

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA



Evaluación de la hibridación entre llamas y alpacas en
poblaciones bolivianas con el uso de marcadores del cromosoma
“Y” y ADN mitocondrial

Tesis para optar al Título de Magister Scientiarum
Por: Alejandra Del Pilar Román Peña

LA PAZ – BOLIVIA 2021

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA



Evaluación de la hibridación entre llamas y alpacas en
poblaciones bolivianas con el uso de marcadores del cromosoma
“Y” y ADN mitocondrial

Tesis para optar al Título de Magister Scientiarum
Por: Alejandra Del Pilar Román Peña

Tutora: Julia Barreta Pinto PhD.
Co-Tutora: Volga Iñiguez Rojas PhD.

LA PAZ – BOLIVIA 2021



INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Universidad Mayor de San Andrés

Facultad de Ciencias Puras y Naturales

Campus Universitario Cota-Cota, Calle 27 s/n, telf. 2612815

A QUIEN CORRESPONDA

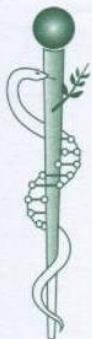
En calidad de tutoras de la tesis de maestría titulada “Evaluación de la hibridación entre llamas y alpacas en poblaciones bolivianas con el uso de marcadores del cromosoma “Y” y ADN mitocondrial”, realizada por la Lic. Alejandra Del Pilar Román Peña con C.I. 6755094 L.P., deseamos comunicar que el trabajo de la candidata ya ha sido evaluado y aprobado por los revisores internacionales y presenta una calidad suficiente para proceder con los trámites de defensa pública de acuerdo a las normas universitarias vigentes.



Julia Barreta Pinto Ph.D
Tutora



Volga Iniguez Rojas Ph.D
Cotutora



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

MENCIÓN: GENÉTICA DE POBLACIONES

UNIDADES ACADÉMICAS
PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO
DE INMUNOLOGÍA
PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
FARMACO BIOQUÍMICAS
Facultad de Ciencias
Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLÓGIA
MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE
INVESTIGACION DEL
INSTITUT DE RECHERCHE
POUR LE DÉVELOPPEMENT
IRD - FRANCIA

Fecha: Reino Unido, Treinta (30) de 2021
Institución: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología
Título del Tema: EVALUACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN ENTRE LLAMAS Y ALPACAS EN POBLACIONES BOLIVIANAS CON EL USO DE MARCADORES DEL CROMOSOMA "Y" Y ADN MITOCONDRIAL
Postulante: Lic. Alejandra del Pilar Román Peña
Tutor: Volga Iñiguez Rojas Ph. D.
Julia Barreta Pinto Ph. D.
Revisor: Adriana Vallejo Trujillo Ph. D.
Institución: CELLS, ORGANISMS AND MOLECULAR GENETICS, SCHOOL OF LIFE SCIENCES, UNIVERSITY OF NOTTINGHAM
Nottingham – Reino Unido

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos de Trabajo	30%	27
2	Revisión Bibliográfica	25%	25
3	Protocolo de Investigación	20%	18
4	Claridad del documento presentado	15%	15
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	10
TOTAL		100%	95

Comentarios:

Esta tesis constituye una contribución importante para elucidar patrones de introgresión en camélidos sudamericanos domésticos. Presenta una metodología sistemática que en combinación con los métodos estadísticos provee resultados verificables que soportan las hipótesis y permiten el cumplimiento de los objetivos planteados. El documento demuestra buenos estándares en su construcción y presentación, y refleja un buen conocimiento del tema. Como sugerencia para publicaciones posteriores sobre estos resultados, sería importante profundizar en las limitantes del uso de este tipo de marcadores en el estudio de introgresión. Así mismo, plantear el potencial de los resultados y su aplicabilidad en la crianza de alpacas y llamas, en particular en las poblaciones que fueron contempladas en el estudio.

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 61%

Adriana Rocío Vallejo Trujillo

FIRMA REVISOR

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: maebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)



UNIDADES ACADEMICAS PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENETICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO DE INMUNOLOGIA PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE INVESTIGACION DEL INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT IRD - FRANCIA

MENCIÓN: GENETICA DE POBLACIONES

Fecha: España, 23 de Septiembre de 2021
Institución: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología
Título del Tema: EVALUACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN ENTRE LLAMAS Y ALPACAS EN POBLACIONES BOLIVIANAS CON EL USO DE MARCADORES DEL CROMOSOMA "Y" Y ADN MITOCONDRIAL
Postulante: Lic. Alejandra del Pilar Román Peña
Tutor: Volga Iñiguez Rojas Ph. D.
Julia Barreta Pinto Ph. D.
Revisor: Beatriz Gutierrez Gil Ph. D.
Institución: UNIVERSIDAD DE LEÓN
España

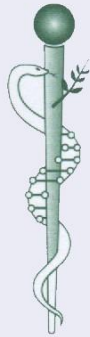
Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos de Trabajo	30%	28%
2	Revisión Bibliográfica	25%	25%
3	Protocolo de Investigación	20%	20%
4	Claridad del documento presentado	15%	14%
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	10%
TOTAL		100%	97%

Comentarios:

La tesis evaluada representa un trabajo científico de alta calidad. La Introducción y Antecedentes exponen la situación de partida en base a una profunda revisión bibliográfica. Los métodos aplicados son correctos y se describen de forma adecuada. Los resultados se exponen y discuten de forma sistemática y con ayuda de valiosas figuras y tablas. Mi valoración es muy positiva.

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 61%

FIRMA REVISOR



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS

MENCIÓN: GENÉTICA DE POBLACIONES

UNIDADES ACADÉMICAS
PARTICIPANTES:

INSTITUTO DE GENÉTICA
Facultad de Medicina

LABORATORIO
DE INMUNOLOGÍA
PARASITARIA
Departamento de Patología
Facultad de Medicina

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
FARMACO BIQUÍMICAS
Facultad de Ciencias
Farmacéuticas y Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA
Facultad de Ciencias Exactas

UNIDADES DE
INVESTIGACIÓN DEL
INSTITUT DE RECHERCHE
POUR LE DÉVELOPPEMENT
IRD - FRANCIA

Fecha: La Molina, 01 de octubre de 2021
Institución: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología
Título del Tema: EVALUACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN ENTRE LLAMAS Y ALPACAS EN POBLACIONES BOLIVIANAS CON EL USO DE MARCADORES DEL CROMOSOMA "Y" Y ADN MITOCONDRIAL
Postulante: Lic. Alejandra del Pilar Román Peña
Tutor: Volga Iñiguez Rojas Ph. D.
Julia Barreta Pinto Ph. D.
Revisor: Juan Chavez Ph. D.
Institución: PROFESOR UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Lima Perú

Nº	CALIFICACIÓN SOBRE EL 100% EN BASE A:	PORCENTAJE	CALIFICACIÓN
1	Presentación de Resultados y Proyectos de Trabajo	30%	25
2	Revisión Bibliográfica	25%	25
3	Protocolo de Investigación	20%	20
4	Claridad del documento presentado	15%	12
5	Cumplimiento de hipótesis y objetivos	10%	9
TOTAL		100%	91

Comentarios:

Un trabajo de investigación muy original y bien desarrollado, que necesita solamente mejorar su redacción y aclarar mejor algunos puntos vinculados más a la forma que al fondo.

NOTA.- La calificación mínima de aprobación es de 61%


FIRMA REVISOR

Ing. Juan Chávez Cossío, Ph.D.

POSTGRADO: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Dirección: Av. Saavedra N° 2224 - Piso 4 - Teléfonos: 2612420 - Fax: 2243320 - Cs. Farm. y Bioq.
E-mail: fñaebiobio@hotmail.com - Casilla N° 3239 - La Paz - Bolivia (Sud América)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis tutoras, Julia Barreta y Volga Iñiguez por sus enseñanzas, apoyo y confianza en el desarrollo de la tesis, como también por la oportunidad de trabajar a su lado.

A los productores de ganado camélido de las áreas de estudio por su disposición y apoyo en la toma de muestras.

Al equipo de trabajo del proyecto “Contribución al Manejo y Conservación de rebaños de llamas Tiutiri en el Altiplano Boliviano”.

Agradezco al Instituto de Biología Molecular, a las personas que trabajan en las diferentes áreas de investigación. En especial a Jorge Quezada, Carmen Ormachea y Leonarda Achá por su apoyo y amistad.

A mis padres, hermanas y hermano por su gran apoyo y cariño en cada momento. A mi sobrina Adrianita por su compañía y alegría.

A las llamas y alpacas de las cuales se pudo obtener las muestras, sin las cuales no hubiera sido posible el desarrollo de la investigación.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes	5
2.1. Camélidos sudamericanos	5
2.1.1. Distribución y Hábitat	5
2.2. Biología de alpacas y llamas	6
2.3. Reproducción y estructura social	6
2.4. Crianza y manejo.....	7
2.5. Interés productivo.....	8
2.6. Evolución de los camélidos	8
2.6.1. Especiación y domesticación de llamas y alpacas.....	9
2.7. Flujo génico e hibridación.....	10
2.7.1. Hibridación e introgresión entre llamas y alpacas.....	12
2.8. Genética de los camélidos sudamericanos	13
2.8.1. Citogenética.....	13
2.8.2. Marcadores moleculares en estudios con camélidos	14
a) Marcadores tipo microsatélites.....	14
b) Marcadores tipo SNP.....	15
c) Marcadores mitocondriales.....	16
d) Marcadores del cromosoma “Y”	17
e) Aplicación conjunta de marcadores mitocondriales y del cromosoma “Y”	18
2.9. Justificación.....	20
3. Objetivos	21
3.1. Objetivo General	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Materiales y métodos	22
4.1. Área de estudio.....	22

a) Ulla Ulla	22
b) Catacora.....	22
c) Curahuara de Carangas.....	23
4.2. Toma de muestras.....	25
4.3. Extracción de ADN	26
4.4. Validación de Marcadores Moleculares del Cromosoma “Y”	26
4.5. Amplificación del marcador del intrón DBY del cromosoma “Y”	28
4.6. Amplificación de loci SNP de ADN mitocondrial.....	29
4.7. Electroforesis en el gel de agarosa	30
4.8. Secuenciación de fragmentos de amplificación	31
4.9. Análisis de datos.....	31
5. Resultados y Discusión	33
5.1. Selección de marcadores del cromosoma “Y”	33
5.2. Análisis de secuencias del intrón DBY del cromosoma “Y”	35
5.2.1. Diversidad haplotípica y nucleotídica de la secuencia DBY.....	37
5.3. Análisis de secuencias de la región control de ADN mitocondrial.....	40
5.3.1. Diversidad nucleotídica y haplotípica de la región control de ADN mitocondrial.....	46
5.3.2. Distribución geográfica de haplotipos mitocondriales	48
5.4. Hibridación e introgresión entre llamas y alpacas con haplotipos mitocondriales y del cromosoma “Y”	50
6. Conclusiones	57
7. Limitaciones del estudio y recomendaciones.....	58
8. Bibliografía.....	60
ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado y procedencia de individuos muestreados y secuencias.....	25
Tabla 2. Marcadores moleculares del cromosoma "Y" testeados	27
Tabla 3. Condiciones de PCR aplicadas a los marcadores moleculares del cromosoma "Y"	28
Tabla 4. Muestras de individuos macho con secuencia del intrón DBY	29
Tabla 5. Muestras de individuos macho y hembra con secuencia de la región D-Loop.	30
Tabla 6. <i>Primers</i> utilizados para PCR y posterior secuenciación	31
Tabla 7. Sitios polimórficos de los haplotipos DBY.....	35
Tabla 8. Distribución de haplotipos DBY en los grupos de estudio	36
Tabla 9. Valores de Diversidad haplotípica y nucleotídica de DBY por especie	39
Tabla 10. Sitios polimórficos de los haplotipos de la región control de ADN mitocondrial	41
Tabla 11. Número de individuos por haplotipo de ADN mitocondrial por especie	46
Tabla 12. Diversidad haplotípica y nucleotídica de la región control de ADN mitocondrial por especie	47
Tabla 13. Distribución de haplotipos mitocondriales en las poblaciones	48
Tabla 14. Combinación de haplotipo "Y" y mitocondrial por población	53
Tabla 15. Proporciones de la combinación de haplotipos "Y" y mitocondrial por población y especie	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de las zonas de estudio	23
Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología aplicada	24
Figura 3. Productos de amplificación de PCR del intrón DBY	34
Figura 4. Red de haplotipos obtenida con la secuencia del intrón DBY.....	37
Figura 5. Comparación de árbol filogenético Neighbor Joining para las especies de camélidos sudamericanos.....	40
Figura 6. Árbol filogenético de haplotipos mitocondriales.....	44
Figura 7. Red de Haplotipos de la región control de ADN mitocondrial	45
Figura 8. Distribución geográfica de los haplotipos mitocondriales en cada uno de los grupos de estudio	50
Figura 9. Porcentaje de las combinaciones de haplotipos mitocondrial (D-Loop) y del cromosoma “Y” (DBY) en las poblaciones de machos de llamas, huarizos y alpacas... ..	52

Abreviaturas y Acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANMI: Área Natural de Manejo Integrado

ASIP: Proteína de señalización agutí

(F): Forward

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

INE: Instituto Nacional de Estadística

I.B.M.B.: Instituto de Biología Molecular y Biotecnología

H: haplotipo

HG: haplogrupo mitocondrial del género *Lama*

HV: haplogrupo mitocondrial del género *Vicugna*

HYG1: haplotipo del fragmento DBY de guanaco (*Lama guanicoe*)

HYG2: haplotipo del fragmento DBY de llama (*Lama glama*)

HYV: haplotipo del fragmento DBY del género *Vicugna*

MC1R: Receptor de melanocortina 1

Min: Minutos

NGS: Secuenciación de nueva generación

(R): Reverse

s: segundos

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

Evaluación de la hibridación entre llamas y alpacas en poblaciones bolivianas con el uso de marcadores del cromosoma “Y” y ADN mitocondrial

Resumen

La crianza de llamas y alpacas es una actividad económica importante en el altiplano boliviano. En varias regiones, existe crianza mixta con la presencia de rebaños de ambas especies, donde los cruces interespecíficos podrían afectar la producción de fibra y carne. Diversos estudios genéticos han demostrado la introgresión en las poblaciones y genomas de alpacas, lo que ha hecho confusas las relaciones filogenéticas entre camélidos sudamericanos domésticos, así como su posible origen. La aplicación de marcadores moleculares ligados al sexo (mitocondriales y de cromosoma “Y”) permite identificar la dirección de la hibridación entre especies. El objetivo de este estudio fue evaluar la hibridación entre llamas y alpacas, inferida a través del uso de marcadores del cromosoma “Y” (intrón DBY) y mitocondriales (D-Loop) en tres regiones de crianza mixta. Se identificaron tres haplotipos en el intrón DBY y 28 en la región D-Loop. Se encontró un 4,3% de introgresión en llamas y 0,013% en alpacas con el marcador DBY, 58,88% de introgresión en alpacas y 4,48% en llamas con el marcador mitocondrial. En cuanto a la dirección del flujo génico, este fue mayor entre llamas hembra y alpacas macho. El patrón de asimetría del flujo paterno vs. materno, frecuentemente observado en las poblaciones de alpacas de las tres zonas de estudio, podría estar relacionado al manejo reproductivo de los machos de camélidos domésticos, a la hibridación adaptativa en alpacas o a otros efectos de la selección natural. El uso de un solo marcador del cromosoma “Y” limita la interpretación de los resultados a nivel filogenético, por lo que nuevos estudios del genoma de camélidos permitirán evaluar más ampliamente este fenómeno.

Palabras clave: Hibridación, introgresión, cromosoma “Y”, marcador mitocondrial

Evaluation of the hybridization between llamas and alpacas in Bolivian populations using “Y” chromosome and mitochondrial markers

Abstract

Traditional llama's and alpaca's husbandry is an important economic activity in the Bolivian highlands. In several regions, there is mixed raising with the presence of herds of both species, where interspecific crosses could affect the production of fiber and meat. Genetic studies have shown the presence of introgression in the populations and genomes of alpacas, which has confused the phylogenetic relationships and potential origin of domestic South American camelids. The application of sex-linked markers (mitochondrial and Y chromosome) allows to infer the direction of hybridization between species. The objective of this study was to evaluate the hybridization between llamas and alpacas, inferred through the use of markers of the "Y" chromosome (DBY intron) and mitochondrial (D-Loop) in the regions of mixed raising. Three haplotypes were identified in the DBY intron and 28 in the D-Loop region. With the DBY marker; we found 4,3% of introgression in llamas and 0,013% in alpacas, whereas with the DNA mitochondrial marker; 58,88% in alpacas and 4,48% in llamas. In regard to the directionality of the genetic flow, this was higher between female llamas and male alpacas. The asymmetric pattern of the paternal vs. maternal genetic flow, frequently observed among the alpaca populations of the study regions, could be related to the breeding management of camelids males, the adaptive hybridization in alpacas and other effects of the natural selection. The use of a single marker of the “Y” chromosome limits the interpretation of the results at the phylogenetic level, therefore, future genomics studies of domestic camelids, will allow a better characterization of this phenomenon.

Key words: Hybridization, introgression, “Y” chromosome, mitochondrial DNA

1. Introducción

Las llamas y alpacas son importantes económica y culturalmente en la zona altoandina, proveen de recursos como fibra, carne, cuero y transporte; la mayoría de los rebaños pertenecen a pequeños productores, que trabajan con insumos mínimos, bajo condiciones de crianza extensiva con acceso a pasturas naturales (Quispe et al., 2009; FAO, 1996). En algunos casos los rebaños son mixtos, con llamas y alpacas, lo que puede dar lugar a cruces no controlados que deriven en descendencia híbrida (Iñiguez & Alem, 1996). Este proceso de hibridación en alpacas puede afectar potencialmente la calidad de la fibra (Wheeler et al., 2006). Mientras que, en las llamas, el peso de la carcasa es considerablemente mayor al de las alpacas (Cristofanelli et al., 2004) y aunque aún no se cuenta con un análisis sobre el efecto de la hibridación en las características de la carne, este rasgo podría verse afectado.

Diferentes estudios genéticos han demostrado la existencia de hibridación bidireccional entre llamas y alpacas (Kadwell et al. 2001, Barreta et al., 2012, Echalar et al., 2020; Marín et al., 2017). Se ha registrado que cerca del 80% de las alpacas tendrían introgresión de ADN mitocondrial de llama, mientras que el 40% de las llamas presentan evidencia de hibridación con alpacas (Kadwell et al., 2001). Por lo que se ha visto, la diferenciación genética entre llamas y alpacas es menor a la encontrada entre llamas-vicuñas y alpacas-vicuñas (diferenciación medida con microsatélites autosómicos) (Echalar et al., 2020). Asimismo, en el reciente estudio del genoma de camélidos sudamericanos se ha encontrado que una proporción equivalente al 36% del genoma de las alpacas presentaría introgresión proveniente del genoma de llamas (Fan et al., 2020).

La hibridación entre estas especies esta favorecida por sus características reproductivas (Bravo, 1994; Smith et al., 1994) y similitudes genéticas (Larramendy et al., 1983; Zapata, 1999). Los híbridos entre llamas y alpacas, denominados huarizos, son

fértiles y tienden a retrocruzar con cualquiera de los parentales (Wheeler et al., 2006). La introducción del material genético de los híbridos en las poblaciones de las diferentes especies se define como introgresión (Dowling & Secor, 1997; Arnold, 2004).

En llamas y alpacas se han aplicado marcadores microsatélite autosomales y secuencias mitocondriales para estudios de diversidad genética (Burger, 2016; Larramendy et al., 1983; Vidal-Rioja et al., 1994; Wheeler, 1995; Barreta et al., 2013a). La combinación de análisis de secuencias mitocondriales y del cromosoma “Y” permite potencialmente analizar el origen de estas especies y su grado de mezcla (admixture) (Marín et al., 2017). Las secuencias mitocondriales son útiles en estudios filogenéticos y de diversidad genética de varias especies de mamíferos (Nabholz et al., 2008), y junto a los marcadores del cromosoma “Y” permiten determinar la dirección de la hibridación entre especies y evaluar la introgresión (Wheeldon et al., 2013, Bunlungsup et al., 2017; Yamanaka et al., 2019).

En base a estos antecedentes y con el objetivo de comprender mejor el fenómeno de intercambio genético y relaciones filogenéticas entre llamas, alpacas y huarizos en diferentes zonas de crianza de Bolivia, en el presente estudio se analizaron mediante marcadores ligados al cromosoma “Y” (intrón DBY) y mitocondrial (región D-Loop), la dirección del flujo genético y la congruencia inferida a nivel de la herencia materna y paterna.

