNA (20ng/ μ l approximately). The blood samples on filter paper were kept at -4° C.

The genomic DNA was extracted using the i-genomic CTB[®] Kit, following the manufacturer's protocol. In the lysis step however, the incubation was carried out at 65° C for 2 hours and 15 minutes.

2.4. Microsatellite typing

A total of 69 microsatellite markers previously reported in South American camelids (Lang *et al.*, 1996; Obrique *et al.*, 1998, 1999; Penedo *et al.*, 1998a,b, and 1999; Bustamante *et al.*, 2003; McPartlan *et al.*, 1998; Sarno *et al.*, 2000) and *Camelus dromedarius* (Mariasegaram *et al.*, 2002) were used in this study. See table 1 for details about microsatellite markers references and sequences.

The microsatellite markers were amplified in 22 multiplex reactions. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95° C for 5 minutes, followed 35 cycles of 94° C for 30 seconds, annealing at 55,2 - 57,8°C for 90 seconds and at 72° C for 60 seconds, an extension of 72 °C for 30 minutes and

a final extension of 25 °C for 60 minutes. The PCR reactions were performed in a Mastercycler Ep gradient thermocycler (Eppendorf®). The total reaction volume of 25 µl contained approximately 20 ng of DNA. The final concentrations were 10× reaction buffer: 2.0 mM of MgCl₂, 4 mM of dNTPs, Taq DNA polymerase 5U (BIOTOOLS B&M LABS.S.A) and 5 mM of each primer (forward primers labeled with fluorochromes at its 5'end, 6-FAM, NED, PET and VIC). The PCR products were kept at -20°C. See supplemental Table 1 for details about the PCR conditions and fragment size ranges for the 69 microsatellite markers used in this study.

The PCR reactions were run in an automated DNA sequencer (Applied Biosystems, ABI 3130 Avant). DNA fragments were scored with the aid of the Gene Mapper software (Version 4.01, Applied Biosystems).

Table 1. Summary data for PCR conditions and fragment size ranges of 69 microsatellite markers, amplified in two breeds (Huacaya and Suri) of Peruvian alpacas.

Locus	Size range (bp)	Fluorescent dye	Annealing temperature (°C)	Multiplex PCR
LCA68	188-206	VIC	55,2	1
YWLL59	91-132	NED		
LGU75	178-197	NED		
YWLL46	84-109	VIC	55,2	2
VOLP68	133-146	VIC		
YWLL43	138-150	PET		
YWLL36	142-175	6-FAM		
YWLL29	210-224	6-FAM	55,2	3
YWLL44	80-119	6-FAM		
YWLL38	171-178	VIC		
LCA19	76-113	6-FAM	55,2	4
LCA54	139-151	6-FAM		
LGU93	183-211	6-FAM		
LCA77	233-264	PET		
VOLP72	163-176	VIC	55,2	5
LCA66	216-258	VIC		
LCA22	101-115	NED	55,2	6
LCA63	192-219	NED		
LCA82	103-120	PET		
LCA85	192-209	PET		
LCA33	118-122	6-FAM	55,2	7
LCA86	162-168	6-FAM		
YWLL40	174-187	6-FAM		
LCA90	224-251	6-FAM		
LCA37	124-156	NED	55,2	8
LCA36	201-206	NED		
LCA8	223-249	NED	55,2	9
LCA56	129-165	PET		
LGU52	179-205	PET		
VIAS A1	137-144	VIC	55,2	10
VIAS A2	194-203	VIC		
VOLP59	103-134	NED		
VOLP67	145-163	NED		

Table 1. Summary data for PCR conditions and fragment size ranges of 69 microsatellite markers, amplified in two breeds (Huacaya and Suri) of Peruvian alpacas.

Locus	Size range (bp)	Fluorescent dye	Annealing temperature (°C)	Multiplex PCR
LAB13	178-187	NED	55,2	11
LAB7	140-166	PET		
VOLP33	176-184	PET		
LCA83	190-209	PET		
VOLP10	228-234	PET	55,2	12
VOLP03	128-166	6-FAM		
VOLP32	185-247	6-FAM		
VOLP12	151-163	PET	55,2	13
CVRL06	213-235	PET		
VOLP01	248-266	PET		
LCA23	127-157	6-FAM	55,2	14
LCA65	162-190	6-FAM		
CVRL01	168-236	VIC	55,8	15
CVRL05	124-144	VIC	55,2	
VOLP04	219-253	6-FAM		
CVRL08	199-213	NED		
LGU76	232-265	PET	55,2	16
LAB3	106-162	6-FAM		
GLM5	142-168	VIC	55,2	17
GLM7	185-207	VIC		
GLM2	130-135	NED	55,2	18
GLM6	149-158	NED		
GLM4	181-208	NED		
LGU56	157-181	6-FAM	55,2	19
LGU68	202-230	6-FAM		
VOLP77	143-167	VIC		
LGU50	170-192	VIC	57,8	20
LGU49	220-244	VIC	55,2	
LCA71	132-148	NED		
LAB1	154-190	NED	55,2	21
LGU51	192-208	NED		
YWLL08	126-184	PET		
LGU79	197-223	PET		
LCA24	100-119	VIC	55,2	22
LCA94	184-203	VIC		
LCA5	176-205	6-FAM		

2.5. Statistical analysis

The genetic variability in the total population and in each breed was measured using the number of alleles per locus, the observed (H_O) and the expected (H_E) heterozygosity (Nei, 1978), the Hardy-Weinberg (HW) equilibrium based on 1000 permutations, the Polymorphism Information Content (PIC) value and the allele frequency values. The data were analyzed using the CERVUS 3.0 software (Marshall *et al.*, 1998; Kalinowski *et al.*, 2007). The genetic bottleneck effect was inferred for the two populations using the mode shift analysis under the assumption of the two-phase model (TPM) with 90% stepwise mutation, implemented in the program BOTTLENECK ver. 1.2.02 (Cornuet and Luikart, 1996). The statistical package GENETIC 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) was used to estimate the fixation indices, (F_{IS} , F_{ST} and F_{IT}) per locus and to determine the population genetic structure related to the differentiation within and between the studied alpaca breeds. The fixation indices were calculated according to Weir and Cockerham (1984) with the Jackknife procedure applied over the loci with a confidence interval of 95% computed with 1000 bootstraps.

The genetic structure of the alpaca populations was analyzed with Wright's F -statistics (Wright, 1965) using the Pairwise distance (F_{ST}), the inbreeding coefficients (F_{IS}) and the gene flow (number of migrants in each generation, N_m). To evaluate the partitioning of genetic variability between and within the two breeds the hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was conducted using the software package GenAlEx v6.5 (Peakall and Smouse, 2012). The statistical package GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) was also used to perform the correspondence analysis in order to investigate the relative positions of the alpaca breeds.

The multilocus genotypes were used to analyze the Correct Assignment Percentage (CAP) in order to know the accurate assignment of individual animals to their respective populations using the GENECLASS2 software (Piry *et al.*, 2004). In the present study two different assignment tests were implemented: assignment using the Bayesian approach (Rannala and Mountain, 1997) and assignment based on the actual genotype data and simulated genotypes of 10,000 individuals using the Monte-Carlo resampling algorithm deduced by Paetkau *et al.* (2004).

The association analyses between 69 microsatellite markers with two traits, the fiber diameter and the comfort factor were performed. The associations were made with the estimations of genetic distance using the allelic frequencies of the 69 microsatellite markers and the two quantitative traits (fiber diameter and comfort factor), following the methodology of Reynolds *et al.* (1983). These distances were calculated taking the two alpaca breeds as a single population. The matrix was constructed with the estimate of the genetic distances, D_A of Nei and Takezaki (1994) obtained from the data of the Pearson correlation coefficients of each microsatellite marker and traits. Based on the matrix of the D_A of the total population, a phylogenetic tree was constructed by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) using the NEIGHBOR program in the PHYLIP software package, version 3.65 (Felsenstein, 1985). The Gram-view computer program was used to draw the dendrogram presentation.

The GLM procedure from SAS 9.0 (SAS Institute Inc., 2003) was applied to analyze the genetic value and the fiber diameter measurement (μm) by means of an ANOVA. The general linear model was used to calculate and separate means (DUNCAN test) and least square means, wherein the effects were the microsatellite marker (6) and the breed (2). Subsequently, the breed

effect was removed from the model due to that was not significant, leaving the main effect (microsatellite marker). The DUNCAN test was used to detect significant associations between the genetic value and the mean measurement of the fiber diameter using six microsatellite loci.

The BLUP values obtained with the Pacamarca S.A. dataset updated at December 31, 2011, and according to the model reported by Cervantes *et al.* (2010) were used as dependent variable. These breeding values were rescaled to a mean value of 100 and standard deviation of 20 to jointly analyze both breeds. The former additive genetic variances for the fiber diameter were 5.4819 in Huacaya breed and 3.0180 in Suri breed, and these variances for comfort factor were 63.7504 and 33.8255 respectively for Huacaya and Suri breeds (Perez-Cabal *et al.*, 2010).

3. Results

3.1. Genetic variability

Sixty nine microsatellite markers were successfully amplified in the two Peruvian alpaca breeds (see table 2).

Table 2. Variability parameters for 69 microsatellite loci in the total population of alpacas sampled in the Pacamarca S.A. research farm. Total number of alleles detected per locus (n), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E), polymorphic information content (PIC), significance results of Hardy–Weinberg equilibrium (HW) tests and F –statistic (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}).

Locus	Alleles (n)	H_o	H_E	HW	PIC	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
CVRL01	11	0.466	0.631	NS	0.604	0.15989	0.17890	0.02263
CVRL05	5	0.529	0.547	NS	0.467	0.16272	0.18163	0.02259
CVRL06	9	0.261	0.343	NS	0.331	0.16073	0.17947	0.02232
CVRL08	6	0.629	0.649	NS	0.608	0.16300	0.18199	0.02269
GLM2	3	0.014	0.056	NS	0.055	0.16051	0.17935	0.02244
GLM4	12	0.783	0.831	NS	0.806	0.16350	0.18166	0.02171
GLM5	10	0.340	0.861	NS	0.841	0.15306	0.17230	0.02271
GLM6	8	0.650	0.771	NS	0.731	0.16138	0.18024	0.02249
GLM7	8	0.754	0.781	NS	0.749	0.16337	0.18228	0.02261
LAB1	12	0.588	0.776	NS	0.754	0.16008	0.17880	0.02229
LAB13	4	0.266	0.533	***	0.421	0.15778	0.17604	0.02169
LAB3	20	0.341	0.929	NS	0.919	0.15193	0.17106	0.02255
LAB7	9	0.654	0.792	NS	0.761	0.16119	0.17987	0.02226
LCA19	10	0.564	0.756	NS	0.717	0.15992	0.17861	0.02224
LCA22	6	0.591	0.610	NS	0.541	0.16299	0.18178	0.02244
LCA23	11	0.598	0.852	NS	0.830	0.15919	0.17742	0.02168
LCA24	8	0.568	0.571	NS	0.541	0.16307	0.18209	0.02273
LCA33	2	0.179	0.163	NS	0.149	0.16218	0.18082	0.02225
LCA36	3	0.485	0.540	NS	0.444	0.16186	0.18089	0.02270
LCA37	11	0.746	0.863	***	0.845	0.16171	0.18076	0.02273
LCA5	10	0.638	0.762	NS	0.723	0.16136	0.18006	0.02230
LCA54	6	0.580	0.736	NS	0.689	0.16042	0.17947	0.02269
LCA56	9	0.693	0.705	NS	0.670	0.16348	0.18225	0.02245
LCA63	8	0.730	0.722	NS	0.673	0.16390	0.18282	0.02263
LCA65	13	0.850	0.879	NS	0.864	0.16394	0.18235	0.02201
LCA66	16	0.833	0.865	NS	0.849	0.16365	0.18243	0.02246
LCA68	9	0.531	0.817	**	0.791	0.15798	0.17699	0.02258
LCA71	5	0.504	0.516	NS	0.443	0.16273	0.18163	0.02257
LCA77	11	0.639	0.815	**	0.787	0.16062	0.17903	0.02194
LCA8	8	0.862	0.840	NS	0.816	0.16451	0.18362	0.02286
LCA82	6	0.602	0.575	NS	0.528	0.16372	0.18268	0.02268
LCA83	7	0.692	0.740	NS	0.695	0.16270	0.18180	0.02281
LCA85	9	0.669	0.843	**	0.819	0.16073	0.17921	0.02203
LCA86	3	0.607	0.589	NS	0.514	0.16383	0.18235	0.02214
LCA90	9	0.410	0.763	***	0.728	0.15645	0.17534	0.02239
LCA94	8	0.813	0.810	NS	0.779	0.16411	0.18301	0.02262
LGU49	12	0.801	0.851	NS	0.831	0.16323	0.18200	0.02243

Table 2. Variability parameters for 69 microsatellite loci in the total population of alpacas sampled in the Pacamarca S.A. research farm. Total number of alleles detected per locus (n), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E), polymorphic information content (PIC), significance results of Hardy–Weinberg equilibrium (HW) tests and F –statistic (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}).

