

## TESIS DE MÁSTER

Utilidad de marcadores SNP en la mejora  
genética de poblaciones alto-andinas de  
alpacas

Rufino Paucar Chanca

Curso 2010-11

Universidad Pública de Navarra  
Máster en Agrobiotecnología

Directora: Dra. Ana María Arana Navarro  
Codirector: Dr. Leopoldo Alfonso Ruiz

Departamento de Producción Agraria  
Nekazaritzako Ekoizpen Saia

Campus de Arrosadía / Arrosadiko Campusa  
31006 Pamplona - Iruña (Navarra - Nafarroa)  
Tel.: 948 16 9100 - Fax: 948 16 9732  
secretaria.produccion.agraria@unavarra.es


**upna**  
Universidad  
Pública de Navarra  
Nafarroako  
Unibertsitate Publikoa

**Ana ARANA NAVARRO**, Catedrática del Área de Producción Animal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, y **Leopoldo ALFONSO RUIZ**, Profesor Titular del Área de Producción Animal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra

### INFORMAN

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master "Utilidad de marcadores SNP en la mejora genética de poblaciones alto-andinas de alpacas" elaborada por D. Rufino Paucar Chanca ha sido realizada bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a veinte de junio de 2011.



Dra. ANA ARANA NAVARRO



Dr. LEOPOLDO ALFONSO RUIZ

## **INDICE**

RESUMEN	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	5
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Escenarios de apareamiento y control de parentesco considerados	17
Características de los marcadores moleculares considerados	19
Asignación y simulación de paternidad	20
Análisis estadístico	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEJOS	35

## **I. RESUMEN**

La correcta asignación de las relaciones de parentesco de los animales es una parte fundamental de cualquier programa de mejora genética ya que permite mejorar la precisión de la evaluación genética y por tanto el progreso genético. En poblaciones donde predominan los sistemas extensivos la identificación de parentesco vía control genealógico de los apareamientos es difícil de implementar. Es el caso de las poblaciones de alpacas en sistemas de crianza alto-andinos. En estos casos la utilización de marcadores moleculares de ADN para la asignación de parentesco puede ser una útil herramienta. Los microsatélites han venido siendo los marcadores habitualmente recomendados y utilizados hasta el momento, pero en la actualidad se está valorando la posibilidad de utilizar polimorfismos de un único nucleótido (SNP). Por ello el objetivo del presente trabajo fue analizar las ventajas e inconvenientes de los marcadores SNP en la asignación de parentesco en poblaciones de alpacas. Para ello se realizaron simulaciones informáticas que permitieron determinar el poder de asignación de paternidad de los SNP (40, 60, 80 y 100) comparado con el de los microsatélites (10, 15, 20 y 25) en distintos escenarios, los cuales están basados en los sistemas de apareamiento (controlado, alternado y múltiple) de las alpacas. Los resultados del presente estudio indican que una asignación de paternidad casi perfecta se consigue utilizando paneles de 100 SNP y 25 microsatélites en los tres escenarios planteados. Por otro lado un panel de 40 SNP ha demostrado ser una herramienta comparable a un panel de 10 microsatélites (bajo las condiciones analizadas aproximadamente 3.9 SNP equivalieron a 1 microsatélite). De acuerdo a los resultados se concluye que los marcadores SNP serían una herramienta utilizable para paliar los problemas de asignación de parentesco que tienen los programas de mejora genética de alpacas.

## **SUMMARY**

The correct assignment of kinship of animals is a fundamental part of any breeding program because it improves the accuracy of genetic evaluation and hence genetic progress. In populations where extensive systems are usual the parental identification by genealogical control of mating is difficult to implement. This is the case of breeding systems of high-Andean alpaca populations. In these situations the use of DNA molecular markers for assigning parentage may be a useful tool. The microsatellites markers have been routinely being recommended and used so far, but now the possibility of using single nucleotide polymorphisms (SNPs) is being considered. Therefore the objective of this study was to analyse the advantages and disadvantages of SNP markers in the assignment of kinship in populations of alpacas. With this objective computer simulations were performed to estimate the power of SNP (40, 60, 80 and 100) in parentage assignment compared with microsatellites (10, 15, 20 and 25). Different scenarios were considered based on alpaca mating systems (controlled, alternate and multiple). The results of this study indicate that a near-perfect assignment of paternity is achieved using panels of 25 microsatellite and 100 SNP in the three scenarios analysed. In addition, a panel of 40 SNP has proven to be a tool comparable to a panel of 10 microsatellites (under the conditions analysed 3.9 SNP were approximately equivalent to 1 microsatellite). According to the results it is concluded that SNP markers would be a useful tool to reduce the problems of parental assignment in alpaca breeding programs.

## **II. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Los camélidos sudamericanos**

Los camélidos sudamericanos (CSA), constituyen un recurso de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y algunos países de América del sur. Se estima que existen más de 7.5 millones de CSA, los cuales son agrupados en cuatro especies, de ellas dos son silvestres, la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*); y dos son domésticas: la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*). Las especies domésticas, proveen productos de alta calidad, como son la fibra y la carne y, a menudo, constituyen el único medio de subsistencia de un vasto sector de la población alto andina. Las especies silvestres, vicuña y guanaco, que se consideran antecesoras de las especies domésticas, ofrecen igualmente un importante potencial de aprovechamiento sostenible (Sarno *et al.*, 1998).

En la actualidad, los CSA constituyen el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales de las zonas alto andinas, donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies de animales domésticos. Los CSA convierten, con inusual eficiencia, los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad como son la fibra y la carne, además de los subproductos como las pieles y cueros que tienen múltiples usos industriales y artesanales (Bustinza, 2001).