2. Antecedentes

2.1. Camélidos sudamericanos

Los camélidos son mamíferos herbívoros pertenecientes al Orden Artiodactyla (Bonavia, 2008). La familia Camelidae se divide en dos grupos, uno distribuido en Asia y África y otro en Sudamérica (Jiménez et al., 2010). Los camélidos de Sudamérica incluyen a las especies silvestres vicuña (*Vicugna vicugna*) y guanaco (*Lama guanicoe*) y, a las especies domésticas llama (*Lama glama*) y alpaca (*Vicugna pacos*) (Jiménez et al., 2010; Kadwell et al., 2001; Marín et al., 2007).

2.1.1. Distribución y hábitat

Los camélidos de Sudamérica habitan la puna y zona altoandina, desde el norte de Perú, Bolivia y Chile, hasta el norte de Argentina (Quispe et al., 2009). En una rango altitudinal de 3.800 a 4.500 m (Quispe et al., 2009). El Instituto Nacional de Estadística (INE) de Bolivia estima una población de 2.600.907 llamas y 435.754 alpacas en todo el país para el año 2019 (INE Bolivia, 2019).

En Bolivia, llamas y alpacas habitan zonas del altiplano sujetas a fluctuaciones ambientales y vegetación predominante de gramíneas (Iñiguez & Alem, 1996; Quispe et al., 2009). La llama habita varios niveles, regiones extremas y secas, con mayor concentración en el altiplano sur (Iñiguez & Alem, 1996). Mientras que las alpacas habitan zonas húmedas, de mayor precipitación y disponibilidad de recursos hídricos (como los bofedales) (SERNAP-ANMI Apolobamba, 2006; Quispe et al., 2009). En Bolivia las mayores poblaciones de llamas se distribuyen en los departamentos de Oruro (1.062.062) Potosí (796.093) y La Paz (742.890) (INE Bolivia, 2019). Mientras que la mayor población de alpacas se encuentra en La Paz (306.426) y Oruro (124.149) (INE Bolivia, 2019).

2.2. Biología de alpacas y llamas

Algunas particularidades anatómicas y fisiológicas de los camélidos sudamericanos están relacionadas con la adaptación a condiciones de escasez de oxígeno y forraje en las altitudes en las que habitan (Jiménez et al., 2010). Se alimentan de pastos naturales no siempre disponibles, por lo que se adaptan depositando capas de grasa subcutánea, muscular y retroperitoneal. La eficiencia en extraer los nutrientes de los forrajes se basa en la regurgitación (Jiménez et al., 2010).

Las vicuñas, llamas y alpacas suelen compartir regiones de pastoreo, en especial en prados o bofedales (Bonacic & Australis, 2011). La llama puede adaptarse a una gran diversidad de ambientes y tipos de vegetación, además de tener tolerancia a la sequía (Bonavia, 2008; de Lamo, 2011). La alpaca tiene una dieta selectiva y oportunista, con preferencia por herbáceas. Ramonea cuando hay extrema necesidad y bebe agua diariamente (Bonavia, 2008; de Lamo, 2011).

2.3. Reproducción y estructura social

Guanacos y vicuñas se estructuran en grupos familiares liderados por un macho seguido de cinco a 15 hembras con sus crías y otros grupos sociales compuestos por numerosos machos (Rey et al., 2009; Tomka, 1992). En las especies domésticas, el manejo de las llamas y alpacas, comprende un macho reproductor dominante con sus hembras y crías (Tomka, 1992). Sin embargo, esta estructura está definida por las prácticas de manejo, ya que en algunos casos se aplica una separación física de hembras y machos hasta la época reproductiva (Espejo, 2011).

Los aparatos reproductivos en los camélidos sudamericanos son similares morfo-anatómicamente, al igual que la edad de madurez sexual (Bravo, 1994). La época reproductiva se inicia en diciembre y se extiende hasta marzo, coincidiendo con la época húmeda (Smith et al., 1994). Las hembras de guanacos y vicuñas llegan a la edad reproductiva a los dos años, los machos a partir de los tres años (de Lamo, 2011). La

gestación dura alrededor de 330 y 350 días; la cría permanece con la madre durante un año o hasta el nacimiento de la próxima cría (de Lamo, 2011).

Se determinó que las llamas (en Bolivia) alcanzan la pubertad al año a dos años de edad, con un período de gestación de casi 12 meses (Cardozo, 1985; Tichit & Genin, 1997). El macho de la llama madura sexualmente a los 2,5 a 3 años, sin embargo, jóvenes machos de hasta seis meses son capaces de copular (Johnson, 1989). Las hembras de las alpacas alcanzan la madurez sexual cerca de los 12 meses de edad (Sumar, 1996). Llamas y alpacas pueden quedar preñadas una vez al año, no obstante algunos sistemas productivos esperan dos años en alpacas y tres en llamas, para permitir una mejor nutrición de las crías (Sumar, 1996). El tiempo de gestación en ambas especies es alrededor de hasta 350 días (Smith et al., 1994; Cardozo 1985). En Bolivia la tasa de mortalidad de llamas es de 4,82%, en alpacas de 3,93%, mientras que las tasas de parición alcanzan al 48,86% y 48,45% respectivamente (INE Bolivia, 2019).

2.4. Crianza y manejo

La alimentación de los rebaños depende exclusivamente del pastoreo de praderas nativas, las cuales en ocasiones son sobre pastoreadas (Iñiguez & Alem, 1996). Sin embargo, en algunas zonas existe un mínimo componente de siembras para satisfacer la demanda en base a cultivos andinos tolerantes a las características climáticas (Iñiguez & Alem, 1996). La crianza de estas especies en zonas altoandinas presenta menor impacto en la vegetación y el suelo que el ganado introducido (White, 2010).

El manejo pastoril en el altiplano es muy heterogéneo debido a las limitaciones de los productores de esta zona, quienes pueden tener rebaños mixtos de llamas, alpacas e incluso ovejas (Tichit & Genin, 1997). Los rebaños de camélidos son variables en estructura y tipo de animales, traduciéndose en una variabilidad en caracteres asociados a la producción de fibra y carne (Iñiguez & Alem, 1996; Martínez, 1994). Sin embargo, este tipo de manejo conlleva un mejor aprovechamiento de la diversidad de forraje

natural y se considera una estrategia para encarar riesgos ambientales (Tichit & Genin, 1997).

2.5. Interés productivo

Los camélidos sudamericanos son reconocidos como fuente de fibra para diferentes aplicaciones (Raggi, 2005). De la alpaca y la llama se aprovecha también la carne y el cuero, con diferentes usos industriales y artesanales (Quispe et al., 2009).

En el año 2019 la producción total de fibra de alpacas en Bolivia fue de 152 Tm, mientras que de llamas fue de 700 Tm (INE Bolivia, 2019). Las características más importantes de la fibra para su comercialización son color, peso, longitud y rendimiento (Mueller et al., 2010; Frank et al., 2006). El valor se incrementa si la fibra es poco punzante, uniforme y de menor diámetro (Frank et al., 2006).

Se estima que la producción de carne de llama en Bolivia en el año 2019 ascendió a las 13.409 Tm y la de alpaca a 1.583 Tm (INE Bolivia, 2019). La llama posee mayor potencial para la producción de carne debido al mayor peso de la carcasa y proporción de músculo respecto a la alpaca (Cristofanelli et al., 2005). La carne de llama se caracteriza por un elevado nivel proteico, bajo nivel de colesterol y lípidos y una buena relación de ácidos grasos (Mamani-Linares et al., 2014).

2.6. Evolución de los camélidos

Los camélidos aparecieron en Norteamérica en el Eoceno medio superior, hace cinco millones de años (de Lamo, 2011; Saini & Cabezón, 1990). Producto del avance de los glaciares, hace dos a tres millones de años, los descendientes del *Gigante camelus* migraron a Europa, Asia y Norte de África, mientras que los descendientes del *Macroauchenia* se dirigieron hacia América del Sur (de Lamo, 2011; Saini & Cabezón, 1990).

El género ancestral de los presentes camélidos, *Hemiauchenia*, se diversificó en Sudamérica durante el Pleistoceno, adquiriendo adaptaciones a zonas secas y altas (White, 2010). Esta evolución dio lugar a los géneros *Lama* y *Vicugna* (White, 2010). La evidencia paleontológica y mitocondrial respalda que la separación de estos géneros fue hace dos millones de años (Kadwell et al., 2001; Wheeler et al, 2006). En la historia de los camélidos de Sudamérica existieron factores evolutivos relevantes como cuellos de botella y procesos continuos de hibridación hasta llegar a la actual formación de las cuatro especies (Wheeler, 1995).

2.6.1. Especiación y domesticación de llamas y alpacas

La domesticación de camélidos en Sudamérica tuvo lugar mucho tiempo después de la separación de los géneros *Lama* y *Vicugna* (Jiménez et al., 2010). Los camélidos fueron domesticados en periodos pre-hispánicos en diferentes regiones de los Andes (Mengoni, 2008), con registros de las primeras llamas y alpacas de hace 6.000 a 5.500 años (Wheeler et al, 1995).

El proceso de domesticación involucró un cambio significativo en la historia evolutiva; pasaron de una selección natural a un proceso de selección cultural, generándose modificaciones en su comportamiento y morfología (Gallardo & Yacobaccio, 2005). Mientras que las especies silvestres (vicuñas y guanacos) se organizan en grupos familiares (Gallardo & Yacobaccio, 2005), las llamas y alpacas son manejadas en muchos casos en rebaños con hembras y machos por separado para tener un control sobre la tasa reproductiva (FAO, 1996). Por otra parte, un estudio en los genes relacionados al color (*MC1R* y *ASIP*) demostraron diferenciación (en sitios polimórficos) entre especies silvestres y domésticas de camélidos sudamericanos (Marín et al., 2018).

Se plantean diferentes teorías sobre el origen de la domesticación de estas especies (Wheeler, 1995). Por un lado, que tanto la alpaca y llama provendrían del guanaco

(Kent, 1982). Por otro lado, que la alpaca y la llama habrían derivado de la vicuña y guanaco respectivamente, o que la alpaca se habría domesticado a partir de cruces entre vicuñas y llamas (Wheeler, 1995). Se postula que pudo haber diferentes centros de domesticación de las alpacas, sumado a eventos históricos tempranos de hibridación que derivaron en las actuales poblaciones (Díaz-Maroto et al., 2020). Estas poblaciones presentan altos niveles de introgresión (de llamas) a nivel mitocondrial y nuclear (Barreta et al., 2012; Barreta et al., 2013; Echalar et al., 2020), así como en todo el genoma (Fan et al., 2020).

La hipótesis de que la llama es una forma domesticada del guanaco, y la alpaca provendría de la vicuña se respaldó con datos sobre análisis de la dentadura de las cuatro especies (Stanley et al, 1994; Wheeler, 1995), estudios citogenéticos (Zapata, 1999) y la posterior aplicación de estudios moleculares (Marín et al., 2007). Sin embargo, los numerosos reportes sobre la hibridación que han sufrido poblaciones de llamas y alpacas hacen confusos los análisis filogenéticos de los camélidos sudamericanos (Kadwell et al, 2001, Echalar et al., 2020, Barreta et al., 2012).

Las poblaciones de camélidos en Sudamérica se vieron afectadas por el desarrollo de las sociedades andinas y la llegada de la colonia (Mengoni, 2008). La mayor concentración de llamas siempre ha estado en el altiplano, alrededor del lago Titicaca, zona que se asume como su centro de domesticación (Bonavia, 2008). Después de la domesticación, la llama fue trasladada a zonas de menor elevación y al norte de Chile, por lo que se mencionan domesticaciones paralelas en el norte de Chile y Argentina (Bonavia, 2008). La elevada variabilidad genética (mitocondrial) en llama y alpaca respecto a guanacos y vicuñas apoyarían la hipótesis de varios centros de domesticación en los Andes (Barreta et al., 2013a).

2.7. Flujo génico e hibridación

La hibridación es el apareamiento entre individuos de poblaciones o especies diferentes (genéticamente), mientras que la introducción del material genético extraño en una población o especie, como consecuencia de la hibridación, podría definirse como un proceso de introgresión (Dowling & Secor, 1997; Arnold, 2004). La hibridación tiene un rol importante en la evolución, puede significar una vía para generar diversidad biológica, introgresión de rasgos fenotípicos (introgresión adaptativa) y creación de nuevas especies a través de la especiación híbrida (Seehausen, 2004; Twyford & Ennos, 2012; Taylor & Larson, 2019). Otro aspecto importante es la hibridación antigua, que puede ser detectada mediante las nuevas técnicas de secuenciación y su aplicación en restos fósiles, lo que permite analizar el efecto de la hibridación a largo plazo (Taylor & Larson, 2019).

Cerca del 10% de las especies animales presentan indicios de hibridación y potencial introgresión; esto ocurre en especies aisladas reproductivamente de forma incompleta donde es posible el flujo génico (Mallet, 2005). La identificación de híbridos en las poblaciones se puede dar a tres niveles, el morfológico (por rasgos fenotípicos), genético por la suma de datos de marcadores moleculares y por incongruencias en la filogenia (Rieseberg et al., 2000). El avance de las técnicas moleculares ha permitido profundizar en estos análisis.

Los datos de secuenciación de ADN y otros métodos demuestran invasiones en los genomas de varias especies, lo que es importante para la biología, especiación, biodiversidad y conservación (Mallet, 2005). Algunas especies de mamíferos en las que se determinaron eventos importantes de hibridación fueron los roedores *Mus musculus*/*M. domesticus*, especies de caribú *Rangifer tarandus groenlandicus*/*R. t. caribou*, los murciélagos *Artibeus jamaicensis jamaicensis*/*A. j. planirostris*; cruces que dieron lugar a la generación de nuevas especies o subespecies híbridas (Shurtliff, 2013). La aplicación de la secuenciación de Nueva Generación (NGS) ayuda a comprender la procedencia de

los híbridos y la frecuencia de introgresión (Twyford & Ennos, 2012). Mediante su aplicación se determinó que hubo introgresión durante la domesticación en cruces de yak domesticado y salvaje, posterior a un cuello de botella (Ji et al., 2021). De la misma manera con esta metodología se determinó presencia de introgresión entre ciervos introducidos (*Cervus nippon taiouanus*) y nativos japoneses (*C. n. centralis*), lo que supone un riesgo para la integridad genética de las poblaciones nativas (Matsumoto et al., 2019).

2.7.1. Hibridación e introgresión entre llamas y alpacas

En los camélidos pueden darse cruces entre las cuatro especies de Sudamérica, produciendo descendencia híbrida fértil (Kadwell et al., 2001). Existe una barrera reproductiva incompleta entre las especies de camélidos, ya que incluso pueden generarse artificialmente híbridos entre dromedarios y guanacos (Skidmore et al., 1999). Se ha observado que los órganos reproductivos masculinos en la descendencia de los cruces de camélidos sudamericanos no se ven afectados (Valenzuela-Estrada et al., 2012).

Los híbridos entre llamas y alpacas se denominan huarizos (en el idioma aymara); estos individuos fértiles tienden a retrocuzar con cualquiera de los parentales (Wheeler et al., 2006). El análisis molecular aporta una aproximación más eficiente para detectar introgresión en las poblaciones de estas especies (Wheeler, 2012). Es así que, estudios genéticos en llamas y alpacas muestran que su diversidad genética habría sido afectada por procesos de hibridación, con probable efecto similar a la deriva y a la selección (Kadwell et al., 2001; Melo et al., 2011; Barreta et al., 2013; Barreta et al., 2012).

Mediante la aplicación de secuenciación *de novo* se detectó la evidencia de hibridación en todos los individuos de alpacas, ya que la mezcla se habría dado de forma constante. Se encontró que cerca del 30% del genoma de las alpacas presenta mezcla, siendo el mayor índice encontrado entre especies animales domésticas, mientras que el

índice de mezcla en el genoma de llamas es cerca del 5%. A pesar de estas diferencias, se considera que la hibridación habría sido bidireccional (Fan et al., 2020). Un efecto importante de la hibridación es que podría llevar a la desaparición del genoma original de la alpaca (Wheeler, 2012)

En general, los individuos resultantes de la primera generación de hibridación tienen características distinguibles fenotípicamente (Wheeler, 2012). Los híbridos tienen variaciones en la altura de la cruz y el largo de las orejas, que son mayores que en alpacas y menores que en llamas (Espinoza, 2018). El peso promedio de las carcasas de alpacas (46.1 kg) es menor al de llamas (63.2 kg) (Cristofanelli et al., 2004), por lo que un cruce produciría menor peso de carcasa en llamas. La hibridación también se hace evidente en las características de la fibra, un cruce entre alpaca macho con llama hembra produce descendencia con fibra más fina (respecto a llamas), mientras que la descendencia de un cruce inverso produciría fibra de mayor peso (respecto a alpacas) (Wheeler et al., 2006).

2.8. Genética de los camélidos sudamericanos

2.8.1. Citogenética

Los camélidos cuentan con un número cromosómico de $2n = 74$, con amplia similitud entre los camélidos sudamericanos en el patrón de bandas, índice centromérico y longitud relativa (Larramendy et al., 1983; Zapata, 1999). Las homologías entre especies sugieren mayor cercanía filogenética guanaco-llama y vicuña-alpaca (Larramendy et al., 1983; Zapata, 1999). Mediante la técnica de bandeo GTC, se encontraron diferencias entre llamas y alpacas en los cromosomas 1, 2, 11 y 27 (Romero, 2016). Existe una marcada similitud morfométrica entre los segmentos de los cromosomas de guanacos y llamas, mediante bandeo G (Larramendy et al. 1983). Marín et al. (2007) encontraron diferencias en el bandeo G del cromosoma 1 de las cuatro especies sudamericanas, lo que fue evidente en un híbrido guanaco/alpaca.

2.8.2. Marcadores moleculares en estudios con camélidos

a) Marcadores tipo microsatélites

Se trata de secuencias cortas de ADN repetidas en tandem, de rápida evolución por su alta tasa de mutación y presentes a lo largo del genoma (Ingram et al., 1998). Estos marcadores moleculares son ampliamente aplicados en estudios de población y biodiversidad en plantas y animales (Ingram et al., 1998). El análisis de variabilidad de microsatélites en una población ofrece datos sobre su diversidad, niveles de consanguinidad y filogenia (Ashley & Dow, 1994).

Un importante avance en la genética de camélidos fue el diseño de 15 marcadores microsatélite autosomales dinucleótidos para llamas y alpacas (Lang et al., 1996), y otros 13 para alpacas (Obreque et al., 1999). En diferentes especies de camélidos se utilizaron estos marcadores con diferentes objetivos, como estudios de diversidad genética, estructura de poblaciones y filogenia (Bustamante et al., 2006; Bustamante et al., 2002; Rodríguez et al., 2004; Agapito et al., 2008). Con las nuevas herramientas bioinformáticas, Manee et al. (2019), identificaron microsatélites en camélidos del viejo mundo y alpacas, describiendo 437.815 microsatélites de diferentes longitudes a lo largo del genoma de la alpaca, muchos de los cuales compartidos con los otros camélidos, lo que hace prometedora la aplicación de estos microsatélites en camélidos sudamericanos.

En vicuñas y guanacos, los microsatélites significaron una herramienta importante para medir los niveles de estructuración poblacional para el manejo y la conservación de sus poblaciones (Sarno et al., 2004; Mate et al., 2005; Anello et al., 2016; Gonzales et al., 2014). En llamas y alpacas se aplicaron microsatélites para determinar la estructura de poblaciones de diferentes zonas, análisis de parentesco y su historia evolutiva (Rodríguez et al., 2004; Bustamante et al., 2006; Kadwell et al., 2001).

En Bolivia, se realizaron estudios con microsatélite autosomales para evaluar la estructura y diversidad genética de diferentes poblaciones de llamas y alpacas (Barreta et al., 2012; Barreta et al., 2013; Echalar et al., 2020). Además se detectó introgresión del genoma de alpacas en el genoma de llamas y viceversa (Barreta et al., 2013a; Echalar et al., 2020). Con la aplicación de 15 marcadores microsatélites, Varas et al., (2020) concluyeron que las llamas habrían derivado casi exclusivamente de la subespecie de guanaco del norte (*Lama guanicoe cacsilensis*), mientras que la alpaca no proviene únicamente de una subespecie de vicuña y además mantiene un flujo génico constante con las llamas.

b) Marcadores tipo SNP

Un SNP o polimorfismo de simple nucleótido es la variación en un sitio dentro una secuencia de ADN, generalmente entre 300 a 1000 pb presente en diferentes zonas del genoma (Aitken et al., 2004). Tienen menor tasa de mutación que los microsatélites, por lo que puede requerirse mayor número de SNPs que de microsatélites para obtener datos estadísticamente significativos de los parámetros de una población (Brumfiel et al., 2003). Pueden estar presentes en regiones codificantes y no codificantes, su frecuencia está relacionada principalmente con las tasas de mutación/recombinación y presión de selección (Edwards et al., 2007).