Locus	Alleles (n)	H_o	H_E	HW	PIC	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
LGU50	6	0.662	0.676	NS	0.614	0.16352	0.18192	0.02200
LGU51	8	0.761	0.764	NS	0.728	0.16374	0.18279	0.02279
LGU52	6	0.562	0.607	NS	0.566	0.16238	0.18128	0.02257
LGU56	6	0.664	0.659	NS	0.615	0.16374	0.18241	0.02233
LGU68	9	0.710	0.699	NS	0.663	0.16413	0.18256	0.02205
LGU75	9	0.504	0.643	NS	0.618	0.16047	0.17951	0.02268
LGU76	12	0.533	0.758	**	0.729	0.15914	0.17802	0.02246
LGU79	12	0.861	0.882	NS	0.867	0.16394	0.18272	0.02246
LGU93	13	0.827	0.848	NS	0.828	0.16379	0.18261	0.02250
VIAS A1	3	0.329	0.375	NS	0.330	0.16190	0.18005	0.02166
VIAS A2	4	0.427	0.575	NS	0.489	0.16012	0.17901	0.02249
VOLP01	8	0.358	0.778	***	0.742	0.15527	0.17382	0.02196
VOLP03	6	0.765	0.775	NS	0.736	0.16374	0.18259	0.02253
VOLP04	15	0.707	0.857	NS	0.842	0.16101	0.18000	0.02264
VOLP10	3	0.294	0.538	***	0.445	0.15781	0.17697	0.02275
VOLP12	6	0.669	0.750	NS	0.707	0.16232	0.18085	0.02211
VOLP32	21	0.630	0.859	NS	0.842	0.15932	0.17836	0.02265
VOLP33	4	0.457	0.581	NS	0.511	0.16060	0.17952	0.02254
VOLP59	6	0.564	0.602	NS	0.536	0.16252	0.18140	0.02255
VOLP67	6	0.391	0.641	***	0.584	0.15821	0.17710	0.02243
VOLP68	7	0.415	0.547	NS	0.513	0.16024	0.17931	0.02271
VOLP72	6	0.404	0.821	***	0.792	0.15509	0.17444	0.02290
VOLP77	10	0.763	0.858	NS	0.839	0.16240	0.18099	0.02220
YWLL08	25	0.540	0.926	NS	0.918	0.15623	0.17532	0.02262
YWLL29	7	0.613	0.624	NS	0.595	0.16313	0.18209	0.02266
YWLL36	12	0.766	0.853	NS	0.833	0.16233	0.18129	0.02263
YWLL38	4	0.727	0.722	NS	0.669	0.16397	0.18260	0.02228
YWLL40	7	0.629	0.666	NS	0.603	0.16285	0.18155	0.02234
YWLL43	6	0.300	0.630	***	0.570	0.15636	0.17547	0.02265
YWLL44	14	0.778	0.868	NS	0.850	0.16247	0.18118	0.02234
YWLL46	7	0.380	0.434	NS	0.401	0.16153	0.18047	0.02260
YWLL59	14	0.708	0.884	NS	0.870	0.16064	0.17948	0.02245
Total	599							
Average	8.68	0.582	0.701		0.663	0.16127	0.18008	0.02243

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.00$ and NS, $P \geq 0.05$ non-significant deviation.

A total of 599 alleles were detected across 69 microsatellite loci which were typified in the Huacaya and Suri alpaca breeds. The number of alleles per locus varied from 2 (LCA33) to 25 (YWLL08) with a global average of 8.68 alleles per locus. The majority of the markers were highly polymorphic, with only one locus (LCA33) exhibiting two alleles and 5 microsatellite markers (GLM2, LCA36, LCA86, VIAS A1 and VOLP10) showing three alleles. The observed heterozygosity (H_O) ranged from 0.014 (GLM2) to 0.862 (LCA8). The expected heterozygosity (H_E) per locus varied from 0.056 (GLM2) to 0.929 (LAB3), being the average observed and expected heterozygosity values of 0.582 and 0.701 respectively. Deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were found in 12 loci (LAB13, LCA37, LCA68, LCA77, LCA85, LCA90, LGU76, VOLP01, VOLP10, VOLP67, VOLP72, and YWLL43). The Polymorphic Information Content (PIC) values ranged from 0.055 (GLM2) to 0.919 (LAB3), and the average value was 0.663.

The estimation of the genetic variability for the two alpaca breeds (Huacaya and Suri) are showed in Table 3. The allele variability across the two alpaca breeds was relatively high and similar in both breeds, as indicated from the gene diversity measures. The Huacaya breed showed the highest allele diversity (8.06), whereas the Suri breed exhibited the lowest allele diversity (7.74). The observed heterozygosity values (H_O) for these two breeds were 0.581 (Suri) and 0.583 (Huacaya), whereas the gene diversity values were 0.686 (Suri) and 0.695 (Huacaya). The mean observed heterozygosity was lower than expected. The values of the inbreeding coefficient (F_{IS}) for both breeds were 0.154 (Suri) and 0.162 (Huacaya). An overall heterozygote deficit (F_{IS}) of 16.1% was observed in the studied loci within the breeds, whereas, the total population exhibited an 18% deficit of heterozygotes (F_{IT} , table 2).

Table 3. Variability parameters for 69 microsatellite loci in to alpaca breeds sampled in the Pacamarca S.A. research farm. Mean number of alleles (MNA), average expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity, polymorphic information content (PIC) and inbreeding coefficient (F_{IS}).

Breed	Sample size	Total no. of alleles	MNA	H_O	H_E	PIC	F_{IS}
Huacaya	74	556	8.06	0.583	0.695	0.655	0.162
Suri	66	534	7.74	0.581	0.686	0.642	0.154

The bottleneck analysis was performed for the Huacaya and Suri breeds. The microsatellite data were subjected to mode shift test, under the assumption of the two-phase model to assess whether a decreasing in numbers had an impact on the maintenance of genetic variation within these breeds. The tests of Sign, Standardized differences and Wilcoxon, could not detect any significant departure from mutation-drift-equilibrium in the populations (Fig.1).

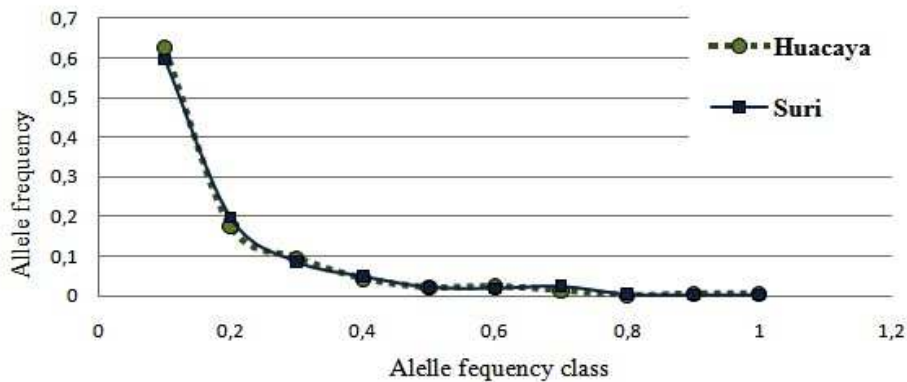


Fig. 1. Normal L-shaped curve revealing no mode shift and absence of genetic bottleneck in Huacaya and Suri alpaca breeds.

3.2. Genetic differentiation

According to the global F_{ST} values, the 2.2% of the genetic variation accounted for the breed differences and the 97.8% for the variation among individuals (Table 2). The majority of the loci contributed in similar extent to the low genetic differentiation observed among breeds. The genetic relationship between the breeds was assessed by F_{ST} and Nm measures. The value of genetic differentiation (F_{ST}) between the two breeds Huacaya and Suri was 0.026 whereas the gene flow (Nm) value between both breeds was 9.31 (table not shown).

The hierarchical AMOVA revealed a low level of genetic differentiation between the Huacaya breed with the Suri breed ($F_{ST}=0.025$). The analyses of variance showed higher value within populations (78%) than among populations (19%).

According to the Factorial Correspondence Analysis, the combined first three components explained 6.81% of the total genetic variation (Fig. 2). The first component explaining the 2.61% of the total variation which separates the Huacaya breed from the Suri breed; the second component represented the 2.24% of the total variation, and the third component the 1.96% of the total variation.

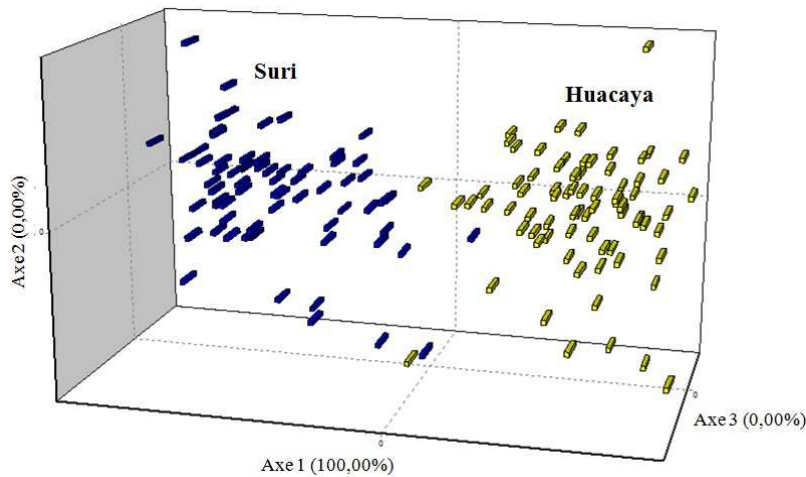


Fig. 2. Spatial representation of the Huacaya and Suri breeds as defined by the factorial correspondence analysis.