Son marcadores aplicados en estudios de demografía y estructura poblacional, clasificación de individuos o grupos y mapeo genómico (Garvin et al., 2010). También son útiles en detección de asociaciones de genes con fenotipo mediante el mapeo de desequilibrio de ligamiento (Edwards et al., 2007). Si los SNP se encuentran en regiones codificantes pueden ayudar a identificar loci que están bajo selección, mientras que si se encuentran en regiones no codificantes proporcionan información sobre diferentes parámetros evolutivos (Edwards et al., 2007).

En camélidos sudamericanos, se han encontrado 48 SNP en intrones y exones de 22 genes relacionados a características de la fibra (Suárez et al., 2019). También se han identificado SNP en los genes *MC1R* y *ASIP* asociados a la coloración del pelaje (Marín et al., 2018). Posteriormente se desarrollaron microarrays de SNP para alpacas, encontrando 76.508 SNP, de los cuales se validaron 290 que se encuentran en genes candidatos a estar relacionados con la calidad de la fibra (Calderón et al., 2021).

c) Marcadores mitocondriales

El ADN mitocondrial de animales tiene una considerable variabilidad en tamaño y organización (Moritz et al., 1987). Las características más importantes del ADN mitocondrial son: la herencia materna, ausencia de recombinación, regiones conservadas o menos conservadas y tasa de mutación elevada (mayor a ADN nuclear) (Ladoukakis & Zouros, 2017). Estas propiedades hacen de las secuencias mitocondriales una herramienta ideal para estudios de poblaciones, construcción de filogenias y sistemática (Moritz et al., 1987; Ladoukakis & Zouros, 2017). Permite realizar comparaciones entre individuos de una población o entre especies relacionadas, rastreando cada linaje como una historia evolutiva única (Ladoukakis & Zouros, 2017). El análisis de secuencias mitocondriales es muy útil para la evaluación de relaciones entre especies y poblaciones que divergieron recientemente (5-10 millones de años) (Brown et al., 1979), se pueden cuantificar distancias genéticas entre organismos relacionados y obtener acercamientos acerca de procesos de especiación (Brown et al., 1979; Kocher et al., 1989).

En camélidos el ADN mitocondrial ha sido aplicado para estudios filogenéticos, estudios de historia evolutiva y del proceso de domesticación (Westbury et al., 2016; Cui et al., 2007; Burger, 2016). Se examinaron las relaciones entre camélidos sudamericanos, proponiendo la clasificación de la alpaca dentro el género *Vicugna* con el uso de marcadores mitocondriales y nucleares (Kadwell et al., 2001). El uso de estos marcadores permitió determinar frecuentes procesos de hibridación entre especies y corroborar la relación entre llamas y guanacos (Barreta et al., 2013a). Acerca del origen

de la domesticación de la llama, el estudio con ADN mitocondrial apoya la teoría de que hubo más de un centro de origen (Barreta et al., 2013a). Al realizar el análisis de ADN mitocondrial de muestras antiguas y análisis osteométrico, se plantean las vías de domesticación de llamas y alpacas, con la hipótesis de que provienen de dos ancestros de guanacos extintos, con eventos posteriores frecuentes de hibridación en las poblaciones de alpacas (Diaz-Maroto et al., 2021).

d) Marcadores del cromosoma “Y”

Los marcadores moleculares ligados al cromosoma “Y” poseen una estricta herencia paterna y no presentan heteroplasia ni recombinación, con excepción de la región pseudoautosomal (Petit et al., 2002; Calafell & Larmuseau, 2017). Son haploides y con diferentes tasas de mutación según el tipo de marcador, siendo mayor la tasa en microsatélites que en SNP (Petit et al., 2002). La variabilidad genética en secuencias del cromosoma “Y” es significativamente menor a la variabilidad de otras secuencias en diferentes especies de mamíferos, lo que también se observa en el cromosoma W de las aves (Hellborg & Ellegren, 2004).

Su uso ha sido ampliamente extendido en estudios sobre la historia evolutiva de los humanos (Jobling & Tyler-Smith, 2003; Kivisild, 2017). Ayudan a determinar mecanismos de selección sexual o apareamiento y proporcionan información sobre el éxito reproductivo de los machos (Petit et al., 2002). Son útiles en estudios de filogeografía (Kivisild, 2017), genealogías, antropología, forense, evolución de cromosomas sexuales y genética de poblaciones (Calafell & Larmuseau, 2017). Por ejemplo, la aplicación de marcadores microsatélite del cromosoma “Y” en ganado criollo de Perú permitió identificar haplotipos de línea parental para determinar diversidad genética y estructura poblacional, resultando ser similar a la encontrada en poblaciones de ganado criollo de otros países (Yalta-Macedo et al., 2021).

Existe gran variedad de estudios basados en la aplicación de marcadores del cromosoma “Y” en diferentes especies de mamíferos, como caballos (Han et al., 2015; Wallner et al., 2017), humanos (Jobling & Tyler-Smith, 2003), cabras (Pidancier et al., 2006), cerdos (Guirao-Rico et al., 2018) y ganado vacuno (Perez-Pardal et al., 2010; Yamanaka et al., 2019) entre tantos otros. Se han descrito numerosos marcadores moleculares asociados al cromosoma “Y”, en especial para humanos. Sin embargo se hace complejo encontrar SNPs o microsatélites polimórficos en poblaciones naturales de otras especies (Petit et al., 2002).

Para camélidos se han descrito marcadores microsatélite del cromosoma “Y” para camello bactriano (USPY) y dos genes con variación en el número de copias (HSFY y SRY) (Chen et al., 2018). Por otra parte, durante la construcción del genoma de dromedarios (mediante el método de paneles híbridos) se realizó el screening de marcadores moleculares, entre los cuales se encontraron dos dentro del cromosoma “Y”, TR4520 y TR5720 (Perelman *et al.*, 2018). Para camélidos sudamericanos se describieron tres marcadores tipo SNP de intrones asociados al cromosoma “Y”, uno de ellos con polimorfismo entre las especies (Marín et al., 2017).

e) Aplicación conjunta de marcadores mitocondriales y del cromosoma “Y”

Los datos aportados por secuencias de ADN mitocondrial solamente indican el origen materno, mientras que la contribución paterna es poco estudiada (Calafell & Larmuseau, 2017). La combinación de ambos tipos de marcadores es útil para determinar estrategias de cruce en diferentes mamíferos, variación genética patrilineal (Aliy-bek et al., 2018), análisis filogeográfico (Tabata et al., 2019; Yamanaka et al., 2019), vías de hibridación entre especies o poblaciones (Wheeldon et al., 2013; Matsudaria et al., 2018) e historia evolutiva de procesos de domesticación (Marín et al., 2017; Pereira et al., 2009).

La combinación de estos marcadores ligados al sexo se aplica para determinar la dirección de la hibridación entre especies mediante la detección de haplotipos

mitocondriales y del cromosoma “Y” y su asignación a la especie de procedencia (Vila et al., 2003; Iacolina et al., 2010). De esta manera se determinó la dirección de la hibridación entre diferentes especies de mamíferos como por ejemplo: lobos (hembra) y perros (macho), (Vila et al., 2003; Iacolina et al., 2010), entre bisontes macho (*Bison bison*) y ganado vacuno hembra (*Bos taurus*) (Ward et al., 1999), entre turones europeos macho (*Mustela putorius*) y visones europeos hembra (*M. lutreola*). Asimismo, en camélidos sudamericanos, Marín et al., (2017) determinaron la presencia de introgresión entre llamas y alpacas, analizando en conjunto haplotipos mitocondriales y del cromosoma “Y”, determinando también la dirección de la hibridación, que fue mayor entre hembras llama y machos alpaca.

2.9. Justificación

En la zona alto andina de los países sudamericanos, los camélidos han tenido una importancia cultural y económica relevante, ya que miles de familias se dedican a la actividad y a la producción de sus derivados (Quispe et al., 2009; FAO, 1996). En el altiplano boliviano las llamas y la mayoría de las alpacas viven en rebaños manejados por los productores (Iñiguez & Alem, 1996).

Se han generado variadas investigaciones sobre la clasificación taxonómica de los camélidos sudamericanos en base a estudios moleculares, los cuales han demostrado una relación genética estrecha entre alpaca, llama y vicuña, lo que ha sugerido eventos de hibridación en su historia evolutiva, y la presencia de introgresión en las especies domésticas (Kadwell et al., 2001; Barreta et al., 2013a). Los avances en la biología molecular han coadyuvado al desarrollo de estudios de poblaciones y de análisis filogenéticos con el uso de marcadores paternos y maternos, como es el caso de marcadores mitocondriales y del cromosoma “Y” respectivamente. Su aplicación no es sólo útil para el análisis filogenético, sino también para la evaluación de niveles y dirección de hibridación e introgresión entre especies estrechamente relacionadas como lo son la alpaca y la llama. Ya que estas especies cohabitan en sistemas mixtos de crianza y comparten características reproductivas.

En base a lo mencionado este trabajo busca aportar al conocimiento para una mejor comprensión de la introgresión entre las especies domésticas de camélidos sudamericanos, en diferentes zonas de crianza del altiplano boliviano, mediante la aplicación de marcadores moleculares ligados al sexo, del cromosoma “Y” y mitocondriales.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar la hibridación entre llamas y alpacas con la aplicación de marcadores moleculares del cromosoma “Y” y del ADN mitocondrial en tres poblaciones del altiplano boliviano (Ulla Ulla, Catacora y Curahuara de Carangas).

3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar marcadores moleculares del cromosoma “Y” para identificar haplotipos en poblaciones de llamas y alpacas de Bolivia y determinar la presencia de hibridación o introgresión entre las especies.
- Identificar haplotipos mitocondriales en poblaciones de llamas y alpacas de Bolivia, para determinar presencia de hibridación o introgresión entre las especies.
- Evaluar la direccionalidad y simetría del flujo génico en las poblaciones de llamas y alpacas a través del análisis conjunto de haplotipos mitocondriales y del cromosoma “Y”.

4. Materiales y métodos

4.1. Área de estudio

Las muestras obtenidas para los análisis moleculares de poblaciones de llamas, alpacas y huarizos provienen de tres áreas de estudio: Ulla Ulla, Catacora y el Municipio de Curahuara de Carangas (Figura 1). Se seleccionaron estas zonas de muestreo porque son zonas de potencial hibridación entre llamas y alpacas. En el caso de Curahuara de Carangas, se habilitó un matadero municipal, del cual se pudo acceder a muestras de sangre de los individuos sacrificados.

- a) **Ulla Ulla** (altitud media de 4.300 m), forma parte del Área Natural de Manejo Integrado (ANMI) Apolobamba, ubicada en la provincia Franz Tamayo, en el departamento de La Paz, en el año 2000 el área amplió su superficie a 483.743,8 km², abarcando las provincias Franz Tamayo y Bautista Saavedra (SERNAP - ANMI Apolobamba, 2006).

La zona presenta condiciones climáticas extremas por las temperaturas bajas y precipitaciones escasas, generando un clima semiárido. La temperatura media anual es de 4,5 °C (Max. 12 °C, Min. -6 °C), con una precipitación anual de 508,9 mm, siendo los meses más secos de junio a agosto y los más húmedos de diciembre a febrero (SERNAP - ANMI Apolobamba, 2006). La región de Ulla Ulla corresponde al tipo climático de tundra, en la cual los camélidos se distribuyen en su parte occidental, en zonas elevadas y en bofedales (SERNAP - ANMI Apolobamba, 2006).

- b) **Catacora** se encuentra en la provincia José Manuel Pando del departamento de La Paz a una altitud de 4.000 a 4.600 m; zona que se caracteriza por tener extensas planicies, clima frío y seco, con una temperatura media anual de 5 °C, y una precipitación anual de 400 mm (GAMC, 2007). Las poblaciones de esta zona se dedican a la agricultura y la mayor fuente de ingreso proviene de la ganadería

de camélidos (GAMC, 2007). Las familias productoras poseen en promedio rebaños de 70 llamas y/o 220 alpacas (GAMC, 2007).

- c) El Municipio de **Curahuara de Carangas** se ubica en la Provincia Sajama del Departamento de Oruro, dentro de su territorio se encuentra el Parque Nacional Sajama, a una altitud promedio de 4.100 m, con pisos ecológicos de alta montaña, ladera baja o piedemonte y plano de valle, con clima semiárido y frío y una precipitación anual de 327 mm; está conformado por tres microrregiones (Oriental, Central y Occidental), siendo la occidental la más poblada de camélidos domésticos, ya que posee praderas naturales y bofedales. La población de llamas y alpacas en este municipio, según el Censo de 2002, fue de 59.286 y 44.556 respectivamente (GAMCC, 2007).

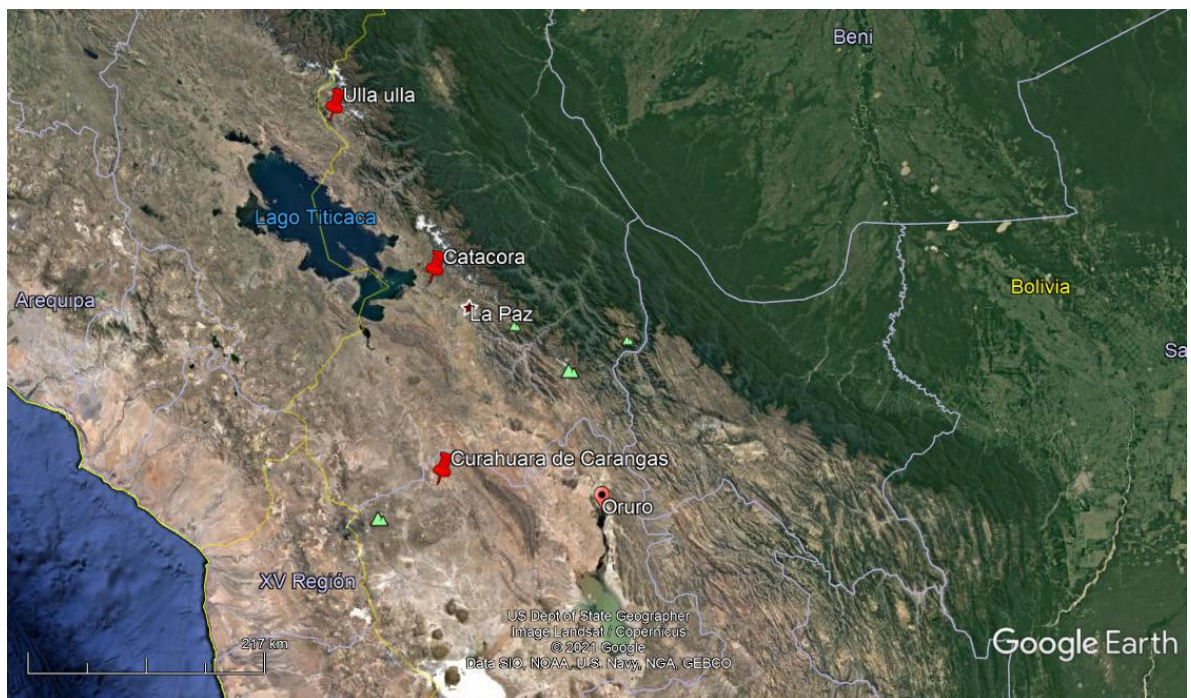


Figura 1. Ubicación geográfica de las zonas de estudio.

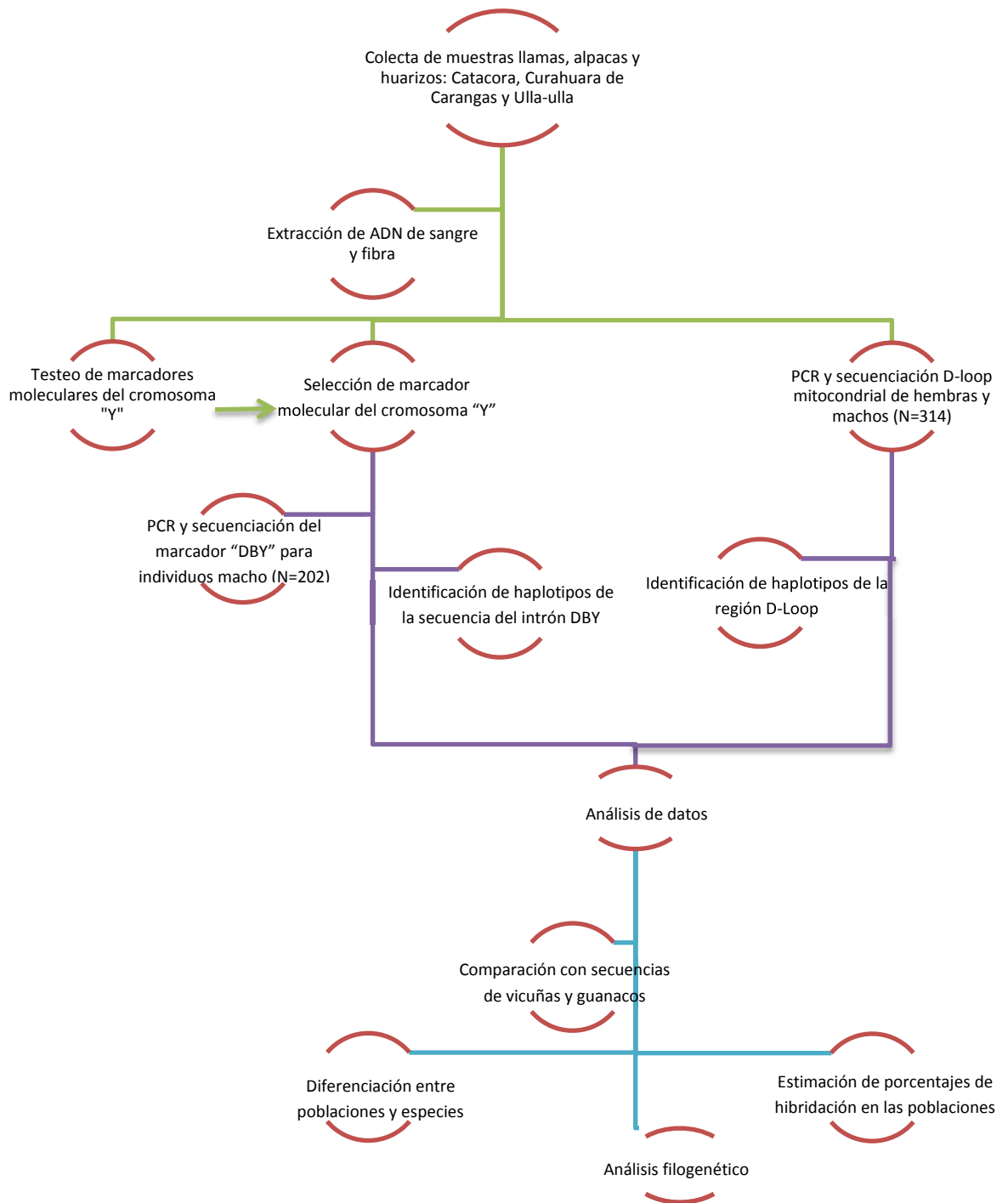


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología aplicada.

4.2. Toma de muestras

En la figura 2 se detallan los pasos que se siguieron en la aplicación de los métodos.

Tabla 1. Listado y procedencia de individuos muestreados y secuencias.

Se detalla el número total de individuos incluidos en el análisis de las secuencias DBY y D-Loop. Se enlista a las llamas, alpacas y huarizos correspondientes a las 3 zonas de estudio, los 4 controles (3 llamas y un huarizo), además de muestras de vicuñas y guanacos para realizar los análisis filogenético.

Zona de estudio		Especie	Sexo	Número de muestras
Catacora		Llama	Hembra	10
		Alpaca	Hembra	10
		Huarizo	Hembra	10
		Llama	Macho	13
		Alpaca	Macho	13
		Huarizo	Macho	6
Ulla Ulla		Llama	Hembra	10
		Alpaca	Hembra	8
		Huarizo	Hembra	10
		Llama	Macho	3
		Alpaca	Macho	19
		Huarizo	Macho	3
Curahuara de Carangas		Llama	Hembra	18
		Alpaca	Hembra	15
		Huarizo	Hembra	7
		Llama	Macho	60
		Alpaca	Macho	60
		Huarizo	Macho	7
Muestras control	San Pedro de Totora	Llama	Macho	1
	Choquecota	Llama	Macho	1
	Uncía	Llama	Macho	1
	Pucarani	Huarizo	Macho	1
Secuencias para análisis filogenético	Villazón	Vicuña	Macho	6
	Salinas de Garci-Mendoza	Vicuña	Macho	1
	Quijarro	Vicuña	Macho	6
	Accesiones del I.B.M.B (diferentes zonas de Bolivia)	Vicuña	Hembra	12
	Accesiones del I.B.M.B (Patagonia-Chile)	Guanacos	Hembra	20
	Accesiones de GenBank	Guanacos	Macho	29
			Machos	224
			Hembras	130
			Total	354

Se tomaron muestras de fibra y sangre de alpacas, llamas y huarizos de las diferentes zonas de estudio (Tablas 4 y 5). De Ulla Ulla y Catacora se tomaron mayormente muestras de fibra de individuos provenientes de rebaños (denominados tamas) de diferentes productores. Mientras que las muestras de Curahuara de Carangas en su mayoría fueron de sangre obtenidas de individuos sacrificados en el Matadero Municipal. Adicionalmente, a modo de control se incluyeron 4 muestras de machos de ascendencia conocida, 3 llamas macho reproductores y un huarizo que proviene de un cruce alpaca macho y llama hembra. Se trabajó con secuencias de 354 individuos, 130 hembras y 224 machos (Tabla 1).

4.3. Extracción de ADN

Las muestras obtenidas fueron llevadas al Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (I.B.M.B.) para su correspondiente almacenaje y procesamiento. La extracción de ADN a partir de muestras de fibra se realizó mediante el protocolo de extracción con Chelex al 10% a partir de los bulbos de fibra (Woodward et al., 1994). Se realizó la extracción de ADN de muestras de sangre mediante la adaptación del método CTAB cloroformo descrito por Doyle & Doyle (1987). Ambos métodos fueron adaptados y modificados en la Unidad de Biología Evolutiva del I.B.M.B.

4.4. Validación de Marcadores Moleculares del Cromosoma “Y”

A través de la correspondiente revisión bibliográfica se identificaron marcadores microsatélite y SNP (Polimorfismo de Simple Nucleótido) del cromosoma “Y” descritos y utilizados en otras especies de mamíferos ungulados cercanos evolutivamente a los camélidos sudamericanos (Tabla 2).

Para dichos marcadores se desarrollaron diferentes pruebas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), variando las condiciones a partir de las descritas por los autores, como se detalla en la Tabla 3. Se realizaron las pruebas en extractos de ADN de fibra y

sangre de un grupo de camélidos machos (llamas, alpacas, vicuñas y huarizos) y se tomó como control negativo a hembras de las mismas especies.

Tabla 2. Marcadores moleculares del cromosoma "Y" testeados.
Se detalla el tipo de marcador molecular y la especie para la que fue descrito.

Marcador molecular	Autor	Especie	Tipo de marcador	
1	BM-861	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
2	BYM-1	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
3	UMNO-103	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
4	UTMO-307	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
5	UTY-19	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
6	ZFY-10	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
7	INRA	Pérez-Pardal <i>et al.</i> , 2010	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
8	ZF-2	Pidancier <i>et al.</i> , 2006	<i>Capra hircus</i>	Microsatélite
9	CAPY-1	Pidancier <i>et al.</i> , 2006	<i>Capra hircus</i>	Microsatélite
10	Y-1	Kikkawa <i>et al.</i> , 2003	<i>Bos taurus</i>	Microsatélite
11	DBY12JC	Marín <i>et al.</i> , 2017	Camélidos sudamericanos	SNP
12	Sry K1, Sry K2	Marín <i>et al.</i> , 2017	Camélidos sudamericanos	SNP
13	Sry K3, Sry K4	Marín <i>et al.</i> , 2017	Camélidos sudamericanos	SNP
14	ZF1	Marín <i>et al.</i> , 2017	Camélidos sudamericanos	Microsatélite
15	TR4520	Perelman <i>et al.</i> , 2018	<i>Camelus dromedarius</i>	Secuencia
16	TR5720	Perelman <i>et al.</i> , 2018	<i>Camelus dromedarius</i>	Secuencia
17	Eca.YH12	Wallner <i>et al.</i> , 2004	Equinos	Microsatélite
18	Eca.YA16	Wallner <i>et al.</i> , 2004	Equinos	Microsatélite
19	Eca.YP9	Wallner <i>et al.</i> , 2004	Equinos	Microsatélite
20	Eca.YM2	Wallner <i>et al.</i> , 2004	Equinos	Microsatélite
21	Eca.YE1	Wallner <i>et al.</i> , 2004	Equinos	Microsatélite
22	Eca.YJ10	Wallner <i>et al.</i> , 2004	Equinos	Microsatélite

Tabla 3. Condiciones de PCR aplicadas a los marcadores moleculares del cromosoma "Y".
Se realizaron variaciones en la temperatura de alineamiento y el número de ciclos.

Marcador	Fase 1		Fase 2						Fase 3		
	°C	Min	Desnaturalización		Alineamiento		Polimerización		Ciclos	°C	Min
			°C	s	°C	S	°C	s			
BM-861	95	3	95	30	60/53/55	30	72	30	30	72	30
BYM-1	95	3	95	30	58/52/50	30	72	30	30	72	30
UMNO-103	95	3	95	30	58/50	30	72	30	30	72	30
UMNO-307	95	3	95	30	58/55/50/ 48	30	72	30	30	72	30
UTY-19	95	3	95	30	54/52/50	30	72	30	40	72	30
ZFY-10	95	3	95	30	55/50	30	72	30	30	72	30
INRA-189	95	3	95	30	53/52/55	30	72	30	30	72	30
Y-1	95	3	95	30	50/52/55	30	72	120	30	72	30
DBY12JC	95	10	95	45	60/57	45	72	45	35	72	5
SRY1-SRY2	95	10	95	45	57/60/55	45	72	45	35	72	5
SRY3-SRY4	95	10	95	45	57/60/55	45	72	45	35	72	5
ZFY-1	95	10	95	45	60/55/50	45	72	45	35	72	5
ZF-2	95	3	95	30	64/60	40	72	120	45	72	30
CAPY-1	95	3	95	30	60	40	72	40	45/30	72	30
Eca.YH12	95	10	95	35	62/58/50	40	72	90	35	72	30
	95	10	95	45	55/50	45	72	45	35	72	5
Eca.YA16	95	10	95	35	62/58/50/ 45	40	72	90	35	72	30
Eca.YP9	95	10	95	35	54/50/45	40	72	90	35	72	30
Eca.YM2	95	10	95	35	54/50/45	40	72	90	35	72	30
Eca.YE1	95	10	95	35	62/54/58/ 50	40	72	90	35	72	30
Eca.YJ10	95	10	95	35	62/58	40	72	90	35	72	30
	95	10	95	45	55/50	45	72	45	35	72	5
TR4520	95	5	95	30	58/55/50	60	72	60	35	72	10
	95	10	95	45	58/50	45	72	45	35	72	5
TR5720	95	5	95	30	58/55/50	60	72	60	35	72	10
	95	10	95	45	58/50	45	72	45	35	72	5

De esta forma se seleccionó el marcador molecular que generó productos de amplificación a partir de extractos de ADN de fibra y sangre, seleccionando aquel que fue específico para machos de camélidos y ausente en las hembras.

4.5. Amplificación del marcador del intrón DBY del cromosoma "Y"

Se estandarizó el protocolo de PCR para el marcador del intrón DBY a partir de las pruebas realizadas que se detallan en la Tabla 3. Se amplificó un fragmento de entre 400 y 500 pb del intrón DBY. La reacción de PCR se llevó a cabo con una fase inicial de 95

°C por 10 min seguida por 35 ciclos de amplificación (95 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 45 s) y una fase final de elongación de 72 °C por 5 min.

Se realizó la PCR con los extractos de los camélidos machos incluidos en el estudio, de los cuales se obtuvieron las secuencias del fragmento amplificado, que sumadas a las secuencias adicionales para el análisis filogenético, corresponden a 202 individuos que se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Muestras de individuos macho con secuencia del intrón DBY.

Se detalla el número de individuos macho incluidos en el análisis de las secuencias DBY. Las llamas, alpacas y huarizos correspondientes a las 3 zonas de estudio, los 4 controles (3 llamas y un huarizo), además de muestras de vicuñas y guanacos para realizar los análisis filogenéticos. Las secuencias de guanacos corresponden a accesiones disponibles en GenBank.

Procedencia		Especie	Número de individuos
Catacora		Llama	8
		Alpaca	7
		Huarizo	3
Ulla Ulla		Llama	2
		Alpaca	16
		Huarizo	2
Curahuara de Carangas		Llama	58
		Alpaca	51
		Huarizo	7
Muestras control	San Pedro de Totora	Llama	1
	Choquecota	Llama	1
	Uncía	Llama	1
	Pucarani	Huarizo	1
Secuencias para análisis filogenético	Salinas de Garci-Mendoza	Vicuña	1
	Villazón	Vicuña	7
	Quijarro	Vicuña	7
	Accesiones de GenBank	Guanacos	29*
		Total	202

* Accesiones KY420225 – KY420254

4.6. Amplificación de la región control de ADN mitocondrial (D-Loop)

Se realizó la PCR para amplificar un fragmento de 500-520 pb de la región control de ADN mitocondrial con los marcadores Lthr y HLOOP550G. La reacción de PCR se llevó a cabo con un fase inicial de 95 °C por 1 min seguida por 35 ciclos de

amplificación (95 °C 30 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s) y una fase final de elongación de 72 °C por 10 min.

Se realizó la PCR para los extractos de los camélidos machos y hembras incluidos en el estudio, de los cuales se obtuvieron secuencias de 314 individuos que se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Muestras de individuos macho y hembra con secuencia de la región D-Loop.

Se muestra la procedencia de los individuos hembras y machos y el número de secuencias de guanacos y vicuñas incluidas en el análisis.

Procedencia		Especie	Sexo	Número de individuos
Catacora		Llama	Hembra	10
		Alpaca	Hembra	8
		Huarizo	Hembra	10
		Llama	Macho	12
		Alpaca	Macho	8
		Huarizo	Macho	6
Ulla Ulla		Llama	Hembra	10
		Alpaca	Hembra	7
		Huarizo	Hembra	10
		Llama	Macho	3
		Alpaca	Macho	17
		Huarizo	Macho	2
Curahuara de Carangas		Llama	Hembra	17
		Alpaca	Hembra	13
		Huarizo	Hembra	7
		Llama	Macho	57
		Alpaca	Macho	61
		Huarizo	Macho	7
Muestras Control	Pucarani	Huarizo	Macho	1
	San Pedro de Totora	Llama	Macho	1
	Choquecota	Llama	Macho	1
	Uncía	Llama	Macho	1
Secuencias para análisis filogenético	Villazón	Vicuña	Macho	6
	Quijarro	Vicuña	Macho	6
	Salinas de Garci-Mendoza	Vicuña	Macho	1
	Accesiones del I.B.M.B (diferentes zonas de Bolivia)	Vicuña	Hembra	12
	Accesiones del I.B.M.B (Patagonia-Chile)	Guanacos	Hembra	20
			Total	314

4.7. Electroforesis en gel de agarosa

Las corridas electroforéticas de los productos amplificados se realizaron en geles de agarosa al 2%, utilizando una cámara de electroforesis horizontal durante 45 minutos a 100 V.

4.8. Secuenciación de fragmentos de amplificación

Los *primers* (cebadores) utilizados para las amplificaciones y secuenciación se detallan en la Tabla 6. Los productos de amplificación del intrón DBY de cromosoma “Y” y D-Loop de ADN mitocondrial fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen-Korea para la obtención de los electroferogramas de cada fragmento.

Tabla 6. Primers utilizados para PCR y posterior secuenciación.
Secuencia de los cebadores de las regiones mitocondrial y del cromosoma “Y”.

Locus	Primer	Secuencia (5' – 3')
D-Loop	Lthr ARTIO	GGTCTTGTAAGCCGAAAAAGGA
	HLOOP550G	ATGGACTGAATAGCACCTTATG
	H362	GGTTTCACGCGGCATGGTGATT
DBY	DBY12JC (F)	TCCTGTATACCATAGCATTATAGG
	DBY12JC (R)	TAAGACCTTGTAATTAACCTGTGG

Se evaluó la calidad de las secuencias y electroferogramas para proceder al análisis bioinformático.

4.9. Análisis de datos

Una vez obtenidas las secuencias de ADN mitocondrial y cromosoma “Y” se procedió al análisis de datos. Adicionalmente se incluyeron secuencias de especímenes de guanacos del gen DBY disponibles en GenBank. También se incluyeron secuencias de la región control D-Loop de ADN mitocondrial, de guanacos provenientes de estudios previos realizados en la Unidad de Biología Evolutiva del I.B.M.B. (Tablas 4 y 5).

Las secuencias fueron evaluadas y alineadas utilizando el software SeqScape v2.5 (REF) con el que se realizó el empalme y la edición. El número de sitios polimórficos, diversidad de haplotipos y diversidad nucleotídica fueron estimados con el software DNASP v5. Se construyó un árbol filogenético usando los métodos de Neighbor Joining (NJ), Bayesian (MB) y Maximum likelihood (ML) con el software MEGA X. Para identificar la relación entre haplotipos se utilizó el software NETWORK 5.0 y TCS 1.21.

5. Resultados y Discusión

5.1. Selección de marcadores del cromosoma “Y”

Se testearon 22 marcadores moleculares SNP y microsatélites del cromosoma “Y” descritos para otras especies de ungulados. Ocho de ellos descritos para ganado vacuno (*Bos taurus*) (Pérez-Pardal et al., 2009; Kikkawa et al., 2003), dos para cabras (*Capras hircus*) (Pidancier et al., 2006), seis en equinos (género *Equus*) (Wallner et al., 2004), dos en dromedarios (*Camelus dromedarius*) (Perelman et al., 2018) y tres descritos para camélidos sudamericanos (Marín et al., 2017) (Tabla 2).

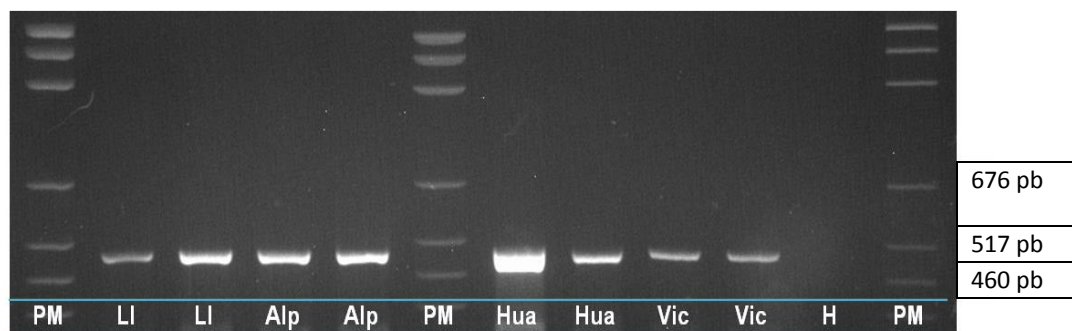
Realizando variaciones en el proceso de la PCR para cada uno de los marcadores, tanto en temperatura de alineamiento y número de ciclos, se obtuvieron los resultados que se detallan en el ANEXO 1. Veintiuno de los marcadores fueron descartados, ya que no generaron la respuesta esperada. Muchos amplificaron fragmentos igualmente en hembras o generaron fragmentos inespecíficos de diferentes tamaños demostrando no ser específicos para machos, ni aplicables a las especies de estudio.

Otros autores realizan el mismo proceso de búsqueda para lograr identificar marcadores aplicables a una especie determinada. Por ejemplo, Han et al. (2015) testearon 33 marcadores del cromosoma “Y” para caballos, de los cuales se obtuvieron sitios polimórficos tan sólo en tres de ellos, entre los cuales dos ya habían sido previamente descritos para la especie por Wallner et al. (2013). En un estudio realizado en camellos bactrianos (Chen et al., 2018), cercanos evolutivamente a los camélidos sudamericanos, realizaron pruebas con 39 marcadores microsatélites bovinos, entre ellos cuatro que también se probaron en la presente investigación (BM861, UMN0130, UMN0307 e INRA189), sin obtener amplificación específica para machos de camellos bactrianos, lo que, asumen, se debe a la distancia evolutiva entre las especies (entre 55 a 60 millones de años). Erler et al. (2004) probaron marcadores microsatélites de humanos en otros primates, el éxito de amplificación específica masculina en estas especies estaba

correlacionado negativamente con el tiempo de divergencia del linaje humano, demostrando la especificidad requerida para amplificar marcadores del cromosoma “Y”, reduciendo la probabilidad de encontrar secuencias compartidas entre especies evolutivamente lejanas.

A través del proceso descrito se seleccionó al marcador molecular tipo SNP del intrón DBY (DBY12JC), que presentó amplificación en todos los individuos machos de camélidos sudamericanos analizados. Siendo específico para el cromosoma “Y”, ya que no produjo amplificación en hembras. Estos datos confirman lo observado previamente por Marín et al. (2017) donde el marcador para el fragmento del intrón DBY fue el que generó fragmentos amplificados en todos los individuos machos del estudio, sin fragmentos inespecíficos y ausente en hembras, además de presentar polimorfismo.

El procedimiento de PCR se estandarizó bajo el programa descrito en la sección de métodos, que comprende el paso de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de amplificación (95 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 45 s) y una fase final de elongación de 72 °C por 5 min. Con este marcador se evaluaron a todos los individuos del estudio tanto por especie como por población. El tamaño del fragmento de amplificación fue cercano a 500 pb (Figura 3). Las secuencias posteriormente alineadas y editadas presentaron un tamaño de 376 pb.



LI: llama, Alp: alpaca, Hua: huarizo, Vic: vicuña, H: hembra, PM: marcador de peso molecular

Figura 3. Productos de amplificación de PCR del intrón DBY

5.2. Análisis de secuencias del intrón DBY del cromosoma “Y”

En las secuencias evaluadas se encontraron tres haplotipos del fragmento del intrón DBY (376 pb), los cuales presentan cinco sitios polimórficos (Tabla 7). Los haplotipos encontrados fueron denominados: HYG1, HYG2 y HYV. El haplotipo HYG1 corresponde al haplotipo de la especie *Lama guanicoe*, el HYG2 a *Lama glama* y HYV al género *Vicugna* (que incluye a vicuñas y alpacas). Marín et al. (2017) por su parte, encontraron cinco haplotipos del intrón DBY en una secuencia más larga de 684 pb con siete sitios polimórficos.

Tabla 7. Sitios polimórficos de los haplotipos DBY.
Se muestra la posición del SNP en la secuencia de 376 pb.

Haplotipo	Posición del SNP				
	42	178	244	275	333
HYG1	G	A	A	A	A
HYG2	G	A	A	A	G
HYV	C	G	G	G	G

El haplotipo HYV incluye a todas las vicuñas y a la mayoría de las alpacas (73 de 74), además de seis huarizos y tres llamas. Por otra parte, el haplotipo HYG1 involucra sólo a individuos de guanaco, mientras que el haplotipo HYG2 incluye a la mayoría de los individuos machos de llama (68 de 71), siete huarizos y una alpaca (Tabla 8). Aquellos individuos que presentan introgresión, es decir, las 3 llamas y la alpaca provienen de la región de Curahuara de Carangas. En la red de haplotipos de la Figura 4 se ilustra la distribución de los individuos de las diferentes especies, como también en el árbol filogenético del ANEXO 2.

Tabla 8. Distribución de haplotipos DBY en los grupos de estudio.
Para la asignación de haplotipos se incluyeron las secuencias de guanacos provenientes de GenBank.

Haplotipo	Fenotipo				
	Guanaco	Llama	Huarizo	Alpaca	Vicuña
HYG1	29	0	0	0	0
HYG2	0	68	7	1	0
HYV	0	3	6	73	15

El número de individuos que presenta introgresión con el marcador del cromosoma “Y” de la otra especie es de 4,3% en llamas y 0,013% en alpacas. Estos datos contrastan con los encontrados por Marín et al. (2017) con el mismo marcador molecular, donde se halló un 0,07% de introgresión en llamas y 0,03 % en alpacas. Estas diferencias pueden deberse al muestreo, a efectos de manejo por los productores en las diferentes regiones o a diferentes patrones de introgresión. Sin embargo, en general se observa que estos porcentajes de introgresión son mucho menores a los encontrados en el genoma mitocondrial, ya que Barreta et al. (2013a) encontraron hasta 63% de introgresión en alpacas y 9% de introgresión en llamas.