3.3. Assignment test

All the 140 individuals from the two breeds were mixed and then re-assigned to reference populations using different assignment approaches as described in GeneClass 2.0. The CAP values were high for both breeds (Table 4). The Huacaya breed was correctly assigned with a probability of assignment of 100% and also a large proportion of the Suri breed individuals were correctly assigned with a CAP value of 97%. With an average probability of assignment of 93.3% and 91.89% for the Huacaya and Suri breeds respectively, they can therefore be considered as unambiguous (Negrini *et al.*, 2008). About 3% of the individuals of the Suri breed were assigned to the Huacaya breed with a probability of 69.14% and the rest was assigned to their own breed (Suri) with a probability of 53.11%.

Table 4. Correct assignment percentage. Number of animals and percentage of animals assigned to the Huacaya and Suri breeds using the Bayesian method of Rannala and Mountain (1997).

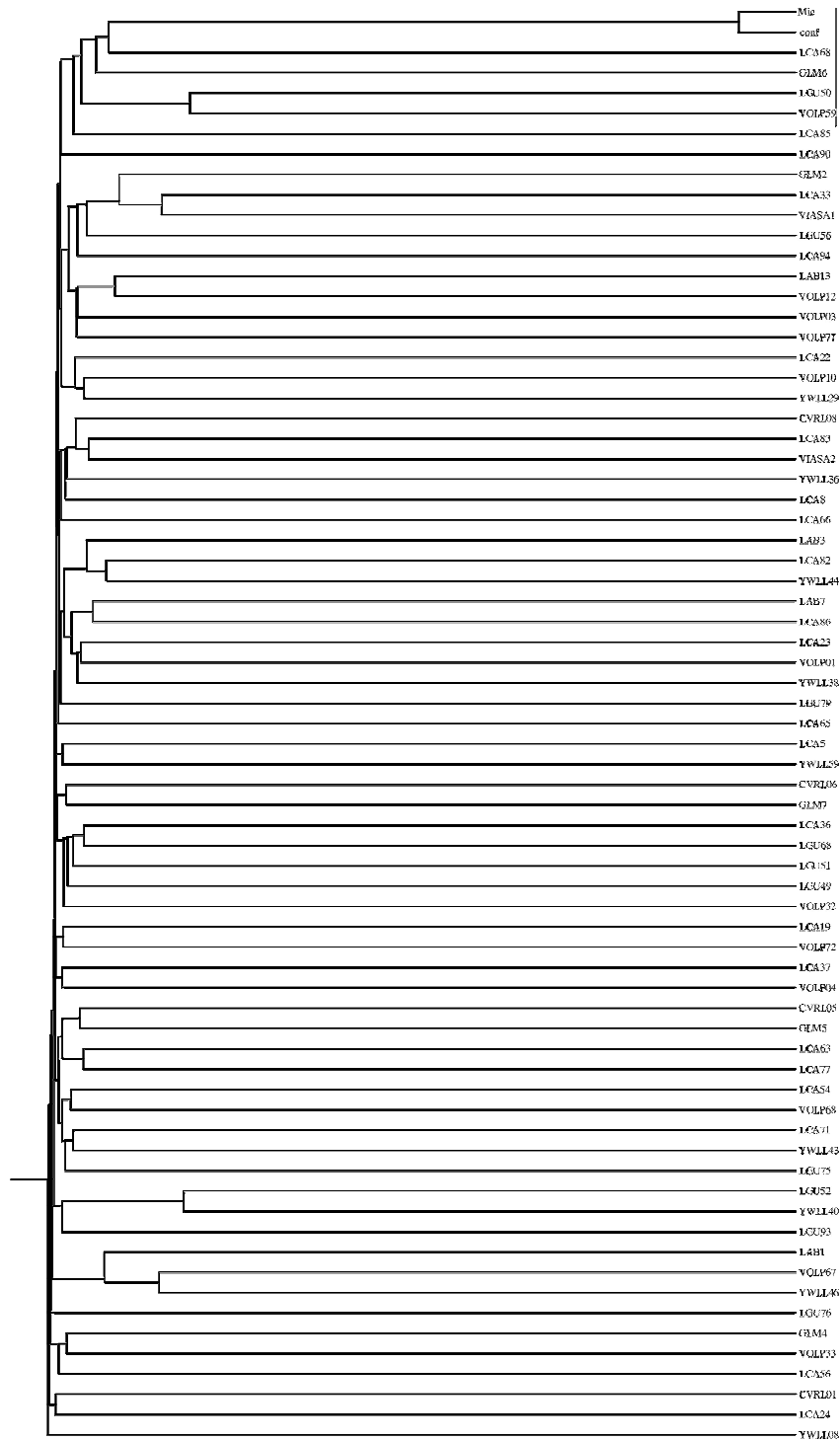
Breed		Huacaya	Suri
Huacaya	Individuals	74	0
	% CAP	100.0	0
Suri	Individuals	2	64
	%CAP	3.00	97.00

CAP: The correct assignment percentage

3.4. Analyses association of the quantitative traits

The preliminary step was the building of a dendrogram obtained by the UPGMA method and constructed from the D_A matrix that provided the best resolution of the relationships between the 69 microsatellite markers with the two fiber traits. The tree showed an important clustering between the traits of the fiber diameter and the comfort factor with the following microsatellite markers LCA68, GLM6, LGU50, VOLP59, LCA85 and LCA90 (Figure 3).

Fig. 3. Dendrogram using UPGMA method, based on 69 microsatellite markers and the two fiber traits (fiber diameter and comfort factor) in an alpaca population from Peru.



The second step was to apply the DUNCAN test in order to detect significant associations between the genetic values of the fiber diameter and the six microsatellite markers that were previously clustered by the UPGMA method. The unique genotypes and alleles were eliminated.

The table 5 showed the alleles and the loci that were significantly associated to the indexed genetic values for the alpaca fiber diameter. The most significant findings were the association of alleles at the LCA68, VOLP59, LCA90 and GLM6 loci ($P < 0.0001$, $P = 0.009$, $P = 0.015$ and $P = 0.020$, respectively). The LCA85 and LGU50 microsatellite markers showed no significant differences ($P \geq 0.05$).

The significantly associated alleles with the indexed genetic values for the LCA68 locus were seven: the 199, 189, 201, 197, 203, 205 and 195 alleles, being the 195 allele significantly different from the alleles previous, the indexed genetic values for the 199, 189, 201, 197, 203, 205 and 195 alleles were estimated for the Huacaya breed (-1.74 μm , -1.29 μm , -0.87 μm , -0.82 μm , -0.74 μm , -0.43 μm . and 4.41 μm respectively) and the Suri breed (-1.29 μm , -0.96 μm , -0.65 μm , -0.61 μm , -0.55 μm , -0.32 μm . and 3.27 μm respectively). The VOLP59 locus also showed a different significantly associations for the 112 allele and the 110 allele and the indexed genetic values; the estimations in the Huacaya breed were -1.10 μm and -0.82 μm ., and in the Suri breed of -0.82 μm and -0.06 μm respectively. The LCA90 locus reported different significantly association for the 243, 229 and 227 alleles group with the 231 and 243 alleles, being the estimations of the indexed genetic values of -1.12 μm , -1.10 μm , -0.68 μm , 0.22 μm ., and 1.32 μm . in the Huacaya breed and -0.83 μm , -0.82 μm , -0.50 μm , 0.16 μm ., and 0.98 in the Suri breed, respectively. The GLM6 locus presented different significantly association for the 143 allele with the 155, 151, 157, and 153 alleles group,

being the indexed genetic values of -3.01 μm , -1.04 μm , -0.77 μm , -0.56 μm . and 0.80 μm ., in the Huacaya breed; and -2.23 μm , -0.77 μm , -0.57 μm , -0.42 μm and 0.59 μm ., in the Suri breed, respectively.

Table 5. Associations of four microsatellite markers alleles with the genetic value for the alpaca fiber diameter in the Huacaya and Suri breeds sampled in the Pacamarca S.A. research farm.

Loci	Allele	Allele frequency ⁽¹⁾	FD (μm)	Genetic value ⁽²⁾	Indexed genetic values (μm)	
					Huacaya	Suri
LCA68	199	13	22.17	85.100 ^A	-1.74	-1.29
	189	9	21.48	88.918 ^A	-1.29	-0.96
	201	41	22.49	92.520 ^A	-0.87	-0.65
	197	8	22.87	92.920 ^A	-0.82	-0.61
	203	6	21.65	93.656 ^A	-0.74	-0.55
	205	14	24.10	96.312 ^A	-0.43	-0.32
	195	5	30.58	137.716 ^B	4.41	3.27
VOLP59	112	68	22.14	90.555 ^A	-1.10	-0.82
	110	66	23.52	99.311 ^B	-0.08	-0.06
LCA90	243	5	21.88	90.375 ^A	-1.12	-0.83
	229	55	22.49	90.538 ^A	-1.10	-0.82
	227	30	22.79	94.164 ^A	-0.68	-0.50
	231	9	24.64	101.888 ^B	0.22	0.16
	249	15	25.97	111.341 ^B	1.32	0.98
GLM6	143	5	23.19	74.238 ^A	-3.01	-2.23
	155	39	22.19	91.104 ^B	-1.04	-0.77
	151	8	22.80	93.409 ^B	-0.77	-0.57
	157	67	22.93	95.166 ^B	-0.56	-0.42
	153	16	24.37	106.866 ^B	0.80	0.59

¹Number of alleles analyses at each locus

²The values of DUNCAN test with the different letters A and B are significantly different for the indexed genetic values

FD: fiber diameter

4. Discussion

4.1. Genetic variability

The genetic diversity of Peruvian alpaca populations (Huacaya and Suri breeds) from Puno region was evaluated using 69 microsatellite markers. The FAO (2011), recommend using microsatellite markers for the studies of genetic diversity in livestock species. Twenty five microsatellite markers were recommended for camelids, and twelve of these loci were used in the present study.

The genetic diversity levels reported herein were slightly lower than those indicated by Mariasegaram *et al.* (2002), Agapito *et al.* (2008), Barreta *et al.* (2012), La Manna *et al.*, (2011) and Paredes *et al.* (in press) (9.3, 14.5, 11.7, 9.6, 11.5, respectively), although majority of the markers were highly polymorphic (four of them having 25 alleles per locus). The higher number of alleles per locus reported in the present study suggests that these molecular markers could be used to analyse the genetic diversity in alpaca populations. Takezaki and Nei, (1996) indicated that markers for measuring the genetic variation in a population should have an average heterozygosity ranging from 0.3 to 0.8. In the present study, the gene diversity (average expected heterozygosity) indicated a high level (0.70). The estimates of genetic diversity for both breeds were relatively similar. The total number of alleles for the Huacaya breed (556) was slightly higher than the Suri breed (534), with average values of 8.6. and 7.74 respectively, La Manna *et al.* (2011) reported similar values of number of alleles. The values of the observed heterozygosity (0.583 vs. 0.581) and the expected heterozygosity (0.69 vs. 0.64) were similar in Huacaya and Suri breeds, respectively. La Manna *et al.* (2011) found highest values of observed heterozygosity and expected heterozygosity of 0.75 vs 0.74

(Huacaya breeds) and 0.78 vs 0.77 (Suri breed), that the presented in these results. A decrease of the observed heterocigosity ($H_O = 0.58$ vs. the $H_E = 0.70$) was observed in the total population (both alpaca breeds). This unbalance may possibly be explained by the selection practiced in the experimental Pacamarca S.A. research farm. A continuous and directional selection could have eroded the polymorphism throughout the successive generations, likewise, the low values exhibited for the observed heterozygotes in the alpaca population may be explained above for a lower degree of polymorphism.