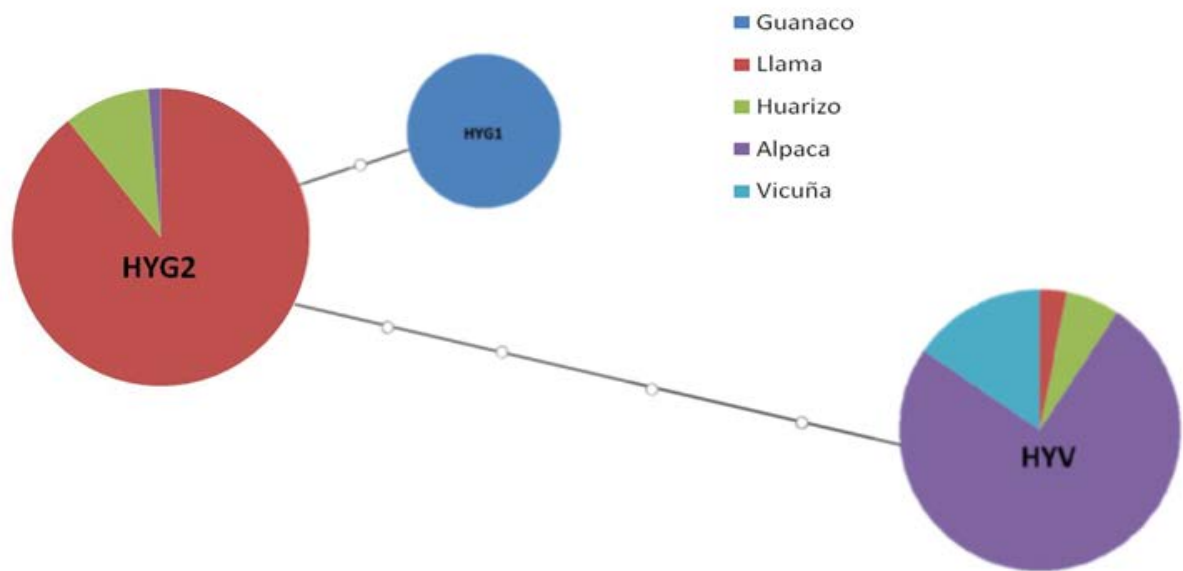


Figura 4. Red de haplotipos obtenida con la secuencia del intrón DBY. Red de haplotipos en representación tipo Neighbor-Joining construida en base a los tres haplotipos identificados incluyendo 202 secuencias del intrón DBY (376 pb). La escala representa la distancia genética. El área del círculo es aproximadamente proporcional a la frecuencia.

Como se observa en la Tabla 8, el haplotipo de llamas HYG2 no presenta secuencias de guanacos, mientras que el haplotipo HYV sí es compartido entre vicuñas y alpacas. Esto reflejaría para este marcador, un menor tiempo de divergencia entre vicuñas y alpacas. Apoyando a los resultados obtenidos por Marín *et al.* (2017) con la aplicación de este marcador del cromosoma “Y”, que encuentra igualmente una clara separación

entre los haplotipos de llamas-guanacos y alpacas-vicuñas. Esto se contrasta con los datos obtenidos con marcadores autosómicos y mitocondriales, ya que, de acuerdo a los mismos, las llamas y alpacas presentarían mayor cercanía entre si demostrando eventos de hibridación entre estas especies (Echalar et al., 2020; Barreta et al., 2013a).

El número de haplotipos encontrados fue reducido y específico a las especies. Las características del cromosoma “Y”: haploide, no recombinante (con excepción de la región pseudo-autosomal), con mutaciones preservadas y alto desequilibrio de ligamento, reflejan también el fuerte impacto de la deriva génica, el comportamiento reproductivo de algunas especies, o el manejo reproductivo de los machos por los criadores, que reduce el tamaño efectivo de la población lo que puede explicar la baja diversidad haplotípica y ausencia de polimorfismo intraespecífico (Aliy-bek et al., 2018; Jobling & Tyler-Smith, 2003; Wallner et al., 2004).

Ciertas regiones del cromosoma “Y” (como SRY) están poco conservadas entre especies de mamíferos, aunque otros genes (que podrían tener un rol regulatorio) están altamente conservados (Waters et al., 2007). En especies del género *Equus*, Wallner et al. (2004) encontraron bajo número de haplotipos de diferentes marcadores microsatélites del cromosoma “Y”, algunos especie-específicos y otros compartidos entre especies cercanas. En comparación al genoma autosómico, que varía en cada meiosis y la similitud entre individuos emparentados disminuye exponencialmente, mientras que en el cromosoma “Y” las variaciones están estrictamente relacionadas a la tasa de mutación (Calafell & Larmuseau, 2017) y principalmente al efecto de la deriva genética (Waters et al., 2007).

5.2.1. Diversidad haplotípica y nucleotídica de la secuencia DBY

La diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) encontrada para la secuencia del cromosoma “Y” analizada fue baja (Tabla 9). Los valores encontrados están influenciados por el efecto de los haplotipos de huarizos, en los cuales siete individuos

tienen el haplotipo HYG2 y seis el HYV, por lo que se encuentra una mayor diversidad haplotípica en este grupo; lo mismo ocurre en llamas y alpacas donde individuos con introgresión presentan diferente haplotipo al de la especie, generando mayor diversidad haplotípica. Sin este efecto, los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica son reducidos. Similares resultados se encontraron en el estudio realizado en caballos con bajas tasas de diversidad haplotípica (entre 0 y 0,5) y diversidad nucleotídica (0 a 0,00056) (Han et al., 2015). Para cerdos (*Sus cofra*) la tasa de mutación estimada en el cromosoma “Y” fue menor a la tasa encontrada en autosomas ($1,15 \text{ e}^{-9}$ y 2.5 e^{-8} mutaciones / pb \times año, respectivamente), lo que atribuyen se debería al efecto de la selección en el cromosoma “Y” (Guirao-Rico et al., 2018).

Tabla 9. Valores de diversidad haplotípica y nucleotídica de DBY por especie.
Cálculos realizados en DNASP v5 con 202 secuencias del intrón DBY (376 pb).

	Diversidad Haplotípica (h)	Diversidad Nucleotídica (π)
Guanacos	0	0
Llamas	0,082	0,001
Huarizos	0,538	0,006
Alpacas	0,027	0,0002
Vicuñas	0	0

La limitación del uso de un solo marcador del cromosoma “Y” podría explicar la baja diversidad, pero también influye la deriva genética y/o la selección. En el genoma del cromosoma “Y” existe alto desequilibrio de ligamento, por lo que la selección natural no actúa sobre un solo gen (Waters et al., 2007). Por otra parte, el impacto de la deriva en el tamaño efectivo poblacional se refuerza además por el manejo reproductivo que aplican los criadores de camélidos donde generalmente un solo macho reproductor se apareja con las hembras en edad reproductiva de la terna (rebaño), durante dos a tres generaciones en promedio. Por ejemplo, en poblaciones de ganado vacuno criollo de Perú encontraron una baja diversidad genética y estructura poblacional (en haplotipos del cromosoma “Y”), lo que demuestra el efecto generado por la deriva génica y el manejo reproductivo con el uso de sementales (Yalta-Macedo et al., 2021).

En la Figura 5 se compara la relación filogenética encontrada entre las especies de camélidos con el uso de diferentes marcadores moleculares (microsatélites autosomales y marcador DBY). Es evidente que el efecto de la introgresión sobre el genoma nuclear autosomal coloca a llamas y alpacas más cercanas evolutivamente (Echalar, 2015) contrario a lo encontrado con los haplotipos DBY del cromosoma “Y”, donde llamas y alpacas son más distantes, lo que estaría relacionado con la dirección de la hibridación, que en el caso de las especies domésticas está influenciada por la selección realizada por los productores sobre los machos reproductores.

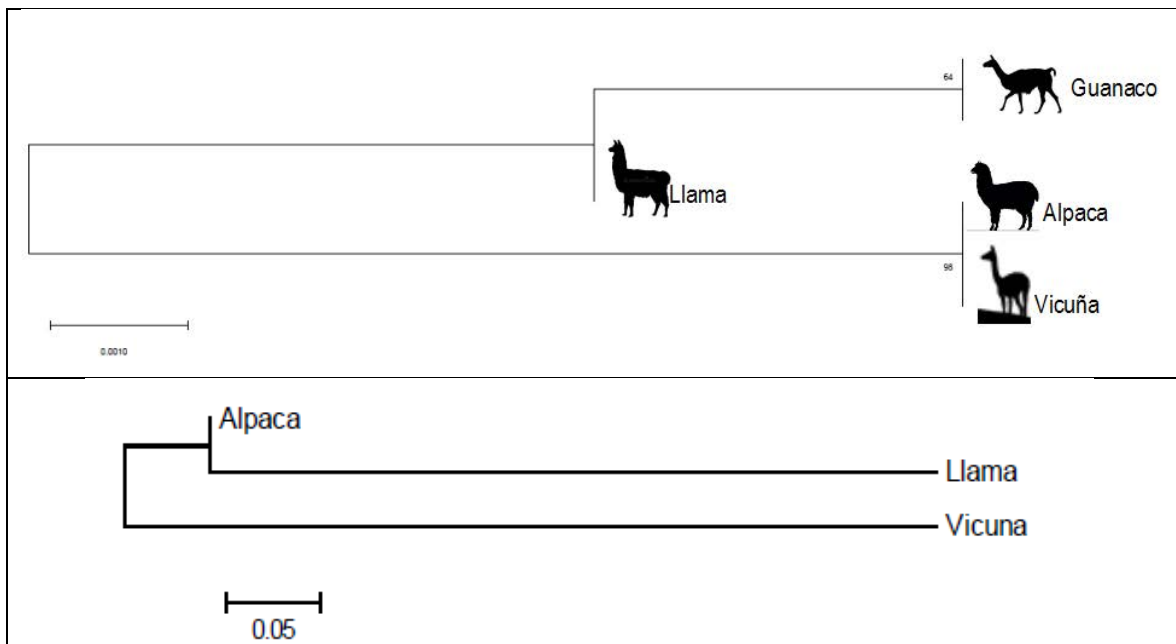


Figura 5. Comparación de árbol filogenético para las especies de camélidos sudamericanos.
 En la parte superior el árbol obtenido con secuencias del intron DBY, en la parte inferior el árbol obtenido por Echalar (2015) con 17 marcadores microsatélites autosomales.

Al tratarse de un solo marcador del cromosoma “Y” existe una limitación importante en el momento de esclarecer las relaciones filogenéticas entre las especies. Sin embargo, nuevos estudios realizados en las diferentes especies de camélidos han encontrado nuevos marcadores moleculares del cromosoma “Y” (Chen et al., 2018; Felkel et al., 2019) que podrían ser potencialmente utilizados para apoyar o contrastar los resultados

encontrados con el marcador del intrón DBY. Por ejemplo, Felkel et al. (2019) encontraron dos haplogrupos del cromosoma “Y” entre camellos domésticos y bactrianos y se estimó un tiempo de divergencia de cerca de 26,999 años.

5.1. Análisis de secuencias de la región control de ADN mitocondrial

La alineación y análisis de secuencias se realizaron con un fragmento de 451 pb de la región control de ADN mitocondrial (D-Loop), incluyendo secuencias de guanacos con las que se contaba previamente. Se incluyeron un total de 314 individuos (Tabla 4), tanto hembras como machos y secuencias de guanacos y vicuñas.

En total se identificaron 28 haplotipos y 23 sitios polimórficos (Tabla 10). Los haplotipos se distribuyen en dos haplogrupos: el haplogrupo HG engloba a los haplotipos del género *Lama* (guanacos y llamas), y el haplogrupo HV incluye haplotipos del género *Vicugna* (alpacas y vicuñas).

El número de haplotipos encontrado, 28 (N= 314, 451 pb), se correlaciona con la tasa de mutaciones de esta región encontrada en diferentes especies de mamíferos (Moritz et al., 1987), la cual es mayor que la del genoma nuclear (Bromham, 2011). En otros estudios realizados en las cuatro especies de camélidos sudamericanos también se encontró un elevado número de haplotipos: Barreta et al. (2013a) encontraron 44 haplotipos con 33 sitios polimórficos (N=197, 513 pb), Mate et al. (2004) identificaron 20 haplotipos con 10 sitios polimórficos (N=20, 337 pb) y Marín et al. (2017) encontraron 81 haplotipos con 64 sitios polimórficos (N=185, 600 pb).

Tabla 10. Sitios polimórficos de los haplotipos de la región control de ADN mitocondrial.
Haplotipos identificados en una secuencia 451 pb de la región D-Loop (N = 315).

Haplogrupo	Haplotipo	POSICIÓN DEL SNP																										Frecuencia
		4	6	7	10	19	22	28	63	129	149	155	156	167	168	188	196	208	221	275	276	285	368	427				
HG	H1	T	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	T	T	A	A	G	C	C	C	G	C	A	A	41			
HG	H2	T	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	70			
HG	H3	T	A	C	A	C	A	C	A	A	T	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	2			
HG	H4	T	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	C	T	A	A	A	T	C	C	G	C	A	A	5			
HG	H5	T	A	C	A	C	A	C	A	G	C	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	26			
HV	H6	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	G	T	T	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	49			
HG	H7	T	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	C	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	7			
HV	H8	T	G	C	G	C	A	T	A	A	T	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	1			
HG	H9	T	A	C	A	C	A	G	A	A	C	A	C	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	28			
HV	H10	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	A	T	T	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	15			
HG	H11	T	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	T	T	A	A	A	T	C	C	G	C	A	A	20			
HV	H12	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	3			
HV	H13	T	G	C	G	C	A	T	G	G	C	G	T	T	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	1			
HG	H14	T	A	C	A	C	A	T	A	G	C	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	13			
HG	H15	C	A	C	A	C	A	C	A	A	C	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	2			
HV	H16	T	G	C	G	C	A	T	A	A	C	G	T	T	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	5			
HV	H17	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	A	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	4			
HV	H18	T	G	C	G	C	A	T	A	A	C	G	C	T	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	3			
HV	H19	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	G	T	T	C	A	G	T	T	C	G	C	A	T	1			
HV	H20	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	G	C	T	C	A	G	T	T	C	G	C	A	T	1			
HV	H21	T	G	C	A	C	A	T	A	A	C	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	2			
HV	H22	T	G	C	G	C	A	T	A	G	T	G	T	C	C	A	G	T	C	C	G	C	A	T	1			
HV	H23	T	G	C	G	C	A	T	A	G	C	A	T	T	C	G	G	T	C	C	G	C	A	T	1			
HV	H24	T	A	T	G	C	G	T	A	A	T	A	C	T	C	A	G	T	C	T	A	T	A	T	1			
HV	H25	T	A	T	G	C	G	T	A	A	T	A	C	C	C	A	G	T	C	T	A	T	A	T	5			
HG	H26	T	A	C	A	T	A	T	A	G	C	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	1			
HG	H27	T	A	C	A	C	A	T	A	A	T	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	A	A	6			
HG	H28	T	A	C	A	C	A	T	A	A	T	A	T	T	A	A	G	T	C	C	G	C	G	A	1			

En el árbol filogenético (Figura 6) y la red de haplotipos (Figura 7) se muestra la distribución de haplotipos por especie, agrupados en los dos haplogrupos mitocondriales mencionados. El HV del género *Vicugna* está formado por los haplotipos H6, H8, H10, H12, H13 y del H16 al H25. El haplogrupo HG del género *Lama* incluye a los haplotipos H1 al H5, H9, H11, H14, H15, H26, H27 Y H28.

Las llamas se encuentran principalmente distribuidas en los haplotipos del haplogrupo HG, incluyendo una llama de Curahuara de Carangas que muestra el haplotipo H14 donde se encuentran los guanacos.

Las alpacas están representadas en proporciones similares en ambos haplogrupos. Se tienen seis haplotipos exclusivos de alpacas en el haplogrupo HV, estos son el H17, H18, H19, H20, H21, y H22 (Figura 7). Los haplotipos que pertenecen al haplogrupo HG compartidos por llamas y alpacas contienen similares proporciones de ambas especies (H1, H2, H4, H5, H7, H9, H11 y H15). Las llamas que presentan haplotipo de alpaca son mayormente provenientes de Catacora (seis individuos) y una de Ulla Ulla. Mientras que el número de alpacas que presentan haplotipos de llama (64 individuos, provenientes de las tres regiones en similares proporciones) es mayor a aquellas que presenta haplotipos de alpacas (50 individuos).

La composición de los haplotipos del haplogrupo HV incluye a llamas que están representadas en menor proporción que alpacas o vicuñas y se encuentran en tres haplotipos (H6, H10 y H16). La mayor presencia de individuos de alpacas en HG, respecto a individuos llamas en HV demuestra mayor presencia de hibridación e introgresión en la población de alpaca (árbol filogenético de la Figura 6).

Por otra parte, los huarizos se encuentran distribuidos en ambos haplogrupos. Se presentan 33 huarizos en los nueve haplotipos de HG y diez huarizos en cuatro de los nueve haplotipos de HV, lo que podría explicar eventos de hibridación en ambas direcciones, pero mayor en la dirección de llamas hembras y machos alpacas. En la Tabla 11 se detalla el número de haplotipos por especie.

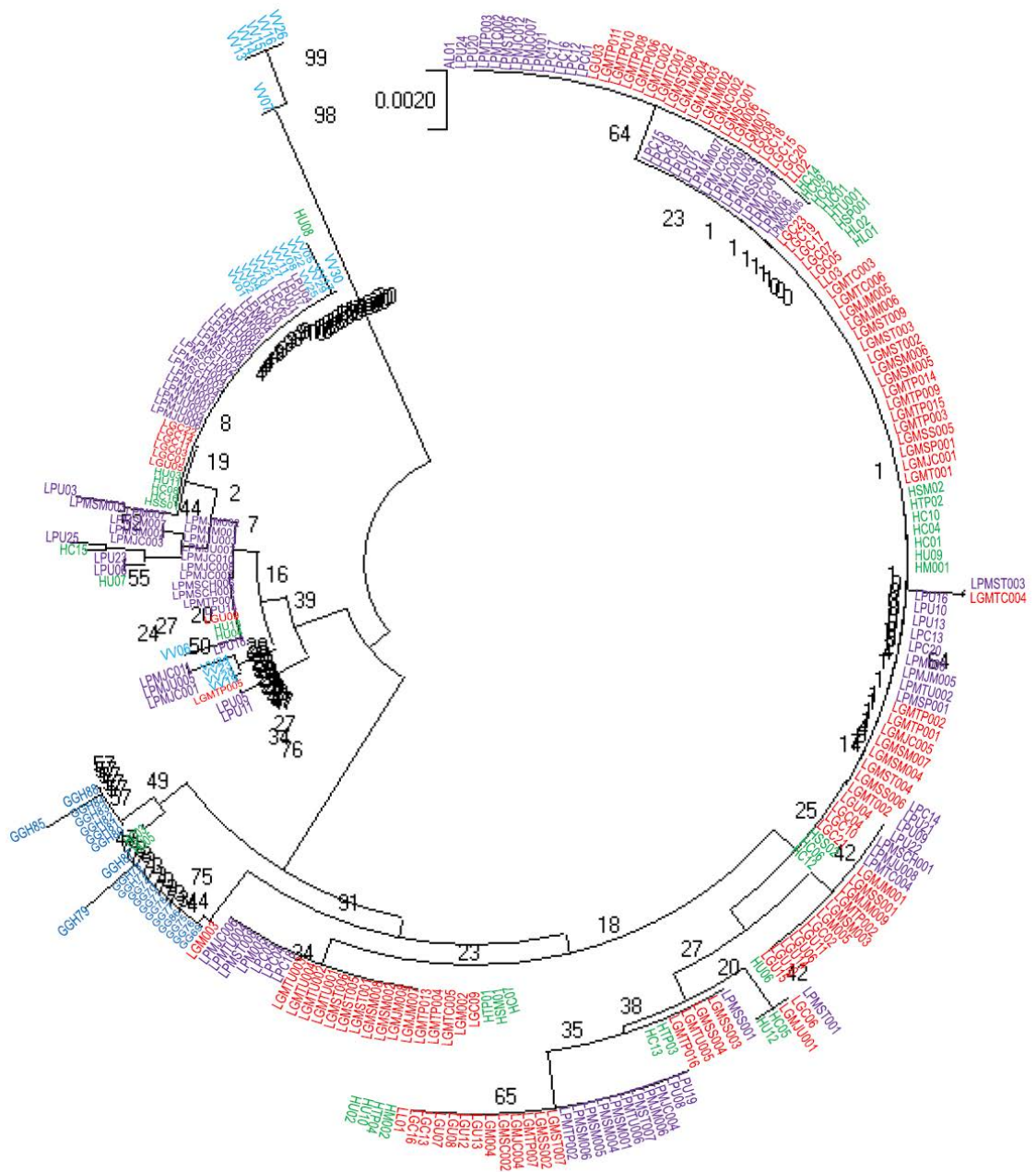


Figura 6. Árbol filogenético haplotipos mitocondriales.

Árbol Neighbor-Joining construido en base a los 28 haplotipos identificados usando 314 secuencias de la región D-Loop mitocondrial (451 pb).

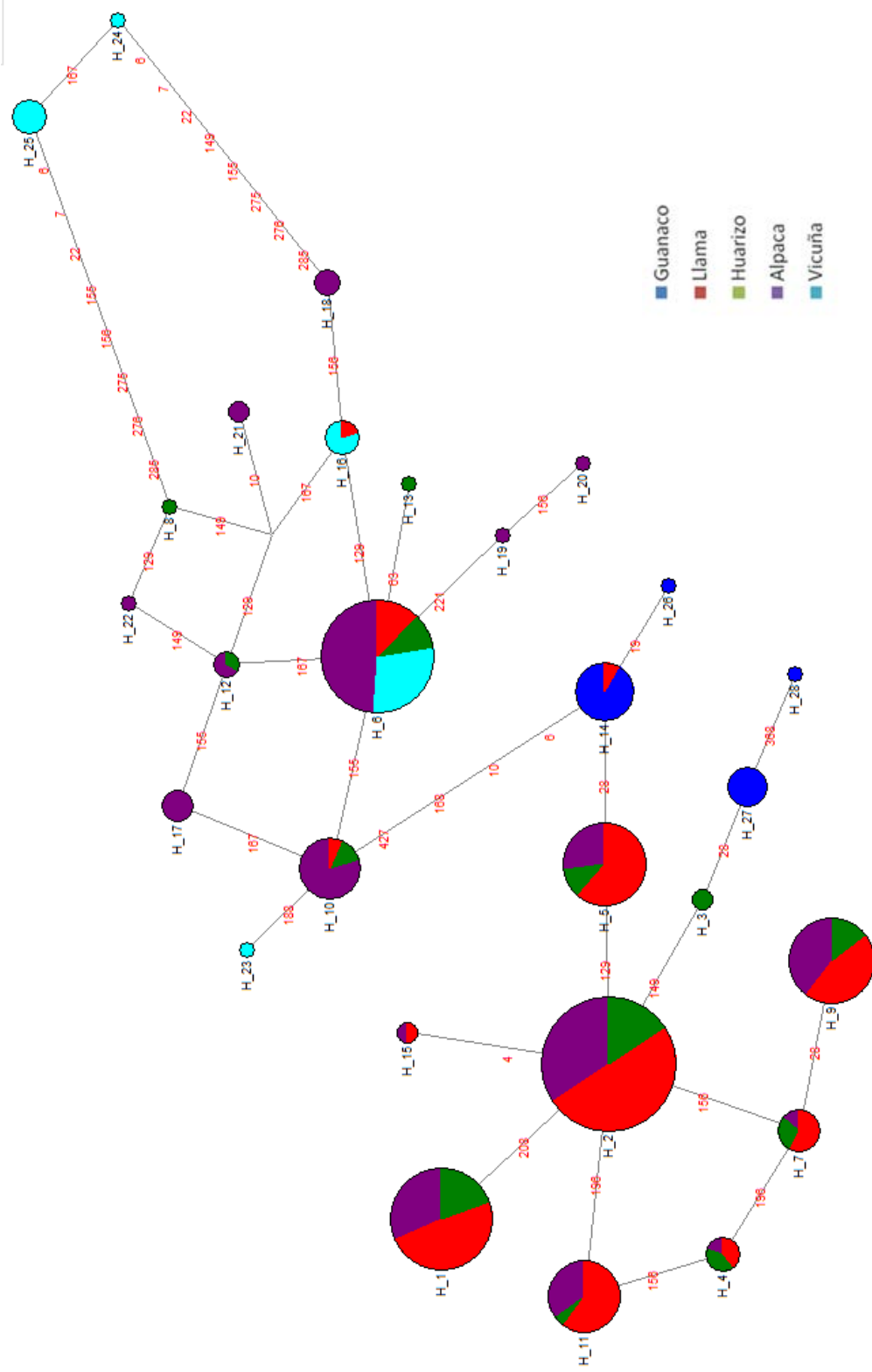


Figura 7. Red de Haplotipos de la región control de ADN mitocondrial.

Red de haplotipos Neighbor-Joining construido en base a los 28 haplotipos identificados usando 314 secuencias de la región D-Loop mitocondrial (451 pb). La escala representa la distancia genética. El área del círculo es aproximadamente proporcional a la frecuencia.

Tabla 11. Número de individuos por haplotipo de ADN mitocondrial por especie.

Al finalizar se registra el número de haplotipos únicos por especie.

Haplogrupo	Haplotipo	Alpacas (115)	Huarizos (43)	Llamas (112)	Guanacos (20)	Vicuñas (25)
HG	Hap_1	13	8	20	0	0
HG	Hap_2	24	11	35	0	0
HG	Hap_3	0	2	0	0	0
HG	Hap_4	1	2	2	0	0
HG	Hap_5	7	3	16	0	0
HV	Hap_6	24	5	6	0	14
HG	Hap_7	1	2	4	0	0
HV	Hap_8	0	1	0	0	0
HG	Hap_9	11	4	13	0	0
HV	Hap_10	12	2	1	0	0
HG	Hap_11	7	1	12	0	0
HV	Hap_12	2	1	0	0	0
HV	Hap_13	0	1	0	0	0
HG	Hap_14	0	0	1	12	0
HG	Hap_15	1	0	1	0	0
HV	Hap_16	0	0	1	0	4
HV	Hap_17	4	0	0	0	0
HV	Hap_18	3	0	0	0	0
HV	Hap_19	1	0	0	0	0
HV	Hap_20	1	0	0	0	0
HV	Hap_21	2	0	0	0	0
HV	Hap_22	1	0	0	0	0
HV	Hap_23	0	0	0	0	1
HV	Hap_24	0	0	0	0	1
HV	Hap_25	0	0	0	0	5
HG	Hap_26	0	0	0	1	0
HG	Hap_27	0	0	0	6	0
HG	Hap_28	0	0	0	1	0
	Haplotipos únicos	6	3	0	3	3

La distribución de los individuos en los haplotipos mitocondriales demuestra una mayor introgresión entre llamas y alpacas, ya que junto a las vicuñas comparten haplotipos (Barreta et al., 2013a). La información generada por el ADN mitocondrial demuestra que llamas y alpacas comparten hasta un 80% de similitudes (Kadwell *et al.*; 2001). En el presente estudio se encontró que el 4,48% de las llamas y el 58,88% de las alpacas presentan introgresión de la otra especie en su genoma mitocondrial. Marín et al. (2017) demuestran hasta el 67% de alpacas y el 25% de llamas con introgresión en el

genoma mitocondrial, similar a lo encontrado por Barreta et al. (2013a) con mayor porcentaje de introgresión en el genoma mitocondrial de alpacas (51% en la secuencia D-Loop y 63% en la secuencia MT-CYB).

5.1.1. Diversidad nucleotídica y haplotípica de la región control de ADN mitocondrial

La diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) encontrada para la secuencia de la región control del ADN mitocondrial analizada se detalla en la Tabla 12. La mayor diversidad reportada se da en llamas, huarizos y alpacas en relación a las vicuñas. La mayor diversidad encontrada en huarizos se explicaría por el hecho de tratarse de individuos híbridos, por lo que este grupo presenta haplotipos de ambas especies con mayor diversidad haplotípica. Por otra parte, la diversidad genética de vicuñas y guanacos se habría reducido históricamente a causa de las disminuciones de su tamaño efectivo poblacional, por cuellos de botella a lo largo de su historia evolutiva (Díaz-Maroto et al., 2020; Casey et al., 2018).

Tabla 12. Diversidad haplotípica y nucleotídica de la región control de ADN mitocondrial, por especie.
Cálculos realizados en DNASP v5 con 314 secuencias de la región D-Loop mitocondrial (451 pb).

	Diversidad Haplotípica (h)	Diversidad nucleotídica (π)
Guanacos	0,574	0,0026
Llamas	0,828	0,0048
Huarizos	0,883	0,0082
Alpacas	0,877	0,0095
Vicuñas	0,643	0,0097

Contrario a lo encontrado con el marcador del cromosoma “Y”, se halló mayor variabilidad con el marcador mitocondrial, similar a lo descrito por Marín et al. (2017) con los mismos marcadores ligados al sexo, quienes obtuvieron 81 haplotipos del marcador mitocondrial (N=185, 300 pb), significando una mayor variabilidad que en las secuencias del fragmento del intrón DBY.

Tabla 13. Distribución de haplotipos mitocondriales en las poblaciones.

Se muestra el número de individuos llamas, alpacas y huarizos con cada uno de los haplotipos. El número de individuos provenientes de Curahuara de Carangas es mayor al de otras zonas (N=161). Al finalizar la tabla se registra el número de haplotipos únicos en las poblaciones.

Haplogrupo	Haplotipo	Catacora (54)	Curahuara (161)	Ulla Ulla (49)
HG	H1	11	23	3
HG	H2	19	42	8
HG	H3	1	0	1
HG	H4	2	2	1
HG	H5	5	21	0
HV	H6	10	19	6
HG	H7	1	6	0
HV	H8	1	0	0
HG	H9	2	17	8
HV	H10	0	10	5
HG	H11	2	9	9
HV	H12	0	0	3
HV	H13	0	0	1
HG	H14	0	1	0
HG	H15	0	2	0
HV	H16	0	1	0
HV	H17	0	4	0
HV	H18	0	3	0
HV	H19	0	1	0
HV	H20	0	0	1
HV	H21	0	0	2
HV	H22	0	0	1
	Haplotipos únicos	1	6	5

En la tabla 13 se detalla la distribución de haplotipos en las poblaciones de estudio, encontrando mayor número de haplotipos únicos en Curahuara y Ulla Ulla, respecto a Catacora donde se encontraron dos haplotipos únicos. Los cinco haplotipos únicos de Ulla Ulla y el de Catacora pertenecen al haplogrupo HV, mientras que en Curahuara de Carangas 4 son del haplogrupo HV y dos del haplogrupo HG. Lo que demuestra mayor diversidad en la zona de Curahuara seguida de Ulla Ulla y Catacora.

5.1.2. Distribución geográfica de haplotipos mitocondriales

A partir de las secuencias de la región control de ADN mitocondrial de llamas, alpacas y huarizos se estableció la distribución geográfica de los haplotipos en las zonas de estudio (Figura 8). Se observó que existe mayor proporción de haplotipos de llamas en todas las regiones, excepto en Catacora. Asimismo, se registra mayor número de haplotipos de alpacas en Ulla Ulla y mayor número de haplotipos de llamas en Curahuara de Carangas.

También se desarrolló un mapa de distribución geográfica de los haplotipos por especie (llamas, alpacas y huarizos) (Figura 8). En la Figura 8 (a) se grafica la distribución de los haplotipos en las poblaciones cuantificando los individuos de los 3 grupos (llamas, alpacas y huarizos). En la Figura 8 (b) se observa la introgresión en llamas de las diferentes zonas (en tonos azules), presentado mayor introgresión la población de llamas de Catacora con un 22,72%. En la Figura 8 (c) se observa mayor introgresión de haplotipos de llamas en las poblaciones de alpacas (en tonos rojos), en Catacora el 45,48% (con seis haplotipos) y en Curahuara el 46,83% (con cuatro haplotipos).

Existe introgresión en el genoma mitocondrial en las tres regiones de estudio, sobre todo en las poblaciones de alpacas, lo que indica que podría tratarse de eventos históricos de hibridación e introgresión previos, que se dieron durante el proceso de domesticación y en la historia evolutiva temprana de las alpacas, como lo descrito por Díaz-Maroto et al. (2020). El menor porcentaje de introgresión en Alpacas de Ulla Ulla podría relacionarse con el manejo que se realiza en esta zona enfocado a la producción de fibra de alpacas, donde la población de llamas sería minoritaria (INE Bolivia, 2019).

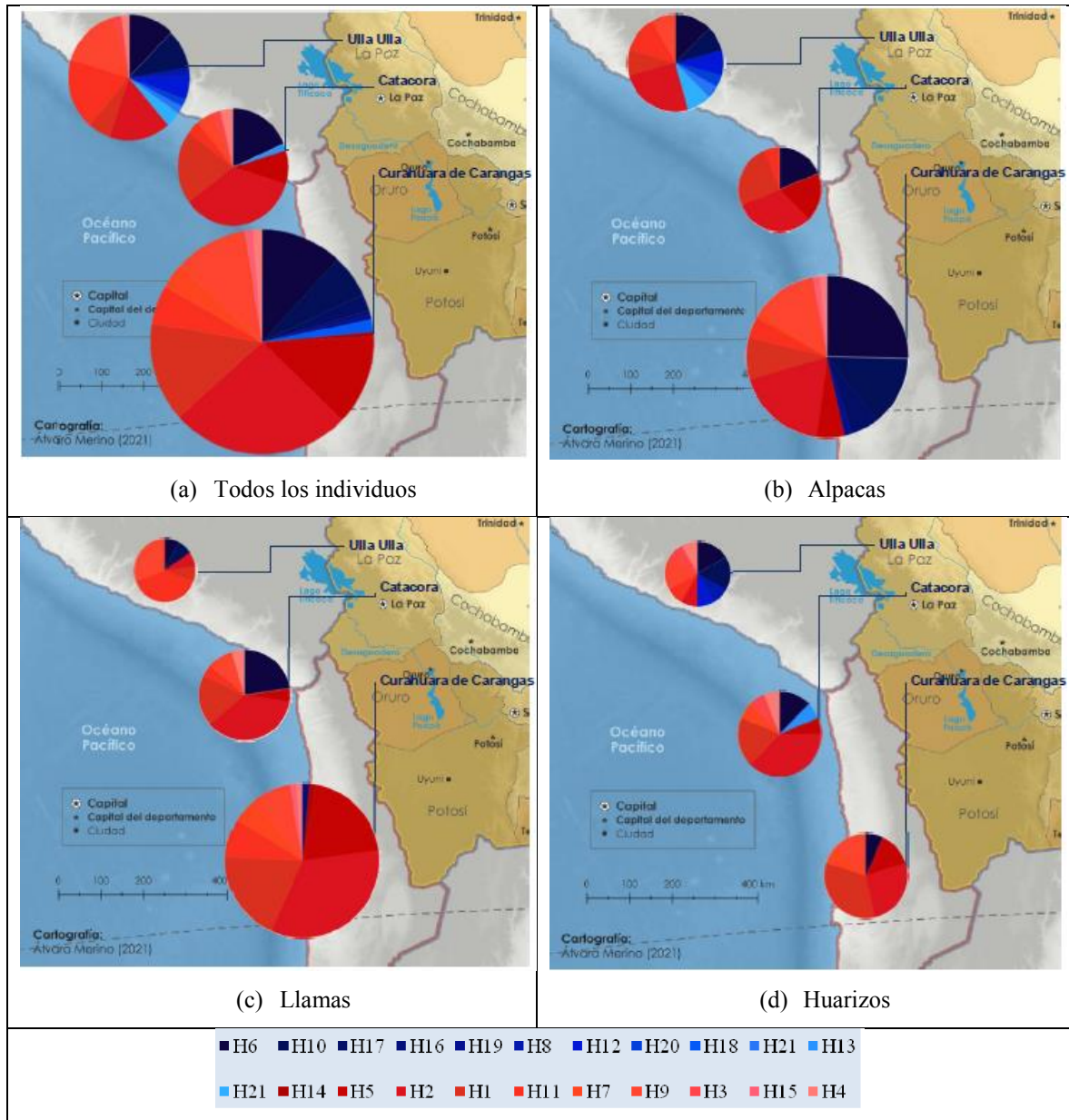


Figura 8. Distribución geográfica de los haplotipos mitocondriales en cada uno de los grupos de estudio. Se grafican las proporciones de los haplotipos mitocondriales para cada grupo y zona. Las coloraciones rojizas corresponden a haplotipos de llama y las azules a haplotipos de alpacas. El tamaño de las gráficas es proporcional al número de individuos con cada haplotipo.

5.2. Hibridación e introgresión entre llamas y alpacas con haplotipos mitocondriales y del cromosoma “Y”

Para determinar la dirección y la congruencia de la hibridación a nivel mitocondrial y del cromosoma “Y”, se contrastaron los resultados de herencia paterna de las secuencias del intrón DBY del cromosoma “Y”, con haplotipos de herencia materna de ADN mitocondrial. Con la combinación de estos haplotipos se determinó la procedencia de cada individuo macho de llama, alpaca y huarizo.

Se registraron cuatro posibles combinaciones de haplotipos, que corresponderían a la ascendencia materna y paterna de cada individuo:

- Mitocondrial llama - Cromosoma “Y” llama (L-L)
- Mitocondrial llama - Cromosoma “Y” alpaca (L-A)
- Mitocondrial alpaca – Cromosoma “Y” llama (A-L)
- Mitocondrial alpaca – Cromosoma “Y” alpaca (A-A)

Los resultados obtenidos demuestran que las llamas en su mayoría (59 de 67) proceden de un cruce L-L, a excepción de ocho que provienen de cruces A-L o L-A. Mientras que las alpacas tienen menos del 50% de procedencia de cruce A-A, siendo mayoritario el cruce L-A (37 de 68) (Figura 9), es decir que presentan elevada introgresión en el genoma materno.

Por otra parte, los individuos identificados fenotípicamente como huarizos no presentan en todos los casos una procedencia de cruce entre especies, esto reflejaría la elevada introgresión de ADN mitocondrial de llamas en las poblaciones de alpacas, ya que se observa una proporción considerable de cruce L-L y L-A, que suman un 75% de los huarizos. Asimismo, los huarizos identificados fenotípicamente, no representan el total de los individuos híbridos en las poblaciones, ya que el 11,94% de las llamas y el 55,88% de las alpacas presentan hibridación. Con la aplicación de los mismos

marcadores ligados al sexo Marín et al. (2017) reportaron un 24,5% de híbridos en llamas y un 69,7% en alpacas.

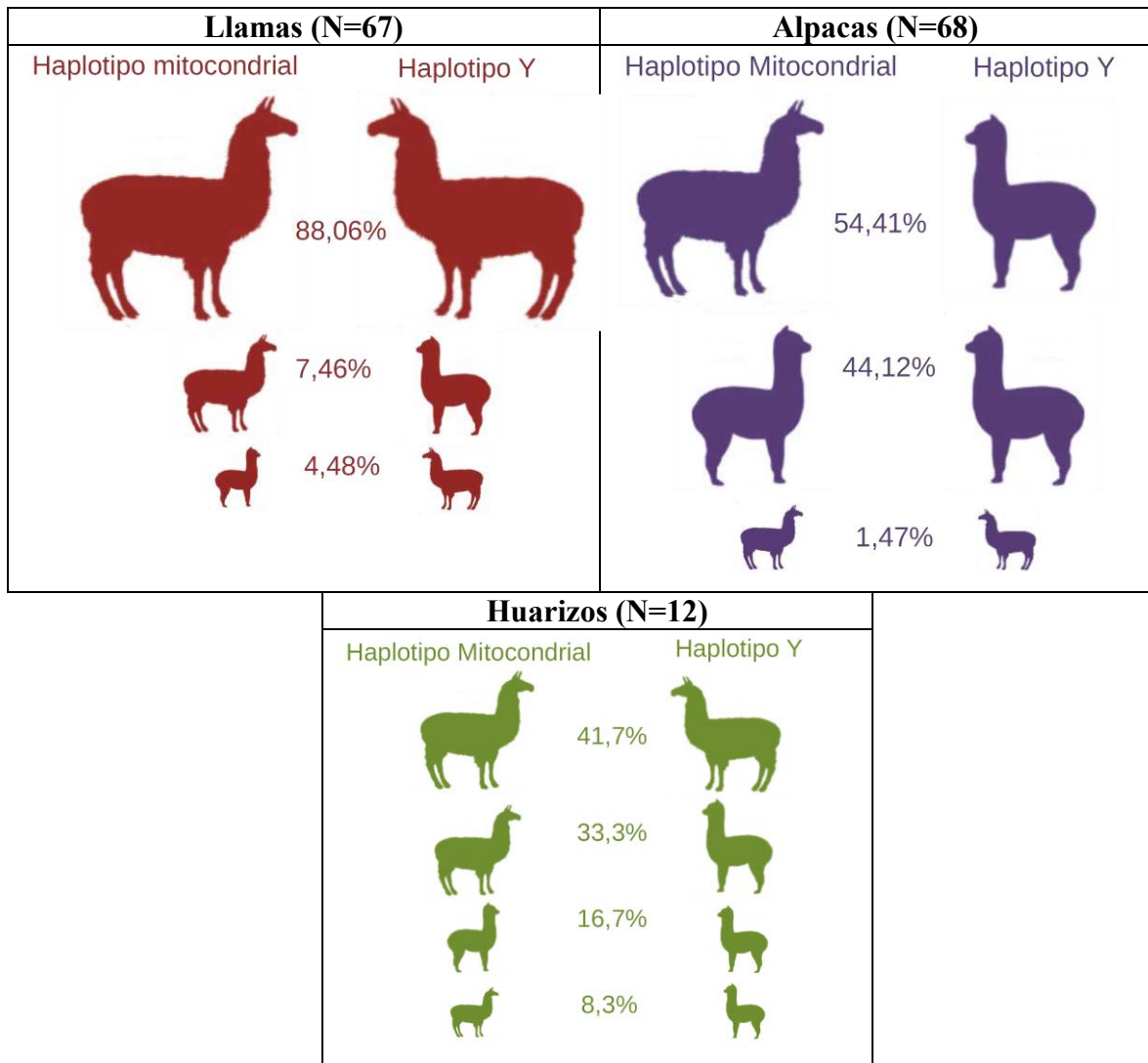


Figura 9. Porcentaje de las combinaciones de haplotipos mitocondrial (D-Loop) y del cromosoma "Y" (DBY) en las poblaciones de machos de llamas, huarizos y alpacas.