Significant deviations from Hardy Weinberg Equilibrium in 12 loci (LAB13, LCA37, LCA68, LCA77, LCA85, LCA90, LGU76, VOLP01, VOLP10, VOLP67, VOLP72 and YWLL43) were observed in the overall population. A previous study performed by Barreta *et al.* (2012) showed no significant deviations from HW equilibrium at the VOLP01 locus, meanwhile Paredes *et al.* (in press) indicated significant deviation at the same locus. On the other hand, La Manna *et al.* (2011) and Agapito *et al.* (2008) reported significant deviations from HWE in the locus LCA37. The deviation from HWE and the high heterozygotes deficiency exhibited by some microsatellite markers may be caused by the presence of non-amplified alleles (Sun *et al.*, 2012).

The F_{IS} average (0.16) over all loci indicates a deficit of heterozygotes and this could be attributed to the inbreeding, being the value of inbreeding coefficient herein moderate. Similar values were obtained for both breeds. The results of F_{IS} in this populations are higher than those reported by Barreta *et al.* (2012) ($F_{IS} = 0.019$ to 0.114) in Bolivian alpacas, and a similar value ($F_{IS} = 0.15$) also has been found in the study of Peruvian alpacas from rural Andean communities (Paredes *et al.*, in press). The occurrence of a normal curve L-shaped in the Huacaya and Suri breeds revealed no loss of alleles in these

populations, likewise the lower values for both breeds mainly in the Suri alpaca did not appear to have a deleterious effect on the genetic variation and hence, an absence of a genetic bottleneck is observed.

4.2. Genetic differentiation

The genetic differentiation coefficient revealed that both alpaca breeds (Huacaya and Suri) are very similar ($F_{ST} = 0.02$) and present a high gene flow ($Nm=9.31$). This result was supported by further analyses. The molecular variance analysis showed that the higher genetic variation was found within populations (78%), whereas, the genetic variation among populations was 2.5%. Meanwhile the factorial correspondence analysis indicated the low genetic differentiation between the two breeds, being the 6.81% of the total genetic variation. Previous studies performed in Peruvian alpacas populations, reported low levels of genetic differentiation (F_{ST}) of 0.02 (Paredes *et al.*, in press) and of 0.0002 (La Manna *et al.*, 2011), meanwhile Barreta *et al.* (2012) showed in Bolivian alpacas a high level of F_{ST} ranging from 0.053 to 0.077.

The correct assignment percentage (CAP) suggested that most of individuals for both breeds Huacaya (100%), and Suri (97%) were correctly classified into their original populations (the Huacaya and Suri breed). According to the concept used by Negrini *et al.* (2008) an individual is correctly assigned to a breed or population if its probability of assignment is $\geq 90\%$, therefore, the assignments can be considered as unambiguous, reinforcing the results previously mentioned.

The results showed in the present research may be the outcome of the breeding strategy performed on the experimental Pacamarca farm since 1992, being one of the main goals of the alpaca breeding program implemented by

Pacomarca S.A. the improvement of the fleece characteristics in both breeds (fine fiber).

4.3. Analyses association of the quantitative traits

The dendrogram indicated that the LCA68, GLM6, LGU50, VOLP59, LCA85 and LCA90 microsatellite markers were the closest to the two quantitative traits (fiber diameter and comfort factor), wherein, one major gene would be involved, indicating a possible relationship of these loci with this major gene (Perez-Cabal *et al.*, 2010). The DUNCAN test found associations between the fiber diameter trait as well as the indexed genetic value for four loci (LCA68, GLM6, LGU50, VOLP59 and LCA90). Fifteen out of nineteen alleles showed negative indexed genetic values (decreasing fiber diameter, μm) and only four alleles gave a positive genetic value (increasing fiber diameter, μm).

The alpacas studied in this work were owned by the Pacamarca S.A experimental farm. The high number of alleles to decrease the fiber diameter could be due to the breeding program implemented by Pacamarca S.A. since 1992, in which the alpacas selection was for decreasing the fiber diameter. Nevertheless, even in the elite experimental farm such as Pacamarca S.A., unfavourable alleles (positive genetic values, μm) were found. These findings are important, due to that alpacas with the positive and negative genetic values may be selected either against or for in order to achieve only favourable alleles (negative genetic value, μm). The selection of alleles, mainly those with negative genetic values, would not influence on the genetic resources of this alpacas population as only four among nineteen are associated to undesirable fiber diameter.

Studies of QTL for the fiber diameter trait of goats (Visser *et al.*, 2011) and the identification of three chromosomal regions that influence in the fiber diameter of the sheep wool have been published (Parsons *et al.*, 1994; Ponz *et al.*, 2001), It has also been reported the differential gene expression of the Keratin protein in the goats fiber diameter (Jin *et al.*, 2010) and wool sheep (Adelson *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2011; Itenge-Mweza *et al.*, 2007),), suggesting an important role in the regulation of the fiber diameter, staple strength, wool colour and brightness. However, the present work is the first communication showing a useful tool to improve the alpaca fiber trait giving a relationship between the quantitative trait with some microsatellite markers. So far, Paredes *et al.* (in press) has suggested in alpacas, microsatellite loci associations with the fiber diameter trait, but carrying a different statistical methodology to the used in this study, without a prior assessment of animals for a major gene.

The studies for the identification of genes associated with the production traits in the alpaca are limited, due to the incomplete saturation of the genome map and the non-chromosomal location of the microsatellite markers. Around one hundred and fifty microsatellite markers of the alpaca are published (Munyard *et al.*, 2009), which is far from the almost 4,000 microsatellite loci necessary to create a high density genome coverage in other species (Ihara *et al.*, 2004).

5. Conclusions

The considerable levels of genetic variability found on an alpacas population conformed by the Huacaya and Suri breeds, the low coefficients of inbreeding, in addition to the absence of genetic bottleneck and the high percentage of genetic variance within populations (78%), suggested that these

populations have a rich genetic resources to continue with the development of breeding strategies.

A possible significant association of alleles in four microsatellite loci (LCA68, VOLP59, LCA90 and GLM6) with the indexed genetic values for the fiber diameter trait (μm) in both breeds were founded in this study. The estimations of the indexed genetic values in the Suri breed were always lower than in the Huacaya breed.

An important future objective would be to confirm these associations of the possible major gene effects on the fiber diameter trait. Likewise, undertake studies to locate and confirm the chromosomal regions which influence the production traits (fiber diameter) of the alpaca, and ensure the animals selection with the desirable alleles to improve the phenotypic traits.

Acknowledgment

The authors thank Maria Ángeles Pérez Cabal from the Department of Animal Production of the Complutense University of Madrid, as well as, Alonso Burgos, manager from the Pacamarca S.A. Experimental Farm for their collaboration. This study has been partially funded by the Vicerrectorado de Internacionalización y Cooperación Internacional of the University of Córdoba, Spain, and by the Diputación de Córdoba, Spain.

*DISCUSIONES
GENERALES*

La actual condición productiva del sector de los camélidos sudamericanos domésticos CSD (alpaca y llama) se caracteriza por la limitada calidad de la fibra de alpaca, así como los bajos rendimientos en su comercialización, lo que conlleva a bajos precios ofertados por la industria textil. La pérdida de la finura de la fibra es debida a diversos factores: a) principalmente a la escasa práctica de un correcto manejo ganadero (falta de identificación animal en la mayoría de las poblaciones de alpacas, sobre todo en los pequeños productores), donde no se usan registros en las ganaderías alpaqueras (Paredes *et al.*, 2010), y por tanto b) la selección de reproductores machos y hembras además de las técnicas del empadre controlado no son llevadas correctamente (Bustínza, 2001); a los factores antes descritos se suman: c) la alta mortalidad de crías por efectos del clima y problemas sanitarios (Torres *et al.*, 2011); d) el factor alimentario cobra también uno de los principales papeles en la crianza de los CSD, siendo escaso el manejo de los recursos naturales (Plan Maestro de la RNSAB, 2006) y e) el sobrepastoreo de las praderas alto andinas ocasionando las carencias de pastos naturales para la alimentación de los camélidos sudamericanos, principalmente de la alpaca (UNIDO, 2010).

Las poblaciones de alpacas actualmente están caracterizadas por una falta de uniformidad, engrosamiento e incremento en la variación del diámetro de la fibra tanto en la raza Huacaya como en la Suri, así también como la aparente desaparición de llamas con fibras finas. Esta realidad contrasta con los datos de alpacas anteriores a la época de la conquista española (siglo XVI) las cuales poseían fibra de buena calidad fina y extrafina (17.8 μm ., Huacaya; 22.8 μm ., Suri) y de llamas (21.1 μm variedad chaku) (Wheeler *et al.*, 1995).

Países no sudamericanos como Nueva Zelanda, Australia, USA, Canadá, Reino Unido, Alemania, Italia y Francia vienen mostrando un importante interés en la crianza de alpacas y llamas sobre todo como animales de

compañía y para la producción de fibra. Los valores de diámetro de fibra publicados para estas poblaciones importadas no autóctonas son mayores a los reportados para alpacas Peruanas, señalando medidas en diferentes edades de 27.85 μm ., 27.85 μm ., y 30 μm en alpacas de 2, 1-2 y 2 años respectivamente (Wuliji *et al.*, 2000; Lupton *et al.*, 2011 y MacGregor *et al.*, 2006).

El presente trabajo de tesis, busca contribuir a los programas de mejora genética que se emprenden en la crianza de alpacas, con el principal objetivo de mejorar los caracteres productivos de interés en la alpaca. Para ello se ha emprendido un estudio preliminar en poblaciones de alpacas de crianza tradicional, en el que se han estimado los parámetros genéticos, las correlaciones entre caracteres del vellón y los efectos fijos. Esta primera fase del trabajo nos permitió conocer los niveles de variabilidad genética en los rebaños que usan una metodología de manejo tradicional y cómo se encuentran estructuradas estas diferentes poblaciones.

El primer objetivo de la presente tesis fue conocer los parámetros genéticos de los caracteres del diámetro de la fibra, peso del vellón y longitud de la mecha. Los resultados nos señalaron una alta heredabilidad del peso del vellón (0.71) y moderadas heredabilidades para la longitud de la mecha (0.37) y el diámetro de la fibra (0.28). Velasco (1980) también reportó altos valores de heredabilidad para el peso del vellón (0.35), por su parte León-Velarde y Guerrero (2001) para la longitud de la fibra obtuvieron valores de heredabilidad similar a los aquí indicados aunque Roque *et al.* (1985) señalan un valor superior. El diámetro de la fibra de alpaca es un carácter que determina la calidad del vellón en relación a la comodidad y ligereza de las prendas textiles, siendo necesaria la selección para disminuir la medida de este carácter de importancia económico. Al tener el diámetro de la fibra una heredabilidad moderada (0.28), la respuesta a la selección para este carácter no

sería tan eficiente como para el peso del vellón. Teniendo en cuenta que el carácter de longitud de mecha da valores apropiados para la industria textil, podría no tenerse en cuenta ni para su aumento ni disminución; el hecho de que su heredabilidad sea menor (0.37), nos sugiere que incluso sería conveniente para los posibles planes de mejora.