Proporción de individuos puros (haplotipos "Y" y mitocondrial de la especie identificada por el fenotipo) e híbridos con introgresión materna (haplotipo mitocondrial de la otra especie) y paterna (haplotipo Y de la otra especie).

La presencia de haplotipos compartidos entre llamas y alpacas demuestra la hibridación frecuente en la historia de sus poblaciones. Se ha reportado previamente la presencia de haplotipos mitocondriales compartidos entre llamas, alpacas y vicuñas (Barreta et al., 2013a) y un número considerable de alpacas con haplotipos del género *Lama* (Stanley et al., 1994; Kadwell et al., 2001). Asimismo, se encontró introgresión del genoma de alpacas en el genoma de llamas y viceversa con el uso de marcadores microsatélites (autosómicos) (Echalar et al., 2020).

En las Tablas 14 y 15 se detalla la distribución de llamas, alpacas y huarizos por población y especie en cada uno de los cruces detallado anteriormente. En la población de Catacora se registra la mayor frecuencia de cruces entre especies, seguido de Ulla Ulla, ambas poblaciones presentan mayor proporción del cruce L-A, hembra llama-macho alpaca (Tabla 14).

Tabla 14. Combinación de haplotipo “Y” y mitocondrial por población.
Se detalla el número de individuos macho y el porcentaje asignado a cada cruce por población.

	Cruce			
	L-A	A-L	L-L	A-A
Ulla Ulla	35.29%(6)	5.88% (1)	5.88% (1)	52.94% (9)
Catacora	42.86% (6)	21.43% (3)	35.71% (5)	0.00%
Curahuara	28.32% (32)	1.77% (2)	49.56% (56)	20.35% (23)

En las tres poblaciones de alpacas predomina el cruce L-A, en Catacora se presenta el mayor nivel de introgresión de genoma de llama por el lado materno (100%, 4 individuos). Las llamas de Catacora y Ulla Ulla presentan una proporción similar en los cruces A-L y L-L, mientras que las llamas de Curahuara son mayormente puras, es decir poseen el genotipo L-L (Tabla 15).

Tabla 15. Proporciones de la combinación de haplotipos “Y” y mitocondrial por población y especie.
Se detalla el número de individuos macho y el porcentaje asignado a cada cruce por población y especie.

		Cruce			
		L-A	A-L	L-L	A-A
Ulla Ulla	Alpaca	42.86% (6)	0.00%	0.00%	57.14% (8)
	Huarizo	0.00%	0.00%	0.00%	100.00% (1)
	Llama	0.00%	50.00% (1)	50.00% (1)	0.00%
Catacora	Alpaca	100.00% (4)	0.00%	0.00%	0.00%
	Huarizo	66.67% (2)	0.00%	33.33% (1)	0.00%
	Llama	0.00%	42.86% (3)	57.14% (4)	0.00%
Curahuara	Alpaca	54.17% (26)	0.00%	0.00%	45.83% (22)
	Huarizo	14.29% (1)	14.29% (1)	57.14% (4)	14.29% (1)
	Llama	5.45% (3)	1.82% (1)	92.73% (51)	0.00%

El manejo que se da por parte de los productores en cada una de las zonas difiere, en Curahuara de Carangas el manejo y selección está enfocado a la producción de carne de llama, por lo que la introgresión en poblaciones de la especie es reducida, mientras que las alpacas presentan altos niveles de introgresión, esto podría deberse a que machos con características no deseables en producción de fibra de alpacas son descartados para su faenado, por lo que están altamente representados en la muestra proveniente del matadero. Sin embargo, a pesar de que en Ulla Ulla y Catacora el enfoque es seleccionar a alpacas con mejores características de fibra, la presencia de introgresión es elevada. Durante 7000 años de domesticación llamas y alpacas han estado bajo diferentes procesos de selección natural y manejo, aunque se hace evidente la necesidad de mantener la pureza y diversidad de estas especies para evitar la pérdida o debilitamiento de características productivas (Varas et al., 2020).

Los datos obtenidos con marcadores nucleares autosómicos y mitocondriales sugieren una cercanía genética entre llamas y alpacas (Echalar et al., 2020; Barreta et al., 2013a), contrario a lo obtenido con datos del cromosoma “Y” (Marín et al., 2017). Respecto a la evidencia del flujo genético entre estas especies, Echalar et al. (2020) sugieren que esto ocurre por la introgresión entre las especies ya que aún no se encuentran totalmente

separadas evolutivamente. Estos eventos de hibridación podrían tener diferentes consecuencias evolutivas, generando especies fusionadas, introgresión en todo el genoma, radiación adaptativa por las nuevas variaciones genéticas, generar nuevas especies híbridas o la pérdida de la especie original (Chan et al., 2019; Seehausen, 2004).

El hecho de encontrar bajos niveles de diversidad e introgresión con el marcador del cromosoma “Y” en comparación a lo encontrado con el marcador mitocondrial también se podría explicar por un sesgo en el éxito reproductivo de los machos (Kayser et al., 2003), dado el comportamiento reproductivo de los camélidos, en el que pocos machos engendran la mayor parte de la descendencia. Mallet (2005) hace referencia a la regla de Handel (1922) sobre el efecto de la introgresión en el sexo heterogamético, que sufre mayor probabilidad de incompatibilidad de los híbridos. En mamíferos se daría en los machos que a diferencia de especies con heterogamia en hembras, se exhibe una elevada introgresión mitocondrial.

La aplicación de marcadores ligados al sexo permite identificar la dirección de la hibridación e introgresión entre especies cercanas. En este estudio se pudo determinar que la dirección de la hibridación de llamas y alpacas es entre hembras llamas y machos alpacas. La dirección de la hibridación hace referencia a los comportamientos reproductivos de las especies. Por ejemplo, entre perros y lobos o perros y coyotes la dirección de la hibridación es entre machos perros y hembras de las especies salvajes, lo que refleja el comportamiento de perros ferales (Godinho et al., 2011; Wheeldon et al., 2013).

En los animales domésticos el manejo y selección artificial influye en los patrones de hibridación. En el caso de llamas y alpacas la selección de los machos reproductores dada por los productores está enfocada a escoger aquellos machos con las mejores características fenotípicas de la especie. La presencia de introgresión en especies

domesticas podría ser consecuencia de las prácticas de manejo como ocurre en ganado vacuno (Mauki & Adeola, 2021) al igual que en los camélidos. En ganado nigeriano, estudiado también con marcadores ligados al sexo, se observó una elevada diversidad genética, tanto materna como paterna, y una estructura filogeográfica no definida (Mauki & Adeola, 2021).

Los hallazgos encontrados con la aplicación del marcador del cromosoma “Y” contribuirían a la teoría de la domesticación independiente de llamas y alpacas (Marín et al., 2017), que previamente asignaba a las alpacas en el género *Vicugna* (Casey et al., 2018; Marín et al., 2017). Sin embargo, esto contradice a los hallazgos con los marcadores mitocondriales (Barreta et al., 2013a), marcadores microsatélites autosómicos (Echalar et al., 2020) y la introgresión reportada en todo el genoma (Fan et al., 2020), que demuestran una elevada introgresión en las alpacas de diferentes poblaciones lo que refleja eventos históricos de hibridación y hace confusa la filogenia de la especie. De forma similar, se ha descrito en ganado vacuno y otras especies del género *Bos* que el establecimiento de las relaciones filogenéticas también es complejo debido a la elevada introgresión, la cual además podría representar una hibridación adaptativa durante el proceso de domesticación (Wu et al., 2018).

6. Conclusiones

- A partir del testeo de marcadores moleculares del cromosoma “Y”, se seleccionó al marcador tipo SNP (DBY) aplicable a las especies de estudio, el cual fue descrito para camellos sudamericanos (Marín et al., 2017). Se descartaron 21 marcadores descritos para otras especies de ungulados, incluyendo marcadores para dromedarios, esto se debería a las características evolutivas del cromosoma “Y” y a la distancia evolutiva entre las especies.
- Se identificaron tres haplotipos de la secuencia del intrón DBY (376pb) específicas para las especies, HYG 1 (guanacos), HYG 2 (llamas) y HYV (compartido entre vicuñas y alpacas).
- El número de haplotipos (tres), diversidad haplotípica ($h = 0,610$) y diversidad nucleotídica ($\pi = 0,006$) encontrada en la secuencia del fragmento del intrón DBY cromosoma “Y” fue menor a la encontrada en la secuencia mitocondrial.
- Las poblaciones de alpacas de Catacora y Curahuara de Carangas presentan mayor introgresión mitocondrial que la región de Ulla Ulla.
- A través de la identificación de haplotipos del cromosoma “Y” y del ADN mitocondrial se pudo determinar la dirección de la hibridación entre llamas y alpacas de las poblaciones de estudio, la cual se da mayormente entre hembras de llamas y machos de alpacas (L-A), encontrando mayor proporción de individuos de alpacas con este genotipo (54,41%).
- Los individuos identificados fenotípicamente como huarizos presentaron mayor porcentaje de genotipo L-L, es decir ascendencia materna y paterna de llama, esto podría deberse a la elevada introgresión de ADN mitocondrial de llamas en alpacas.

- Los patrones de introgresión encontrados al realizar la comparación entre los marcadores moleculares ligados al sexo demuestran asimetría, encontrándose una introgresión evidentemente mayor en dirección materna (marcador mitocondrial).
- Los datos generados en los haplotipos del marcador del cromosoma “Y” y de ADN mitocondrial son discordantes en el momento de establecer la relación filogenética entre los camélidos sudamericanos. Los haplotipos mitocondriales son compartidos entre llamas y alpacas por lo que demuestran y una alta cercanía evolutiva entre estas especies, mientras que los datos generados con el marcador DBY separan a los géneros *Lama* (llamas-guanacos) y *Vicugna* (vicuñas-alpacas).

7. Limitaciones del estudio y recomendaciones

- Entre las limitaciones del estudio se puede citar el sesgo de los resultados obtenidos con un solo marcador del cromosoma “Y”. Sería muy recomendable incrementar el número de marcadores, sobre todo a la luz de los nuevos avances en la secuenciación del genoma de los camélidos (Fan et al., 2020) y la descripción de marcadores microsatélites del cromosoma “Y” para camellos bactrianos (Chen et al., 2018; Felkel et al., 2019).
- El número de huarizos macho (identificados fenotípicamente) evaluados fue reducido, al igual que el número de llamas y alpacas de dos de las regiones (Catacora y Ulla Ulla). Esto influyó en el momento de determinar la estructura poblacional, por lo que, en futuros estudios, sería necesario incrementar el tamaño muestral para determinar la relación entre las poblaciones y grupos.

- La diferencia encontrada entre los marcadores mitocondrial y del cromosoma “Y” en relación a los niveles introgresión, se podría explicar por la heterogamia en los machos XY que jugaría un rol en la fertilidad. Este aspecto debe ser sumado a la selección artificial llevada a cabo por los productores locales sobre los machos reproductores, además de la posible existencia de una ventaja por la hibridación adaptativa en las alpacas en determinadas regiones de su genoma.
- Para poder determinar las causas de la direccionalidad de los patrones de introgresión, en el futuro se recomienda evaluar la eficacia de la descendencia híbrida en ambas direcciones, identificar efectos de la selección natural sobre estos individuos macho y posibles efectos sobre la fertilidad.
- Con la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación NGS se hará posible evaluar en detalle los patrones de introgresión en llamas y alpacas, así como también realizar una evaluación a nivel geográfico y por sexo.
- Es posible que existan factores adaptativos que influyeron en la historia evolutiva de las alpacas, por lo que sería necesario identificar regiones genómicas nucleares y mitocondriales que se encuentren sometidas a selección.

8. Bibliografía

- Agapito, J., Rodriguez, J., Herrera-Velit, P., Timoteo, O., Rojas, P., Boettcher, P., . . . Espinoza, J. (2008). Parentage testing in alpacas (*Vicugna pacos*) using semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 10 microsatellite markers. *Animal genetics*, *39*(2), 201-203.
- Aitken, N., Smith, S., Schwarz, C., & Morin, P. A. (2004). Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. *Molecular ecology*, *13*(6), 1423-1431.
- Aliy-bek, D. K., Duduev, A. S., Kokov, Z. A., Amshokov, K. K., Zhekamukhov, M. K., Zaitsev, A. M., & Reissmann, M. (2018). Genetic analysis of maternal and paternal lineages in Kabardian horses by uniparental molecular markers. *Open veterinary journal*, *8*(1), 40-46.
- Anello, M., Daverio, M. S., Romero, S. R., Rigalt, F., Silbestro, M. B., Vidal-Rioja, L., & Di Rocco, F. (2016). Genetic diversity and conservation status of managed vicuña (*Vicugna vicugna*) populations in Argentina. *Genetica*, *144*(1), 85-97.
- Arnold, M. L. (2004). Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. *Molecular Ecology*, *13*(5), 997-1007.
- Ashley, M. V., & Dow, B. D. (1994). The use of microsatellite analysis in population biology: background, methods and potential applications. In *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* (pp. 185-201). Birkhäuser, Basel.
- Barreta, J., Iñiguez, V., Saavedra, V., Romero, F., Callisaya, A. M., Echalar, J., . . . Arranz, J. J. (2012). Genetic diversity and population structure of Bolivian alpacas. *Small Ruminant Research*, *105*(1-3), 97-104. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.03.002
- Barreta, J., Gutierrez-Gil, B., Iniguez, V., Romero, F., Saavedra, V., Chiri, R., . . . Arranz, J. J. (2013). Analysis of genetic diversity in Bolivian llama populations using microsatellites. *J Anim Breed Genet*, *130*(4), 321-330. doi:10.1111/jbg.12009
- Barreta, J., Gutierrez-Gil, B., Iniguez, V., Saavedra, V., Chiri, R., Latorre, E., & Arranz, J. J. (2013a). Analysis of mitochondrial DNA in Bolivian llama, alpaca and vicuna

- populations: a contribution to the phylogeny of the South American camelids. *Anim Genet*, 44(2), 158-168. doi:10.1111/j.1365-2052.2012.02376.x
- Bonacic, C., & Australis, F. (2011). Ecología de la vicuña y su ordenación. *Ecología. Info*, 27.
- Bonavia, D. (2008). *The South American Camelids*: Cotsen Institute of Archaeology. University of California, Los Angeles.
- Bravo, P. W. (1994). Reproductive Endocrinology of Llamas and Alpacas. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(2), 265-279. doi:10.1016/s0749-0720(15)30561-2
- Bromham, L. (2011). The genome as a life-history character: why rate of molecular evolution varies between mammal species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1577), 2503-2513.
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.
- Brumfield, R. T., Beerli, P., Nickerson, D. A., & Edwards, S. V. (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 249-256.
- Bunlungsup, S., Kanthaswamy, S., Oldt, R. F., Smith, D. G., Houghton, P., Hamada, Y., & Malaivijitnond, S. (2017). Genetic analysis of samples from wild populations opens new perspectives on hybridization between long-tailed (*Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American journal of primatology*, 79(12), e22726.
- Burger, P. A. (2016). The history of Old World camelids in the light of molecular genetics. *Trop Anim Health Prod*, 48(5), 905-913. doi:10.1007/s11250-016-1032-7
- Bustamante, A. V., Zambelli, A., De Lamo, D. A., Von Thungen, J., & Vidal-Rioja, L. (2002). Genetic variability of guanaco and llama populations in Argentina. *Small Ruminant Research*, 44(2), 97-101.

- Bustamante, A. V., Maté, M. L., Lamas, H. E., Giovambattista, G., Zambelli, A., & Vidal-Rioja, L. (2006). Análisis de diversidad genética en tres poblaciones de llamas (*Lama glama*) del noroeste argentino. *Revista Chilena de Historia Natural*, 79(2), 175-184.
- Calafell, F., & Larmuseau, M. H. (2017). The Y chromosome as the most popular marker in genetic genealogy benefits interdisciplinary research. *Human genetics*, 136(5), 559-573.
- Calderon, M., More, M. J., Gutierrez, G. A., & Ponce de León, F. A. (2021). Development of a 76k Alpaca (*Vicugna pacos*) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Microarray. *Genes*, 12(2), 291.
- Cardozo, Armando. (1985). Crianza y producción de camélidos en Bolivia. United States Aid Mission to Bolivia.
- Casey, C. S., Orozco-terWengel, P., Yaya, K., Kadwell, M., Fernández, M., Marín, J. C., ... & Bruford, M. W. (2018). Comparing genetic diversity and demographic history in co-distributed wild South American camelids. *Heredity*, 121(4), 387-400.
- Chan, W. Y., Hoffmann, A. A., & van Oppen, M. J. (2019). Hybridization as a conservation management tool. *Conservation Letters*, 12(5), e12652.
- Chen, H., Ren, Z., Zhao, J., Zhang, C., & Yang, X. (2018). Y-chromosome polymorphisms of the domestic Bactrian camel in China. *Journal of genetics*, 97(1), 3-10.
- Cristofanelli, S., Antonini, M., Torres, D., Polidori, P., & Renieri, C. (2004). Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat science*, 66(3), 589-593.
- Cristofanelli, S., Antonini, M., Torres, D., Polidori, P., & Renieri, C. (2005). Carcass characteristics of Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*) reared in the Andean highlands. *Small Ruminant Research*, 58, 219-222.
- Cui, P., Ji, R., Ding, F., Qi, D., Gao, H., Meng, H., . . . Zhang, H. (2007). A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (*Camelus bactrianus*

- ferus): an evolutionary history of camelidae. *BMC Genomics*, 8, 241.
doi:10.1186/1471-2164-8-241
- de Lamo, D. A. (2011). Camélidos sudamericanos: Historia, usos y sanidad animal. *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires.*
- Diaz-Maroto, P., Rey-Iglesia, A., Cartajena, I., Núñez, L., Westbury, M. V., Varas, V., ... & Hansen, A. J. (2021). Ancient DNA reveals the lost domestication history of South American camelids in Northern Chile and across the Andes. *Elife*, 10, e63390.
- Dowling, T. E., & Secor, C. L. (1997). The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual review of Ecology and Systematics*, 28(1), 593-619.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15
- Echalar, J. (2015). *Diversidad genética de alpacas (Lama pacos) en sistemas doyproductivos y/o regiones de crianza en el Altiplano Norte y Central de Bolivia.* (Tesis de Grado: Licenciatura), Universidad Mayor de San Andres, La Paz-Bolivia.
- Echalar, J., Barreta, J., Iniguez, V., Romero, F., Callisaya, A. M., & Saavedra, V. (2020). Intraspecific genetic analysis of Bolivian alpacas and interspecific relationship with llamas and vicunas. *Small Ruminant Research*, 189, 106137.
- Edwards, D., Forster, J. W., Chagné, D., & Batley, J. (2007). What Are SNPs?. In *Association mapping in plants* (pp. 41-52). Springer, New York, NY.
- Erler, A., Stoneking, M., & Kayser, M. (2004). Development of Y-chromosomal microsatellite markers for nonhuman primates. *Molecular Ecology*, 13(10), 2921-2930.
- Espejo Alvarado E. R. (2011), *Análisis de las practicas de machaje y su influencia en el mejoramiento de ganado camélido caso; Ayllu Mallkunaka, municipio de Choquecota, departamento de Oruro*(Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andres, La Paz-Bolivia.
- Espinoza Paz, J, 2018. *Determinación de las características morfométricas de llamas (Lama glama L.) alpacas (Vicugna pacos L.) e híbrido en zonas del municipio de*

- Catacora provincia Jose Manuel Pando del departamento de La Paz* (Tesis de Grado). Universidad Mayor de San Andres, La Paz-Bolivia
- Fan, R., Gu, Z., Guang, X., Marín, J. C., Varas, V., González, B. A., ... & Dong, C. (2020). Genomic analysis of the domestication and post-Spanish conquest evolution of the llama and alpaca. *Genome biology*, *21*(1), 1-26.
- FAO, F. A. O. (1996). Manual de prácticas de manejo de Alpacas y Llamas, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Roma. Italia.*
- Felkel, S., Wallner, B., Chuluunbat, B., Yadamsuren, A., Faye, B., Brem, G., ... & Burger, P. A. (2019). A first Y-chromosomal haplotype network to investigate male-driven population dynamics in domestic and wild Bactrian camels. *Frontiers in genetics*, *10*, 423.
- Frank, E. N., Hick, M. V. H., Gauna, C. D., Lamas, H. E., Renieri, C., & Antonini, M. (2006). Phenotypic and genetic description of fibre traits in South American domestic camelids (llamas and alpacas). *Small Ruminant Research*, *61*(2-3), 113-129.
- Gallardo, F., & Yacobaccio, H. (2005). Wild or domesticated? Camelids in early formative rock art of the Atacama Desert (Northern Chile). *Latin American Antiquity*, *16*(2), 115-130.
- GAMC, Gobierno Municipal de Catacora 2007. Plan de desarrollo Municipal Originario (PDMO) Quinquenio 2007-2011. La Paz-Bolivia.
- GAMCC, Gobierno Municipal de Curahuara de Carangas 2007. Plan de desarrollo Municipal Originario (PDMO) Quinquenio 2007-2011. Oruro-Bolivia.
- Garvin, M. R., Saitoh, K., & Gharrett, A. J. (2010). Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources*, *10*(6), 915-934.
- Godinho, R., Llana, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., Garcia, E. J., ... & Ferrand, N. (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular ecology*, *20*(24), 5154-5166.