También fueron estimadas las correlaciones, genética, ambiental y fenotípica, siendo éstas positivas. Se encontró una alta correlación para la longitud de mecha–diámetro de la fibra (0.60, LM-DF) y los valores más bajos para el peso del vellón–diámetro de la fibra (0.28, PV-DF), indicándonos que se podría seleccionar para disminuir el diámetro de fibra pero disminuiría también la longitud de mecha, aunque no sería tan significativa porque la fibra es suficientemente larga y está dentro de los requerimientos de la industria textil. En este sentido es importante plantear esquemas de selección con el objetivo de disminuir el diámetro de la fibra, aunque también otro carácter para la selección podría ser el peso del vellón. En cuanto a los efectos fijos del sexo, color y año de esquila no se encontraron efectos significativos para los tres caracteres; sólo existe una diferencia altamente significativa en el diámetro de la fibra con respecto al año de esquila ($P < 0,01$). Es importante conocer los parámetros genéticos de los caracteres deseables a elegir a fin de poder predecir la respuesta a la selección y hacer la evaluación genética de los reproductores y emprender estrategias de selección que permitan obtener el máximo progreso genético (Ponzoni *et al.*, 1997).

Una vez conocido el potencial de mejora mediante los resultados obtenidos sobre los parámetros genéticos, correlaciones y efectos fijos, se planteó la realización del estudio de variabilidad molecular y asociaciones de *loci* al carácter cuantitativo diámetro de la fibra en poblaciones de alpacas con la característica de un manejo mejorado.

La diversidad genética y estructura de cinco poblaciones de alpacas manejadas de modo tradicional fue estudiada mediante el uso de 20 marcadores moleculares de tipo microsatélite. Este estudio nos ha mostrado una alta variabilidad genética en todas las poblaciones, especialmente en la de San Juan de Tarucani y Chalhuanca, otros estudios realizados en alpacas de diferentes orígenes muestran similares o incluso mayores valores de variabilidad alélica que los aquí reportados (Lang *et al.*, 1996; Obreque *et al.*, 1998 and 1999; Penedo *et al.*, 1998a,b; Bustamante *et al.*, 2003; Sarno *et al.*, 2000; Mariasegare *et al.*, 2002; Agapito *et al.*, 2007 y Barreta *et al.*, 2012). El análisis de la estructura poblacional ha revelado altos niveles de variación genética entre las cinco poblaciones. El coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) fue moderado en el total de las poblaciones (0.15). Agapito *et al.* (2007) estudiando alpacas Peruanas también hallaron resultados similares. La diferenciación genética (F_{ST}) entre las cinco poblaciones fue muy baja (2%), siendo la población de alpacas de Lampa la que tiene los valores más bajos; este índice ha sido confirmado por el análisis de correspondencia y el árbol filogenético reconstruido. Según el análisis de estructura genética, las alpacas de la localidad de Lampa constituyen la población más diferenciada del resto de poblaciones estudiadas, confirmando el análisis de correspondencia. lo que puede sugerir que los productores de alpacas estén realizando prácticas de empadre mediante intercambio de reproductores. El flujo genético (Nm) más bajo se encontró entre las poblaciones de alpacas de Lampa y Estación Pillones (6.22).

Los resultados fenotípicos revelaron que no hubo diferencias significativas del diámetro para el efecto sexo en las cinco poblaciones de alpacas; por su parte, Wuliji *et al.* (2000) y McGregor y Butler (2004) también señalan que el sexo no tiene efecto en la finura de la fibra. Estos resultados nos

sugieren que los productores de estas comunidades usan similares métodos para la selección de sus rebaños de alpacas. La media de la medida del diámetro encontrada en las cinco poblaciones fue de 18.96 μm ., considerada buena por la industria textil. McGregor (2006) indica que la medida del diámetro de la fibra debería mantenerse por debajo de 22 μm para asegurar la buena calidad de la fibra. Un preliminar análisis de asociación entre los marcadores moleculares microsatélites y el diámetro de la fibra muestra asociaciones espurias en tres *loci*: CVRL07, LGU68 y LCA65, siendo estos resultados la primera comunicación en asociaciones de *loci* con caracteres cuantitativos de la fibra en alpacas (Paredes *et al.*, en prensa).

Con el objetivo de establecer las primeras bases para una saturación del genoma de la alpaca tendente a la búsqueda de mejores aproximaciones de *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTL), se realizó el estudio con dos poblaciones de alpacas (una de raza Huacaya y otra de raza Suri) pertenecientes a la empresa privada Incatops S.A. (Fundo Experimental Pacamarca) previamente valoradas para un gen mayor que afecta a dos caracteres de calidad: el diámetro de la fibra y el factor confort. Así mismo se estimó la diversidad genética existente en estas poblaciones de alpacas. Los resultados encontrados nos muestran moderados niveles de diversidad genética en estas poblaciones con una media global de 8.68 alelos por locus. Dentro de ambas razas los niveles de diversidad génica fueron altos. Otros estudios señalan mayor diversidad genética en otras poblaciones de alpacas (Mariasegaram *et al.*, 2002; Agapito *et al.*, 2008; Barreta *et al.*, 2012; La Manna *et al.*, 2011 y Paredes *et al.*, en prensa). El nivel de consanguinidad (F_{IS}) en el total de la población fue moderado (0.16) siendo superior al registrado por Barreta *et al.* (2012) con rangos de 0.019 a 0.114. La diferenciación genética (F_{ST}) fue baja (0.02) y similar en ambas razas, siendo

apoyados estos resultados por los análisis de varianza molecular y el análisis factorial de correspondencia. También se realizó la prueba del correcto porcentaje de asignación a la raza, sugiriendo que la mayoría de los individuos fueron correctamente asignados a sus poblaciones; para la raza Huacaya el porcentaje fue del 100% y para la raza Suri del 97%. De acuerdo al concepto de Negrini *et al.*, (2008), las asignaciones pueden ser consideradas sin ambigüedad (Paredes *et al.*, sometido). Es importante tener en cuenta que Pacamarca S.A. es un centro que busca mejorar la calidad de la fibra y lleva un programa de mejora genética implementado hace veinte años, seleccionando animales para mejorar las características de la calidad de la fibra en las dos razas.

Con datos de la población de alpacas, en los que cada individuo tiene asignada una probabilidad de llevar un gen mayor para los caracteres cuantitativos de la fibra, se realizó el análisis de asociaciones de *loci* para las características del diámetro de la fibra y el factor confort. El dendograma nos señaló asociaciones de seis marcadores moleculares microsatélites (LCA68, GLM6, LGU50, VOLP59, LCA85 y LCA90) con estos dos caracteres de calidad de la fibra. Por otro lado los resultados obtenidos de la prueba de DUNCAN entre los seis *loci* mencionados anteriormente y el valor genético para el carácter del diámetro de la fibra nos indican posibles asociaciones en cuatro *loci* (LCA68, GLM6, VOLP59, LCA90), de los cuales quince de un total de diecinueve alelos mostraron valores genéticos indexados negativos (para disminución del diámetro de la fibra, μm) y cuatro alelos dieron valores genéticos positivos (incremento de la fibra, μm).

En otras especies de producción de lana se han realizado estudios en la búsqueda de QTL. Para la especie ovina se han demostrado asociaciones para el carácter del peso de la lana (Bot *et al.*, 2004) y en cabras se ha hallado QTL

de mediano efecto influenciando caracteres de la producción y calidad, revelando QTL para el diámetro de la fibra (Visser *et al.*, 2011). Este trabajo de tesis presenta el primer estudio que plantea asociaciones de marcadores moleculares con un carácter cuantitativo de importancia económica como es el diámetro de la fibra de alpaca.

El hecho de constituir Pacamarca S.A. un centro que lleva un programa de mejora implementado desde el año 1992, y siendo uno de sus objetivos la selección de alpacas para disminuir el diámetro de la fibra y conseguir rebaños con fibra de calidad (fibra fina), explica el alto número de alelos presentes en estas poblaciones para la disminución del diámetro de la fibra. Estos resultados son importantes, toda vez, que nos permitirían hacer selección de alpacas con valores genéticos positivos y negativos para lograr alelos favorables (valores genéticos negativos μm). La selección de alelos con valores genéticos negativos no influiría en los recursos genéticos de estas poblaciones ya que sólo cuatro de diecinueve alelos fueron asociados a un desfavorable diámetro de fibra.

Se espera conseguir el ensamblaje del genoma de la alpaca y situar físicamente los 70 *loci* estudiados para aportar una base de datos que ayude a la localización de los caracteres productivos y de calidad de importancia económica. El uso de las herramientas de la genética molecular podrá contribuir a los programas de mejora en esta ganadería alto andina de importante interés social y económico para el Perú.

***CONCLUSIONES
GENERALES***

Las principales conclusiones derivadas de los análisis para la caracterización fenotípica y genética en diferentes poblaciones de alpacas obtenidas en el presente trabajo son:

1. La estima de parámetros genéticos ha proporcionado valores de heredabilidades altos para los dos caracteres que necesitan ser modificados: diámetro de la fibra y peso de vellón, indicando que se puede obtener una buena respuesta a la selección. Por otro lado la baja correlación entre los caracteres peso del vellón y diámetro de fibra, sugiere que se podrá hacer mejora para disminución de diámetro y aumento de peso de vellón sin que interfiera la selección de un carácter en el otro.
2. No hay un efecto significativo de los factores del sexo, año de esquila, con los caracteres del diámetro de la fibra, peso del vellón y longitud de la mecha. Efectos significativos de la edad con los tres caracteres estudiados y del color de la capa con el diámetro de la fibra y peso del vellón.
3. Las poblaciones de alpacas de las localidades de San Juan de Tarucani, Estación Pillones, Chalhuanca, Palca y Lampa muestran altos niveles de diversidad genética, así como un moderado coeficiente de consanguinidad y una alta variación genética dentro de poblaciones. La diferenciación genética entre las cinco poblaciones es baja. Este escaso flujo de genes corrobora las prácticas de manejo tradicionales de intercambio de reproductores. Además, ausencia de cuellos de botella genéticos en estas cinco poblaciones de alpacas.
4. Se han encontrado asociaciones espurias entre el carácter de diámetro de la fibra y tres *loci* de microsatélite CVRL07, LGU68 y LCA65 en las

poblaciones de San Juan de Tarucani, Estación Pillones, Chalhuanca, Palca y Lampa.

5. El estudio de un amplio panel de microsatélites ha mostrado niveles favorables de variabilidad genética para las razas de alpacas Huacaya y Suri, además de un alto porcentaje de variación genética dentro de ellas, un bajo coeficiente de consanguinidad y ausencia de un cuello de botella genético. Por otro lado el coeficiente de diferenciación y la estructura genética revela alta similitud entre ambas razas para los parámetros de variabilidad genética.

6. Los *loci* LCA68, VOLP59, LCA90 y GLM6 fueron asociados significativamente a valores genéticos favorables para el carácter cuantitativo del diámetro de la fibra de alpaca. Quince de los 19 alelos encontrados muestran valores genéticos negativos (disminución de la medida del diámetro de la fibra, micras) y cuatro alelos dan valores genéticos positivos (incremento de la medida del diámetro de la fibra, micras). Este hallazgo supone un nuevo paradigma a tener en cuenta en los planes de mejora y emprender en las granjas de élite de alpacas.

*REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- Adelson, D.L., Cam, G.R., DeSilva, U., Franklin, I.R., 2004. Gene expression in sheep skin and wool (hair). *Genomic* 83, 95-105.
- Agapito, J., Rodriguez, J., Herrera-Velit, P., Timoteo, O., Rojas, P., Boettcher, P.J., García, F., Espinoza, J.R., 2008. Parentage testing in alpacas (*Vicugna pacos*) using semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 10 microsatellite markers. *Anim. Genet.*, 39, 201-203.
- Allain, D., Renieri, C., 2010. Genetic of fibre production and fleece characteristic in small ruminants, Angora rabbit and South American camelids. *Animal* 4, pp. 1472-1481 doi:10.1017/S1751731110000029.
- Allain, D., Schibler, L., Mura, L., Barillet, F., Sechi, T., Rupp, R., Casu, S., Crihiu, E., Carta, A., 2006., QTL detection with DNA markers for wool traits in a sheep backcross Sarda x Lacaune resource population In: *Proceeding of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte, MG, Brazil (Communication 05-07).
- Antonini, M., Gonzales, M., Valbonesi, A., 2004. Relationship between age and postnatal skin follicular and development in three types of South American domestic camelids. *Livest. Prod. Sci.*, 90,241-246.
- Antonini, M., Vinella, S., 1997. Fine fibre production from Argentina Camelids a development perspective, Vol. 6. *European fine fibre network*, occasional publication. pp. 31-41.
- Aranguren, J., Jordana, J., 2001. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. *Memorias Asociación Venezolana de Producción Animal (AVPA)*, Venezuela.
- Arranz, J.J., Bayón, Y., San Primitivo, F., 2001. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellite. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 529-542.
- Azor, P.J., Goyache, F., 2007. Metodología de caracterización genética. En: *Patrimonio Ganadero Andaluz. Volumen I. La ganadería andaluza en el Siglo XXI*. Ed. Junta de Andalucía. Sevilla. España. pp. 483-524.
- Azor, P.J., Valera, M., Gómez, M.D., Goyache, F., Molina, A., 2007. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.*, 30, 37-42.
- Ballou, J.D., Lacy, R.C., 1995. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In: *Population Management for survival and recovery*. pp. 76-111. Ed. New York, Columbia University Press.
- Band. M., Ron, M., 1996. Creation of a SINE enriched library for the isolation of polymorphic (AGC)_n microsatellite markers in the bovine genome. *Anim. Genet.*, 27, 243-248.

- Barker, J.S.F. 2001. Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. *Can. J. For. Res.*, 31, 588-595.
- Barker, J.S.F., 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds, in: *Proceeding of the 5th World Congress of Genetic, Appl. Livest. Prod.*, vol. 21, pp. 501-508.
- Barker, J.S.F., Hill, W.G., Bradley, D., Nei, M., Fris, R., Wayne, R.K., 1998. An integrated global programme to establish the genetic relationships among the breeds of each domestic animal species. *FAO animal production and health division, Rome.*
- Barreta, J., Iñiguez, V., Saavedra, V., Romero, F., Callisaya, A.M., Echalar, J., Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J.J., 2012. Genetic diversity and population structure of Bolivian alpacas. *Small Rumin. Res.*, Doi:10.1016/j.smallrumres.2012.03.002.
- Beja-Pereira, A., Alexandrino, P., Bessa, I., Carretero, Y., Dunner, S., Ferrand, N., Jordana, J., Laloe, D., Moazami-Goudarzi, K., Sánchez, A., Cañon, J., 2003. Genetic characterization of South Western European bovine breeds: an historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellite. *Journal of Heredity* 94, 243-250.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.*
- Beraldi, D., McRae, A.F., Gratten, J., Slate, J., Visscher, P.M., Pemberton, J.M., 2006. Development of a linkage map and mapping of phenotypic polymorphisms in a free-living population of Soay sheep (*Ovis aries*). *Genetics* 173, 1521-1537.
- Bidinost, F., Roldan, D.L., Rodero, A.M., Cano, E.M., Taddeo, H.R., Mueller, J.P., Poli, M.A., 2008. Wool quantitative trait loci in Merino sheep. *Small Rumin. Res.* 74, 113-118.
- Boichard, D., Fritz, S., Rossignol, M.N., Guillaume, F., Colleau, J.J., Druet, T., 2006. Implementation of marker-assisted selection: practical lessons from dairy cattle, in: *Proc. of the 8th World Cong: Genet. Appl. Livest. Prod.*, pp. 22-11., <http://hdl.handle.net/2268/84556>
- Bonavia, D., 1996. Los Camélidos sudamericanos. Una introducción a su estudio. *IFEA-UPCH-Conservación Internacional, Lima, Perú.*
- Braga, W., Leyva, V., Cochran, R., 2006. The effect of altitude on alpaca (*Lama pacos*) fiber production. *Technical note. Small Rumin. Res.*, 68, 323-328.
- Bravo, W., Velasco, J., 1983. Índices de herencia de pesos al nacimiento, al destete y primera esquila en Alpacas. *Compendio de resúmenes de*

- Proyectos de Investigación realizados por la UNMSM. Vol. III, Lima, Perú.
- Brenes, F.R., Madrigal, K., Pérez, F., Valladares, K., 2001. El Cluster de los Camélidos en Perú: Diagnostico competitivo y recomendaciones estratégicas. Instituto centroamericano de administración de empresas. <http://www.caf.com/attach/4/default/CamelidosPeru.pdf>. 21 de marzo 2009.
- Bruford, M.W., Bradley, D.G., Luikart, G., 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Gene.*, 4, 900-910.
- Bulmer, M.G., 1971. The Effect of selection on genetic variability. *Amer. Nat.* 105, 201-211.
- Bustamante, A.V., Maté, M.L., Zambelli, A., Vidal, L., 2003. Isolation and characterization of 10 polymorphic dinucleotide microsatellite markers for llama and guanaco. *Mol. Ecol. Notes.*, 3, 68-69.
- Bustínza, A.V., 2001. La Alpaca conocimiento del gran potencial andino, Libro 1. Primera edición, oficina de recursos del aprendizaje. Sección publicaciones, UNA, Puno, Perú.
- Catacora, N., Gallegos, R., Málaga, J., Condori, E., Rosado, E., 2010. Evaluación de peso, vellón y diámetro de la fibra en módulos de alpacas, CONACS. Puno: En III Simposium Internacional de Investigaciones sobre Camélidos sudamericanos, Arequipa, Perú.
- Cervantes, I., Pérez-Cabal, M.A., Morante, R., Burgos, A., Salgado, C., Nieto, B., Goyache, F., Gutiérrez, J.P., 2010. Genetic parameters and relationships between fibre and type traits in two breeds of Peruvian alpacas. *Small Rumin. Res.* 88, 6-11.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two test for detecting recent population bottleneck from allele frequency data *Genetics* 144, 2001-2014.
- Cransberg, R., Munyard, K.A., 2011. Polymorphisms detected in the tyrosinase and matp (slc45a2) genes did not explain coat colour dilution in a sample of alpaca (*Vicugna pacos*). Short communication. *Small Rumin. Res.* 95, 92-96.
- Dekkers, J.C.M., Hospital, F., 2002. The use of molecular genetics in improvement of agriculture of agriculture populations. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 22-32.
- Di Rocco, F., Posik, D.M., Ripoli, M.V., Díaz, S., Maté, M.L., Giovambattista, G., Vidal, L., 2011. South American camelids illegal traffic detection by means of molecular markers. *Legal Medicine* 13, 289-292.
- Dixit, S.P., Verma, N.K., Aggarwal, R.A.K., Vyas, M., Jyoti Rana., Anurodh Sharma., Pooja, Tyagi., Pooja, Arya., Ulmek, B.R., 2010. Genetic diversity and relationship among southern Indian goat breeds based on microsatellite markers. *Small Rumin. Res.*, 9, 153-159.

- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A., Caskey, C.T., 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 746-756.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bio inform Online* 1, 47-50.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F., 1996. Introduction to quantitative genetics. pp. 122-144. Chapter 8. A.W. Longman Limited, Essex, England.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to Quantitative Genetics, 4th ed. Logmans Green, Harlow, Essex, UK.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2011. Draft guidelines on molecular genetic characterization of animal genetic resources national, <http://www.fao.org/docrep/meeting/022/am652e.pdf>
- FAO, 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y el aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. <http://www.fao.org/regional/Lamerica/prior/segalim/animal/paises/pdf/2914per.pdf>. 24 de septiembre 2007.
- FAO, 2012. Phenotypic characterization of animal genetic resources. Animal Production and Help Guidelines N° 11. Rome. ISBN 978-92-5-107199-1.
- Felsenstein, J., 2004. Phylogeny Inference Package PHYLIP. ver. 3.6. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Fernandez-Baca, S., 1994. Genetic erosion on Camelidae. Animal Genetic Resources Information, FAO, 97-105.
- Frank, E.N., 1997. Mejoramiento genético en Camélidos Sudamericanos Domésticos. Una propuesta para la población argentina. En: Frank, E.N. (Ed.) Actas 2do Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos. pp., 51-75.
- Frank, E.N., Hick, M.V.H., Lamas, H.E., Gauna, C.D. Molina, M.G., 2006. Effects of age-class, shearing interval, fleece and colour types on fibre quality and production in Argentine Llamas. *Small Rumin. Res.* 74, 113-118.
- Gentry, A., Clutton-Brock, J., Groves, C.P., 2004. The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal Archaeological Science* 31, 645-651.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A.T., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., 1995.

- Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetic* 139, 307-920.
- Gong, H., Zhou, H., Yu, Zhidong., Dyer, J., Plowman, J.E., Hickford, J., 2011. Identification of the ovine Keratin-associated protein KAP1-2 gene (KRTAP1-2). *Experimental Dermatology* 20, 815-819. Doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01333.x
- Gutiérrez, J.P., Goyache, F., Burgos, A., Cervantes, I., 2009. Genetic analysis of six production traits in Peruvian alpacas. *Livestock Science* 123, 193-197.
- Hanotte, O., Bradley, D.G., Ochieng, J.W., Verjee, Y., Hill, E.W., Rege, J.E., 2002. African pastoralism: Genetics imprints of origins and migrations. *Science* 296, 336-39.
- Henderson, C.R., 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model *Biometrics* 31, 423 - 439.
- Hoffman, E., Fowler, M.E., 1995. *The Alpaca book*. Clay Press Inc., Herald, California.
- Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K.M., Snelling, W.M., Kappes, S.M., Beattie, C.W., Bennett, G.L., Sugimoto, Y., 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.*, 14, 1987-1998.
- Incalpaca TPX, 2012. <http://www.incalpaca.com/es/fibras/camelidos/alpaca>
- Itenge-Mweza, T.O., Forrest, R.H.J., McKenzie, G.W., Hogan, A., Abbott, J., Amofo, O., Hickford, J.G.H., 2007. Polymorphism of the KAP1.1, KAP1.3 and K33 genes in Merino sheep. *Mol. Cell. Probes* 21, 338-342.
- Jarne, P., Lagoda, P.J., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 424-429.
- Jáuregui, V., Bonilla, G., 1991. Productividad de carne, fibra y cuero en alpacas y llamas. XIV Reunión Científica APPA.
- Jin, M., Wang, L., Li, S., Xing, M.X., 2011. Characterization and expression analysis of KAP7.1, KAP8.2 gene in Liaoning new-breeding cashmere goat hair follicle. *Mol. Biol. Rep.*, 38, 3023-3028.
- Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H.F., Baldi, R., Wheeler, J.C., Rosadio, R., Bruford, M.W., 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of llama and alpaca. *Proceeding of the Royal Society London B.*, 268, 2575-2584.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.*, 16, 1099-106.
- La Manna, V., La Terza, A., Dharaneedharam, S., Ghezzi, S., Arumugam, S., Apaza, N., Huanca, T., Bozzi, R., Renieri, C., 2011. A microsatellite