- González, B. A., Orozco-terWengel, P., Von Borries, R., Johnson, W. E., Franklin, W. L., & Marín, J. C. (2014). Maintenance of genetic diversity in an introduced island population of guanacos after seven decades and two severe demographic bottlenecks: implications for camelid conservation. *PloS one*, *9*(3), e91714.
- Guirao-Rico, S., Ramirez, O., Ojeda, A., Amills, M., & Ramos-Onsins, S. E. (2018). Porcine Y-chromosome variation is consistent with the occurrence of paternal gene flow from non-Asian to Asian populations. *Heredity*, *120*(1), 63-76.
- Han, H., Zhang, Q., Gao, K., Yue, X., Zhang, T., Dang, R., ... & Lei, C. (2015). Y-single nucleotide polymorphisms diversity in Chinese indigenous horse. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, *28*(8), 1066.
- Hellborg, L., & Ellegren, H. (2004). Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(1), 158-163.
- Iacolina, L., Scandura, M., Gazzola, A., Cappai, N., Capitani, C., Mattioli, L., ... & Apollonio, M. (2010). Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: a contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mammalian Biology*, *75*(4), 341-347.
- INE Bolivia, Instituto Nacional de Estadística(2019). Encuesta Agropecuaria 2015. *Estado Plurinacional de Bolivia*. <https://www.ine.gob.bo>
- Ingram, D. S., Isaac, P. G., & Karp, A. (Eds.). (1998). *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman & Hall.
- Iñiguez, L., & Alem, R. (1996). La función de los camélidos como medio de transporte e intercambio en la región andina de Bolivia. *World Anim. Rev*, *1*(12-21).
- Ji, Q. M., Xin, J. W., Chai, Z. X., Zhang, C. F., Dawa, Y., Luo, S., ... & Zhong, J. C. (2021). A chromosome-scale reference genome and genome-wide genetic variations elucidate adaptation in yak. *Molecular ecology resources*, *21*(1), 201-211.
- Jiménez, C. E. P., Espada, C. M., & Vázquez, M. D. C., 23. (2010). Camélidos Sudamericanos: Clasificación, Origen y Características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, *4*(1).

- Jobling, M. A., & Tyler-Smith, C. (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 598-612.
- Johnson, L. W. (1989). Llama Reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 5(1), 159-182. doi:10.1016/s0749-0720(15)31008-2
- 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 the llama and the alpaca. *Proc Biol Sci*, 268(1485), 2575-2584. doi:10.1098/rspb.2001.1774
- Kayser, M., Brauer, S., Weiss, G., Schiefenhövel, W., Underhill, P., Shen, P., ... & Stoneking, M. (2003). Reduced Y-chromosome, but not mitochondrial DNA, diversity in human populations from West New Guinea. *The American Journal of Human Genetics*, 72(2), 281-302.
- Kent, J. D. 1982. The domestication and exploitation of the South American camelids: Methods of analysis and their application to circum-lacustrine archaeological sites in Bolivia and Peru. PhD dissertation, Department of Anthropology, Washington University, St. Louis. Ann Arbor, MI: University Microfilms
- Kikkawa, Y., Takada, T., Sutopo, Nomura, K., Namikawa, T., Yonekawa, H., & Amano, T. (2003). Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. *Animal Genetics*, 34(2), 96-101.
- Kivisild, T. (2017). The study of human Y chromosome variation through ancient DNA. *Human Genetics*, 136(5), 529-546.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.
- Ladoukakis, E. D., & Zouros, E. (2017). Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 24(1), 1-7.
- Lang, K., Wang, Y., & Plante, Y. (1996). Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Animal genetics*, 27(4), 293-293.

- Larramendy, M., Vidal, R., Bianchi, M., & Bianchi, N. (1983). Camélidos Sudamericanos: Estudios Genéticos. *Informe Final IX CLAZ PERU, Oct*, 159-163.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol Evol*, 20(5), 229-237. doi:10.1016/j.tree.2005.02.010
- Mamani-Linares, L. W., Cayo, F., & Gallo, C. (2014). Características de canal, calidad de carne y composición química de carne de llama: una revisión. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(2), 123-150.
- Manee, M. M., Algarni, A. T., Alharbi, S. N., Al-Shomrani, B. M., Ibrahim, M. A., Binghadir, S. A., & Al-Fageeh, M. B. (2019). Genome-wide characterization and analysis of microsatellite sequences in camelid species. *Mammal Research*, 1-15.
- Marín, J. C., Zapata, B., Gonzalez, B. A., Bonacic, C., Wheeler, J. C., Casey, C., . . . Spotorno, A. E. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural*, 80, 121-140.
- Marín, J. C., Romero, K., Rivera, R., Johnson, W. E., & Gonzalez, B. A. (2017). Y-chromosome and mtDNA variation confirms independent domestications and directional hybridization in South American camelids. *Anim Genet*. doi:10.1111/age.12570
- Marín, J. C., Rivera, R., Varas, V., Cortés, J., Agapito, A., Chero, A., ... & Orozco-terWengel, P. (2018). Genetic variation in coat colour genes MC1R and ASIP provides insights into domestication and management of south American camelids. *Frontiers in genetics*, 9, 487.
- Martinez F. Z. 1994. Caracteres de calidad y determinación de zonas corporales de muestreo mas representativas del vellón en llamas, tesis Ing. Agrónomo, UMSS Cochabamba, Bolivia. 102 p
- Maté, M., Bustamante, A., Giovambattista, G., Lamo, D. d., Thüngen, J., Zambelli, A., & Vidal-Rioja, L. (2005). Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. *Animal genetics*, 36(4), 316-321.

- Matsudaira, K., Hamada, Y., Bunlungsup, S., Ishida, T., San, A. M., & Malaivijitnond, S. (2018). Whole mitochondrial genomic and Y-chromosomal phylogenies of Burmese long-tailed macaque (*Macaca fascicularis aurea*) suggest ancient hybridization between *fascicularis* and *sinica* species groups. *Journal of Heredity*, *109*(4), 360-371.
- Matsumoto, Y., Takagi, T., Koda, R., Tanave, A., Yamashiro, A., & Tamate, H. B. (2019). Evaluation of introgressive hybridization among Cervidae in Japan's Kinki District via two novel genetic markers developed from public NGS data. *Ecology and evolution*, *9*(10), 5605-5616.
- Mauki, D. H., & Adeola, A. C. (2021). Genetic variation of Nigerian cattle inferred from maternal and paternal genetic markers. *PeerJ*, *9*.
- Melo, C., Manunza, A., Melo, M., Olivera, L., & Amills, M. (2011). Analysis of the mitochondrial diversity of alpacas in eight farming areas of the south of Peru. In *Fibre production in South American camelids and other fibre animals* (pp. 87-91): Springer.
- Mengoni G. L. (2008). Camelids in ancient Andean societies: A review of the zooarchaeological evidence. *Quaternary International*, *185*(1), 59-68. doi:10.1016/j.quaint.2007.05.022
- Moritz, C., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Ecol. Syst*, *18*, 269-292.
- Mueller, J. P., Rigalt, F., Cancino, A. K., & Lamas, H. (2010). Calidad de las fibras de camélidos sudamericanos en Argentina. In *International Symposium on Fibers from South American Camelids, Huancavelica, Perú*, *17*, 9-28.
- Nabholz, B., Glémin, S., & Galtier, N. (2008). Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals—the longevity hypothesis. *Molecular biology and evolution*, *25*(1), 120-130.
- Obreque, V., Mancilla, R., García-Huidobro, J., Cothran, E., & Hinrichsen, P. (1999). Thirteen new dinucleotide microsatellites in Alpaca. *Animal genetics*, *30*(5), 397-398.

- Pereira, F., Queirós, S., Gusmão, L., Nijman, I. J., Cuppen, E., Lenstra, J. A., ... & Amorim, A. (2009). Tracing the history of goat pastoralism: new clues from mitochondrial and Y chromosome DNA in North Africa. *Molecular Biology and Evolution*, 26(12), 2765-2773.
- Perez-Pardal, L., Royo, L. J., Beja-Pereira, A., Curik, I., Traore, A., Fernandez, I., . . . Goyache, F. (2010). Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos taurus*) cattle. *Anim Genet*, 41(3), 232-241. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01988.x
- Perelman, P. L., Pichler, R., Gagli, A., Larkin, D. M., Raudsepp, T., Alshanbari, F., ... & Periasamy, K. (2018). Construction of two whole genome radiation hybrid panels for dromedary (*Camelus dromedarius*): 5000 RAD and 15000 RAD. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Petit, E., Balloux, F., & Excoffier, L. (2002). Mammalian population genetics: why not Y?. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(1), 28-33.
- Pidancier, N., Jordan, S., Luikart, G., & Taberlet, P. (2006). Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Mol Phylogenet Evol*, 40(3), 739-749. doi:10.1016/j.ympev.2006.04.002
- 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. doi:10.1017/s1014233909990277
- Raggi, L. A. (2005). *Situación actual de los camélidos sudamericanos en Chile. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina*. TCP/RLA/2914. Santiago: FAO.
- Rey, A., Carmanchahi, P. D., Puig, S., & Guichón, M. L. (2009). Densidad, estructura social, actividad y manejo de guanacos silvestres (*Lama guanicoe*) en el sur del Neuquén, Argentina. *Mastozoología neotropical*, 16(2), 389-401.
- Rieseberg, L. H., Baird, S. J., & Gardner, K. A. (2000). Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Evolution*, 205-224.

- Rodríguez, B., Wheeler, J. C., Dodd, C. S., Bruford, M. W., & Rosadio, A. (2004). Determinación de parentesco en alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN microsatélite. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 15(2), 113-119.
- Romero, F. (2016). Caracterización de Camélidos Domésticos Bolivianos Mediante Análisis Cariotípico (Tesis de Grado). *Universidad Mayor de San Andrés*. La Paz-Bolivia.
- Saini, L. A. R., & Cabezón, J. E. C. (1990). Características del proceso digestivo en Camélidos Sudamericanos. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 12(1).
- Sarno, R. J., Villalba, L., Bonacic, C., Gonzalez, B., Zapata, B., Mac Donald, D. W., . . . Johnson, W. E. (2004). Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellite markers: implications for vicuña conservation and management *Conservation Genetics*, 5, 89-102.
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol*, 19(4), 198-207. doi:10.1016/j.tree.2004.01.003
- SERNAP - ANMI Apolobamba. 2006. Plan de manejo ANMI Apolobamba. Servicio Nacional de Áreas Protegidas, Área natural de Manejo integrado Nacional Apolobamba, La Paz-Bolivia.
- Shurtliff, Q. R. (2013). Mammalian hybrid zones: a review. *Mammal Review*, 43(1), 1-21.
- Skidmore, J., Billah, M., Binns, M., Short, R., & Allen, W. (1999). Hybridizing old and new world camelids: *Camelus dromedarius* X *Lama guanicoe*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266(1420), 649-656.
- Smith, C. L., Peter, A. T., & Pugh, D. G. (1994). Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology*, 41(3), 573-592.
- Stanley, H. F., Kadwell, M., & Wheeler, J. C. (1994). Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 256(1345), 1-6.

- Suárez, A. G. F., Reynoso, G. A. G., & Bravo, F. D. L. (2019). Bioinformatic identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes for fiber characteristics in alpacas (*Vicugna pacos*). *Revista peruana de biología*, *26*(1), 87-94.
- Sumar, J. B. (1996). Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*, *42*(1-4), 405-415.
- Tabata, R., Kawaguchi, F., Sasazaki, S., Yamamoto, Y., Bakhtin, M., Kazymbet, P., ... & Mannen, H. (2019). The Eurasian Steppe is an important goat propagation route: A phylogeographic analysis using mitochondrial DNA and Y-chromosome sequences of Kazakhstani goats. *Animal Science Journal*, *90*(3), 317-322.
- Taylor, S. A., & Larson, E. L. (2019). Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. *Nature ecology & evolution*, *3*(2), 170-177.
- Tichit, M., & Genin, D. (1997). Factors affecting herd structure in a mixed camelid–sheep pastoral system in the arid Puna of Bolivia. *Journal of arid environments*, *36*(1), 167-180.
- Tomka, S. A. (1992). Vicuñas and llamas: parallels in behavioral ecology and implications for the domestication of Andean camelids. *Human Ecology*, *20*(4), 407-433.
- Twyford, A., & Ennos, R. (2012). Next-generation hybridization and introgression. *Heredity*, *108*(3), 179.
- Valenzuela-Estrada, M., Rippes, F., & Nunez, H. (2012). Morphological Study of Testis of Hybrid Alpaca (*Lama pacos* L. 1758) and Llama (*Lama glama* L. 1758). *International Journal of Morphology*, *30*(3), 1187-1196.
- Varas, V., Vásquez, J. P., Rivera, R., Longo, A., Valdecantos, P. A., Wheeler, J. C., ... & Marín, J. C. (2020). Interbreeding among South American camelids threatens species integrity. *Journal of Arid Environments*, *181*, 104249.
- Vidal-Rioja, L., Zambelli, A., & Semorile, L. (1994). An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparisons. *Hereditas*, *121*, 283-290.

- Vilà, C., Walker, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Andersone, Z., Casulli, A., ... & Ellegren, H. (2003). Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity*, *90*(1), 17-24.
- Wallner, B., Piumi, F., Brem, G., Müller, M., & Achmann, R. (2004). Isolation of Y chromosome-specific microsatellites in the horse and cross-species amplification in the genus *Equus*. *Journal of Heredity*, *95*(2), 158-164.
- Wallner, B., Vogl, C., Shukla, P., Burgstaller, J. P., Druml, T., & Brem, G. (2013). Identification of genetic variation on the horse Y chromosome and the tracing of male founder lineages in modern breeds. *PloS one*, *8*(4), e60015.
- Wallner, B., Palmieri, N., Vogl, C., Rigler, D., Bozlak, E., Druml, T., ... & Thaller, G. (2017). Y chromosome uncovers the recent oriental origin of modern stallions. *Current Biology*, *27*(13), 2029-2035.
- Ward, T. J., Bielawski, J. P., Davis, S. K., Templeton, J. W., & Derr, J. N. (1999). Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap. *Animal Conservation*, *2*(1), 51-57.
- Waters, P. D., Wallis, M. C., & Graves, J. A. M. (2007, June). Mammalian sex—origin and evolution of the Y chromosome and SRY. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 18, No. 3, pp. 389-400). Academic Press.
- Westbury, M., Prost, S., Seelenfreund, A., Ramírez, J. M., Matisoo-Smith, E. A., & Knapp, M. (2016). First complete mitochondrial genome data from ancient South American camelids—the mystery of the chilihueques from Isla Mocha (Chile). *Scientific reports*, *6*, 38708.
- Wheeldon, T. J., Rutledge, L. Y., Patterson, B. R., White, B. N., & Wilson, P. J. (2013). Y-chromosome evidence supports asymmetric dog introgression into eastern coyotes. *Ecology and evolution*, *3*(9), 3005-3020.
- Wheeler, J. C. (1995). Evolution and situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, *54*(3), 271-295.

- Wheeler, J. C., Russel, A., & Redden, H. (1995). Llamas and alpacas: pre-conquest breeds and post-conquest hybrids. *Journal of Archaeological Science*, 22(6), 833-840.
- Wheeler, J. C., Chikhi, L., & Bruford, M. W. (2006). Genetic analysis of the origins of domestic South American camelids. *Archaeology and Animal Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms*, 329-341.
- Wheeler, J. C. (2012). South American camelids: past, present and future. *Journal of Camelid Science*, 5(1), 1-24.
- White, S. (2010). Alpacas y Llamas Como Herramientas de Conservación del Páramo. *Journal of Field Archaeology*, 17, 46-68.
- Woodward, S.R., King, M.J., Chiu, N.M., Kuchar, M.J., Griggs, C.W., 1994. Amplification ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR Methods and Applications*, vol. 13, pp. 244–247.
- Wu, D. D., Ding, X. D., Wang, S., Wójcik, J. M., Zhang, Y. I., Tokarska, M., ... & Zhang, Y. P. (2018). Pervasive introgression facilitated domestication and adaptation in the *Bos* species complex. *Nature ecology & evolution*, 2(7), 1139-1145.
- Yalta-Macedo, C. E., Veli, E. A., Díaz, G. R., & Vallejo-Trujillo, A. (2021). Paternal ancestry of Peruvian creole cattle inferred from Y-chromosome analysis. *Livestock Science*, 244, 104376.
- Yamanaka, H., Murata, K., Tabata, R., Kawaguchi, F., Sasazaki, S., Yamamoto, Y., ... & Mannen, H. (2019). Kazakhstani native cattle reveal highly divergent mt DNA from *Bos taurus* and *Bos indicus* lineages with an absence of *Bos indicus* Y chromosome. *Animal Science Journal*, 90(1), 29-34.
- Zapata, B. (1999). Differentiation of South american camelids by a karyotypic analysis. *Universidad Católica de Chile. Fac. de Agronomía*.

ANEXOS

Anexo 1. Descripción de resultados de amplificación de marcadores moleculares del cromosoma "Y".

Se detalla los resultados obtenidos en muestras de camélidos con las diferentes variaciones en las condiciones de PCR.

Marcador molecular	Especie de procedencia	Resultado en camélidos
BM-861, BYM-1, UMNO-103, UTY-19, ZFY-10, INRA-189	<i>Bos taurus</i>	No generaron productos de amplificación.
UTMO-307	<i>Bos taurus</i>	Generó fragmentos de amplificación en machos y hembras.
Y-1	<i>Bos taurus</i>	No se logró estandarización con muestras de <i>Bos taurus</i> . Sin amplificación en camélidos.
ZF-2 y CAPY-1	<i>Capras hircus</i>	Productos de amplificación ambiguos, con varias bandas inespecíficas en hembras y machos.
Sry K1-Sry K2, Sry K3-Sry K4 y ZF1	Camélidos sudamericanos	Amplificación en algunos machos.
DBY12JC		Amplificación en todos los machos y en ninguna hembra. Sin bandas inespecíficas.
Eca.YH12, Eca.YA16, Eca.YP9, Eca.YM2, Eca.YE1 y Eca.YJ10	Equinos	No lograron amplificar el tamaño de fragmento esperado, también presentes en hembras.
TR4520	<i>Camelus dromedarius</i>	Varios fragmentos de diferentes tamaños al esperado, en hembras y machos.
TR5720	<i>Camelus dromedarius</i>	Fragmentos de menor tamaño al esperado, en hembras y machos.

ANEXO 2. Árbol filogenético basado haplotipos del intrón DBY.

Árbol Neighbor-Joining construido en base a los 3 haplotipos usando 202 secuencias (de individuos macho) del intrón DBY del cromosoma "Y" (371 pb).