- study on the genetic distance between Suri and Huacaya phenotypes in Peruvian alpaca (*Vicugna pacos*). In: Fibre Production in South American Camelids and other Fibre Animals. Wageningen Academic Publishers, pp. 151-157.
- Lang, K.D.M., Wang, Y., Plante, Y., 1996. Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Anim. Genet.*, 27, 285-294.
- León-Velarde, C.U., Guerrero, J., 2001. Improving quantity and quality of Alpaca fibre; using a simulation model for breeding strategies. <http://inrm.cip.cgiar.org/home/publicat/01cpb023.pdf>
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Human Genet.*, 44, 397-401.
- Luikart, G.L., Cornuet, J.M., 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12, 228-237.
- Lupton, C.J., McColl, A., Stobart, R.H., 2006. Fibre characteristics of the Huacaya Alpaca. *Small Rumin. Res.*, 64, 211-224.
- MacHugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., Bradley, D.G., 1997. Microsatellite DNA variation and evolution, domestication and phylogeography of taurine and sebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071-1086.
- Maddox, J.F., Davies, K.P., Crawford, A.M., Hulme, D.J., Vaiman, D., Cribru, E.P., Freking, B.A., Beh, K.J., Cockett, N.E., Kang, N., Riffkin, C.D., Drinkwater, R., Moore, S.S., et al., 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.*, 11, 1275-1289.
- Maddox, J.K., Davies, K.P., Crawford, A.M., Hulme, D.J., Vaiman, D., Cribru, E.P., Freking, B.A., Beh, K.J., Cockett, N.E., Kang, N., Riffkin, C.D., Drinkwater, R., Moore, S.S., Dodds, K.G., Lumsden, J.M., Van Stijin, T.C., Phua, S.H., Adelson, D.L., Burkin, H.R., Broom, J.E., Buitkamp, J., Cambridge, L., Cushwa, W.T., Gerard, E., Galloway, S.M., Harrison, B., Hawken, R.J., Hiendleder, S., Henry, H.M., Medrano, J.F., Paterson, K.A., Schibler, L., Stone, R.T., Van Hest, B., 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.*, 11, 1275-1289.
- Mamáni, Y.G., 1991. Parámetros genéticos del peso vivo y vellón en alpacas Wacaya de La Raya - Puno. VII Conv. Int. Especialistas en Cam. Sud., Jujuy, Argentine.
- Mariasegaram, M., Pullenayegum, S., Jahabar Ali, M., Shah, R.S., Penedo, M.C.T., Wernery, U., Sasse, J., 2002. Isolation and characterization of eight microsatellite markers in *Camelus dromedarius* and cross-species

- amplification in *C. bactrianus* and *Lama pacos*. *Anim. Genet.*, 33, 377-405.
- Marín, J.C., Zapata, B., González, B.A., Bonacic, C., Wheeler, J.C., Casey, C., Bruford, M.W., Palma, E., Poulin, E., Alliende, A., Spotorno, E., 2007. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena Historia Natural*. 80, 121-140.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639-55.
- Maté, M.L., Bustamante, A.V., Giovambattista, G., De la Lamo, D., Thüngen, J., Zambelli, A., et al., 2005. Genetic diversity and differentiation of guanaco populations. *Anim. Genet.*, 36, 316-321.
- McGregor, B.A., 2006. Production, attributes and relative value of alpaca fleeces in southern Australia and implications for industry development. *Small Rumin. Res.* 61, 93-111.
- McGregor, B.A., Butler, K.L., 2004. Sources of variation in fibre diameter attributes of Australian Alpacas and implications for fleece evaluation and animal selection. *Aust. J. Agric. Res.* 55, 433-442.
- McPartlan, H.C., Matthews, M.E., Robinson, N.A., 1998. Alpaca microsatellite at the VIAS A1 and VIAS A2 loci. *Anim. Genet.* 29, 150-160.
- Melo, C. 2007. Diámetro de fibra en alpacas Huacaya ganadoras en ocho ferias agropecuarias y su relación con el porcentaje de medulas y número de rizo. Tesis. Med. Vet. Zoot. FMVZ. UNA. Puno, Perú.
- Membrillo, A., 2011. Desarrollo de una herramienta genómica basada en los polimorfismos de bases individuales (SNP), para la identificación del cerdo Ibérico, la trazabilidad de sus productos y la certificación de la Norma de Calidad del mismo. Tesis Doctoral. Departamento de Genética, Universidad de Córdoba. España.
- Membrillo, A., Clemente, I., Azor, P.J., Avilés, C., Jiménez, A.M., Santos, E., Rodero, A., Dorado, G., Molina, A., 2008. Estudio de la secuencia completa del ADN mitocondrial de 4 razas porcinas para el desarrollo de una herramienta molecular que certifique el origen materno en el ámbito de la norma de calidad del Cerdo Ibérico. *ITEA*, Vol. 104 (2).
- Meyer, K., 2006. WOMBAT: Digging deep for quantitative genetic analyses by restricted maximum likelihood. *Proc. 8th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod. Communication No.* 27-14.
- Meyer, K., 2007. WOMBAT: A tool for mixed model analyses in quantitative genetics by REML. *J. Zhejiang Uni. Sci.* B8, 815-821.
- Montes, M.I., Quicaño, I., Quispe, R., Quispe, E.C., Alfonso, L., 2008. Quality characteristics of Huacaya Alpaca fibre produced in the Peruvian Andean

- Plateau region of Huancavelica. Spanish Journal of Agricultural Research 6, 33-38.
- Mortimer, S.I., Robinson, D.L., Atkins, K.D., Brien, F.D., Swan, A.A., Taylor, P.J., Fogarty, N.M., 2009. Genetic parameters for visually assessed traits and their relationships to wool production and live weight in Australian Merino Sheep. *Anim. Prod. Sci.* 49, 32-42.
- Munyard, K.A., Ledger, J.M., Lee, C.Y., Babra, C., Groth, D.M., 2009. Characterization and multiplex genotyping of alpaca tetranucleotide microsatellite markers. *Small Rumin. Res.*, 85, 153-156.
- Negrini, R., Nicoloso, L., Crepaldi, P., Milanesi, E., Colli, L., Chegdani, F., Pariset, L., Dunner, S., Leveziel, H., Williams, J.L., Ajmone Marsan, P., 2008. Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. *Animal Genetics*, 40, 18-26.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
- Nei, M., Takezaki, N., 1994. Estimation of genetic distance and phylogenetic trees from DNA analysis. In Smith, C., et al. (Ed.), *Proceeding of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, vol. 21. University of Guelph, Canada, pp. 405-412.
- Nieto, L., Alejos, I., 1999. Estado económico y productivo del Centro de Producción e Investigación de Camélidos Sudamericanos–Lachocc. XXI Reunión Científica Anual APPA.
- Novoa, A.C., Wheeler, J.C., 1984. Llama y alpaca. En: *Evolution of domesticated animals*, Ed. Mason IL, 116-128. Longman, London, United Kingdom.
- Novoa, C., 1981. La conservación de especies nativas en America Latina. *Animal Genetic Resources*, FAO, 349-361.
- Novoa, C., 1990. Endangered South American Camelids. *AGRI* 80, 255-262.
- Obreque, V., Coogle, L., Henney, P.J., Bailey, E., Mancilla, R., García-Huidobro, J., Hinrichsen, P., Cothran, E. G., 1998. Characterization of 10 polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. *Anim. Genet.* 29, 460-477.
- Obreque, V., Mancilla, R., García, J., Cothran, E. G., Hinrichsen, P., 1999. Thirteen new dinucleotide microsatellites in alpaca. *Anim. Genet.* 30, 382-405.
- Oldenbroek, J.K., 1999. *Gene banks and the conservation of farm animal genetic resources*. Lelystad, The Netherlands: DLO Institute for Animal Sciences and Health.

- Oria, I., Quicaño, I., Quispe, E., Alfonso, L., 2009. Variabilidad del color de la fibra de alpaca en la zona altoandina de Huancavelica. Perú. *Animal Genetic Resources Information*, FAO., 45, 79-84. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1102t/i1102t00.pdf>.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., Estoup, A., 2004. Genetic assignment methods for the direct, real time estimation of migration rate: a simulation based exploration of accuracy and power. *Mol. Ecol.* 13,55-65.
- Paredes, M.M., Alonso, A., Analla, M., Machaca, J.E., Muñoz, A., 2011. Genetic parameters and fixed effects estimation for fibre traits in alpaca Huacaya (*Lama pacos*). *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 1484-1487.
- Paredes, M.M., Membrillo, A., Azor, P.J., Machaca, J., Torres, D., Muñoz Serrano, A., 2012. Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Small Rumin. Res.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.09.017>
- Parsons, Y.M., Cooper, D.W., Piper, L.R., 1994. Evidence of linkage between high-glycine-tyrosine keratin gene loci and wool fiber diameter in a merino half-sib family. *Animal Genetics* 25, 108-108.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5., genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics* In press. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Penedo, M.C.T., Caetano, A. R., Cordova, K., 1998b. Eight microsatellite markers for South American camelids. *Anim. Genet.*, 30, 161-168.
- Penedo, M.C.T., Caetano, A. R., Cordova, K.I., 1998a. Microsatellite markers for South American camelids. *Anim. Genet.*, 29, 398-413.
- Penedo, M.C.T., Caetano, A.R., Cordova, K.I., 1999. Six microsatellite markers for South American camelids. *Anim. Genet.*, 30, 382-405.
- Pérez-Cabal, M.A., Cervantes, I., Morante, R., Burgos, A., Goyache, F., Gutierrez, J.P., 2010. Analysis of the existence of major genes affecting alpaca fiber traits. *J. Anim. Sci.*, 88, 3783-3788.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004. GENECLASS2: A software for Genetic Assignment and First Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity.* 95, 536-539.
- Plan Maestro de la RNSAB (Reserva Nacional de Salinas y Aguada Blanca) Arequipa-Moquegua, 2006-2011. Instituto Nacional de Recursos Naturales INRENA Intendencia de Áreas Naturales Protegidas IANP, Proyecto de Gestión Participativa en Áreas Naturales GPAN-PROFONANPE, Perú. <http://ucsm.edu.pe/SIAR/siar/media/PlanMaestroRnsab2006a2011.pdf>.
- Ponz, R., Moreno, C., Allain D., Elsen, J.M., Lantier, F., Lantier, I., Brunel, J.C., Pérez-Enciso, M., 2001. Assessment of genetic variation explained

- by markers for wool traits in sheep via a segment mapping approach. *Mamm. Genome* 12, 569-572.
- Ponzoni, R.W., Grimson, R.J., Hill, J.A., Hubbard, D.J., McGregor, B.A., Howse, A., Carmichale, I., Judson, G.J., 1999. The inheritance of and associations among some production traits in young Australian Alpacas. In: *Proc. Aust. Assoc. Advancement of Animal Breeding and Genetics* 13, 468–471.
- Presciuttini, S., Valbonesi, A., Apaza, N., Antonini, M., Huanca, T., Renieri, C., 2010. Fleece variation in alpaca (*Vicugna pacos*) a two-locus model for the Suri/Huacaya phenotype. *BMC. Genetics.*, 11, 70.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Pumayalla, A., Leyva, C., 1988. Production and technology of the alpaca and vicuña fleece. *Proceedings of the 1st. international symposium on speciality fibres, DWI, Aacen*, pp. 234 -241.
- Quispe E.C., Rodríguez T.C., Iñiguez L.R., Mueller J.P., 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*. 45, 1-14.
- Quispe, E.C., Mueller, J.P., Ruiz, J., Alfonso, L., Gutierrez, G., 2008. Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos. Universidad Nacional de Huancavelica. Primera Edición. Huancavelica, Perú, pp. 93-112.
- Rannala, B., Mountain, J.L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9197-9201.
- Reed, K.M, Chaves, L.D., 2008. Simple sequence repeats for genetic studies of alpaca. *Animal Biotech.*, 19, 243-309.
- Reigadas, M.C. 2001. Variabilidad y cambio cultural en el NOA desde los comienzos de la domesticación animal hasta la consolidación de las adaptaciones pastoriles. Tesis Filosofía, Universidad de Buenos Aires.
- Renieri, C. Frank, E.N., Rosati, A.Y., Antonini, M., 2009. Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources Information*. 45, 45-54.
- Renieri, C., Antonini, M., Frank, E., 2004. Fibre recording systems in camelids. In: *Current status of genetic resources, recording and production system in African, Asian and American Camelids*. ICAR Technical Series 11, 131-141.
- Renieri, C., Trabalza Marinucci, M., Martino, G., Giordano, G., 1991. Preliminary survey on fibre quality and on coat colour in pigmented alpaca [*Lama glama pacos* PF]). En: *Proc. XXI Italian. Nat. Cong. ASPA*, pp. 905–914.

- Renieri, C., Valbonesi, A., La Manna, V., Antonini, M., Asparrin, M., 2008. Inheritance of Suri and Huacaya type of fleece in alpaca. *Ital. J. Anim. Sci.* 8, 83-91.
- Reynolds, J., Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1983. Estimation on the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distances. *Genetic* 105, 767-779.
- Rodríguez, J., Wheeler, J., Dodd, C., Bruford, M., Rosadio, R., 2004. Determinación de parentesco en alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis del ADN microsatélite. *Rev. Inv. Vet., Perú* 15(2), 113-119.
- Rogers, G.R., Hickford, J.G.H., Bickerstaffe, R., 1994. Polymorphism in two genes for B2 sulfur proteins of wool. *Anim. Genet.*, 25, 407-415.
- Roque, J., M. Carpio., R. Blackwell, 1985. Transmisión hereditaria de peso vivo y longitud de mecha en Alpacas. *Conv. Int. Esp. Cam. Sud. Cusco. Perú.*
- Ruiz De Castilla, M., G. Alagon Huallpa and C.R. Quirita Bejar, 1992. Estudio de parámetros genéticos en Alpacas Huacaya. Informe de trabajos de investigación en Alpacas y Llamas de color. Vol. II: 1-28.
- Ruiz De Castilla, M., Olaguibel de Olivera, O., 1991. Estudio preliminar del rendimiento y de las características físicas más importantes de la fibra de Alpaca de color. En: Informe de trabajos de investigación en Alpacas y Llamas de color. Volumen I (fibras), 19-69.
- Ruiz, E. y Castillo, M.S., 1991. Protección y conservación de alpacas de color de la raza Huacaya en la sub Región Puno. Puno.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sarno, R.J., González, B.A., Bonacic, C., Zapata, B., O'Brien, S.J., Johnson, W.E., 2009. Molecular genetic evidence for social group disruption of wild vicuñas *Vicugna vicugna* captured for wool harvest in Chile. *Small Rumin. Res.*, 84, 28-34.
- Sarno, R., David, V., Franklin, W., O'Brien, S., Johnson, W., 2000. Development of microsatellite markers in the guanaco, *Lama guanicoe*: utility for South American camelids. *Mol. Ecol.* 9, 1919-1952.
- Sarno, R.J., Villalba, L., Bonacic, C., González, B., Zapata, B., Mac Donald, D.W., O'Brien, S.J., Jonson, W.E., 2004. Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellite markers: implications for vicuñas conservation and management. *Conserve Genet.* 5, 89-102.
- SAS Institute Inc., 2003. The Analyst Application, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.

- Sasse, J., Mariasegaram, M., Babu, R., Kinne, J., Wernery, U., 1999. South American camelid microsatellite amplification in *Camelus dromedarius*. *Anim. Genet.*, 31, 68-79.
- Schlötterer, C., Harr, B., 2001. Microsatellite Instability. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, London, pp. 1-4.
- Schmid, S., Lehmann, B., Kreuzer, M., Gómez, C., Gerwig, C., 2006. The value chain of alpaca fiber in Peru, an economic analysis. Tesis de Master. Swiss Federal Institute of Technology Zurich. Switzerland.
- Seaton, G., Haley, C.S., Knott, S., Kearsley, M., Visscher, P., 2002. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18, 339-340.
- Sölkner, J., Nakimbugwe, H., Valle Zárate, A., 1998. Analysis of determinants for success and failure of villaje breeding programmes. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Armidale, Australia, 12-16 January.
- Spelman, R.J., Bovenhuis, H., 1998. Moving from QTL experimental results to utilization of QTL in breeding program. *Anim. Genet.*, 29, 77-84.
- Spencer, P.B.S., Woolnough, A.P., 2010. Assessment and genetic characterization of Australian camels using microsatellite polymorphisms. *Livest. Sci.*, 129, 241-245.
- Sponenberg, D.P., 1997. Genetics of colour and hair texture, In: Piper, L.R., Ruvinsky, A. (Eds.), *The Genetics of Sheep*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 51-86.
- Stat Soft. INC., (2007). *Statistica* (data analysis software system). Version 8.0.
- Sun, J.T., Lian, Ch., Navajas, M., Hong, X.Y., 2012. Microsatellite reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BMC Genetics* 13, 8.
- Swinburn, D.J., Laing, R.M., Niven, B.E., 1995. Development of Alpaca and Alpaca/Wool blend Knitwear fabrics: In: the 9 th Int. Wool Text. Res. Conf. Fine Animal fibres Sec., 2, 536-544.
- Takezaki, N., Nei, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic tree from microsatellite DNA. *Genetic*. 144, 389-399.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general sources for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17, 6463-6471.
- Tibary, A., Steve, M., 2005. Department of Veterinary Clinical Science, College of Veterinary Medicine Washington State University. Pullman, USA.
- Torres, D., Lencinas, M., Cáceres, Yezelia., 2011. Gestión sostenible de los camélidos: tecnología y valor agregado en la crianza campesina. DESCO (Centro de Estudios y Promoción del desarrollo), Perú, http://www.desco.org.pe/apc-aa-iles/d38fb34df77ec8a36839f7aad10def69/gestion_camelidos_prs_VF.pdf

- Trejo, W., 1986. Estudio de la correlación fenotípica entre el diámetro de fibra y la escala de colores en Alpacas. Tesis UNALM. Lima, Perú.
- UNIDO (United Nations Industrial Development Organization), 2006. Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área altoandina de Bolivia, Ecuador y Perú http://www.unido.org/fileadmin/import/58563_camelidos_final.pdf.
- UNIDO (United Nations Industrial Development Organization), 2010. Estado de la situación del sector textil camélidos en El Perú (Diagnóstico nacional). TF-AND-TEX-006-V3.01.05.10. <http://www.alpacadelperu.pe/web/diagnostico.pdf>.
- Valera, M., Galisteo, A.M., Molina, A., Miró, F., Gómez, M.D., Cano, M.R., 2008. Genetic parameters of biokinematic variables of the trot in Spanish Purebred horses under experimental treadmill conditions. *The veterinary Journal* 178, 219-226.
- Velarde, R., 1988. Comercialización de la fibra de alpaca. En: Flores Ochoa, J.A. Llamichos y Paqocheros. Pastores de Llamas y Alpacas. C.E.A.C. Cuzco, Perú.
- Velasco J., 1980. Heredabilidades y correlaciones de peso corporal y peso de vellón en Alpacas. *Anal. III Reun. Asoc. Per. Prod. Anim. Lima. Perú* (Abstract).
- Villarreal, J., 1991. Las fibras (The fibres). En: Fernandez-Baca, S (Ed.). *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. FAO Reg. Offic., 363-386.
- Visser, C., Van Marle-Köster, E., Bovenhuis, H., Crooijmans, R.P.M.A., 2011. QTL for mohair traits in South African Angora goats. *Small Rumin. Res.*, 100, 8-14.
- Wang, X., Wang, L., Liu, X., 2003. The Quality and Processing Performance of Alpaca Fibres: Australian Alpaca fibre industry and the fibre properties. <http://www.rirdc.gov.au/reports/RNF/03-128.pdf>.
- Watanabe, T.K., Bihoreau, M.T., McCarthy, L.C., Kiguwa, S.L., Hishigaki, H., Tsuji, A., Browne, J., Yamasaki, Y., Mizoguchi-Miyakita, A., Oga, K., Ono, T., Okuno, S., Kanemoto, N., Takahashi, E., Tomita, K., Hayashi, H., Adachi, M., Webber, C., Davis, M., Kiel, S., Knights, C., Smith, A., Critcher, R., Miller, J., James, R.M., et al., 1999. A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. *Natur. Genet.*, 22, 27-36.
- Weber, J.L., May, P., 1989. Abundant class of human DNA Polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Human Genet.*, 44, 388.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38, 1358-70.

- Weller, J.I., 2001. Quantitative Trait Loci Analysis in Animals. CABI, New York.
- Wheeler, J.C. 1991. Origen, evolución y status actual. In S. Fernández-Baca (Ed.). Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos Sudamericanos. Santiago, FAO, 11-48.
- Wheeler, J.C., Fernández, M., Rosadio, R., Hoces, D., Kadwell, M., Bruford, M.W., 2001. Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú. *Revista Virtual Visión Veterinaria, Perú.* 1, 170-183.
- Wheeler, J.C., Russel, A.J.F., Redden, H., 1995. Llamas and Alpacas: pre-conquest breeds and post-conquest hybrids. *Journal of Archaeological Science* 22, 833-840.
- Wheeler, J.C., Russel, A.J.F., Redden, H., 1995. Llamas and alpacas: Pre-conquest breeds and post-conquest Hybrids. *Journal of Archaeological* 22, 833-840.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.* 19, 395-420.
- Wuliji, T., Davis, G., Turner, P.R., Andrew, R.N., Bruce, G.D., 2000. Production performance, repeatability and heritability estimates for live weight, fleece weight and fibre characteristics of alpacas in New Zealand. *Small Rumin. Res.* 37, 189-201.
- Xing, I., Lijing, W., Xungai, W., 2004. Evaluating the Softness of Animal Fibers. *Textile Research Journal* 74, 535-538.
- Xungai, W., Lijing, W., Xiu, L., 2003. The Quality and processing performance of alpaca fibres. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No 03/128. Australia. pp. 119.
- Zishiri, O.T., Cloete, S.W.P., Olivier, J.J., Dzama, K., 2012. Genetic parameter estimates for subjectively assessed and objectively measured traits in South African Dorper sheep. *Small Rumin. Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.014>.
- Pacomarca S.A. <http://www.pacomarca.com/>
- INIA., 2006. Instituto Nacional de Investigación Agraria. <http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0021/>
- IPAC Instituto Peruano de Alpacas y Camélidos. <http://alpacadelperu.pe/web/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=90>
- Norma Técnica Peruana., 2004. NTP. 231.300. Fibra de Alpaca clasificada-Definiciones, clasificaciones por grupos de calidades, requisitos y rótulos. INDECOPI. Perú., <http://www.ipacperu.org/pntp231301.php.htm>