El Perú tiene el privilegio de ocupar el primer lugar en el mundo en la posesión de alpacas y vicuñas y el segundo lugar en llamas. El aprovechamiento racional de esta ventaja comparativa es el reto que el Perú encara como el medio más efectivo de lucha contra la pobreza y la inseguridad alimentaria que afecta a las comunidades campesinas que viven de la crianza de estas especies.

### **2.2 La alpaca**

La alpaca es el más importante miembro de los camélidos sudamericanos en cuanto se refiere a la producción de fibra (Wuliji *et al.*, 2000; León-Velarde y Guerrero, 2001). En función a ella habría sido domesticada hace más de 6000 años (Wheeler, 1995) y seleccionada para producción de fibra desde hace más de 3000 años (McGregor, 2006). La industria textil refiere a la fibra de alpaca como una fibra especial y las prendas que se confeccionan con ellas, están clasificadas como artículos de lujo (McGregor, 2006). Su población mundial se estima en unos 3.7 millones (FAO, 2005) y el 80% de ellas (aprox. 3 millones) se encuentran en el Perú (CEPES, 2005).

La crianza de alpacas se desarrolla en la región andina de la sierra del Perú, particularmente sur y central, a altitudes que van de los 3 800 hasta más de 5 000 metros sobre el nivel del mar. Alrededor del 90 % de las alpacas está en manos de pequeños productores que paradójicamente constituyen uno de los segmentos menos favorecidos de la población peruana, la misma que vive en estado de extrema pobreza (Montes *et al.*, 2008). Pese a su importancia socio-económica la crianza de alpacas no ha sido objeto de innovaciones importantes que se traduzcan en una mayor producción y productividad, esto debido a lo poco sofisticado de las tecnologías de crianza y manejo (FAO, 2005).

### **2.3 Mejoramiento genético**

En Perú existen una serie de iniciativas de mejora genética en alpacas que abarcan modestos planes a nivel predial hasta programas de gran escala a nivel nacional (Quispe *et al.*, 2008).

No obstante estos programas de mejora genética actualmente están teniendo pocos avances y reducido progreso genético, debido a que en la mayoría de los sistemas de crianza de alpacas priman los pequeños ganaderos, en los que se observan deficiencias en la identificación de los animales, inadecuados registros de producción y genealogía, e inadecuada (o inexistente) infraestructura. En este tipo de crianzas la identificación de parentesco vía control genealógico de los apareamientos es difícil de implementar. En estos casos la utilización de marcadores moleculares para la asignación de parentesco puede ser una útil herramienta (Blancou, 2001; Cunningham y Meghen, 2001).

En la región de Huancavelica (Perú) la Universidad Nacional de Huancavelica hace 5 años viene ejecutando un plan de mejora genética en alpacas a través del Programa de Mejora Genética de Camélidos Sudamericanos (PROCASUD) el cual tiene como objetivo mejorar la producción de fibra de las alpacas tanto en cantidad (peso de vellón) como en calidad (diámetro de fibra). El mencionado programa en la actualidad viene recogiendo gran cantidad de información (genealógica y productiva) en las unidades productivas (UP) que tiene (25 UP distribuidas en 7 comunidades), para su tratamiento estadístico con la finalidad de identificar animales de alto valor genético. Paucar *et al.* (2009) diseñaron un programa informático (Alpatec V. 01) para verificar la consistencia de dicha información, llegando a la conclusión que existen deficiencias en la información de parentesco, lo cual atribuyen al sistema de crianza extensivo que tienen los rebaños que integran el programa. En este tipo de crianza predominan las practicas reproductivas inadecuadas que limitan a menudo el registro

adecuado de parentesco lo cual repercute en la precisión de la estimación de los Valores de Cría y por ende en el progreso genético.

## **2.4 Evaluación genética**

La evaluación genética es un componente importante de los programas de mejora genética y gran parte del éxito de un programa de mejora genética depende de este componente.

Se entiende por evaluación genética al proceso que tiene como finalidad la obtención de los valores de cría estimado (EVC) o predicción del valor genético aditivo de los animales de una determinada población, lo cual se realiza aplicando las bases de la genética cuantitativa, teniendo como insumos registros productivos y de genealogía (Bourdon y Bourbon, 1997).

En las últimas décadas, el uso de metodologías objetivas de estimación de valores de cría basadas en las evaluaciones genéticas bajo la metodología Blup-modelo animal se han vuelto populares; sin embargo, su empleo requiere la organización de bases de datos con una estructura de información completa y confiable que incluya, tanto datos productivos como de parentesco (Cardoso y Tempelman, 2004; Mrode y Thompson, 2005), asegurando la predicción de valores genéticos precisos. Los errores en los registros de parentesco reducen la precisión de las predicciones de los valores genéticos, y esto se da principalmente en los sistemas de crianza extensivos (Tosh y Wilton, 1994; Sherman *et al.*, 2004). Por lo cual es necesario que los animales de este tipo de crianza, deban someterse a pruebas de verificación de paternidad para obtener predicciones confiables de los valores genéticos (Tosh y Wilton, 1994).

El plan de mejoramiento genético de alpacas conducido por el PROCASUD, para el control de parentesco utiliza un sistema de apareamiento denominado empadre controlado, el cual consiste en emparejar una alpaca hembra con un macho en instalaciones adecuadas, en promedio un macho puede aparear 20 hembras durante la campaña de apareamiento (enero a marzo). El inconveniente de este sistema es que se consigue una baja natalidad (40%), requiere infraestructura costosa, abundante mano de obra y genera una cantidad importante de paternidades inciertas cuando no se ejecuta bien, lo cual es común debido a la falta de instalaciones y mano de obra adecuada. Las paternidades inciertas hacen que disminuya la cantidad de conexiones directas entre individuos y se incremente la varianza del error de predicción reduciendo por lo tanto la precisión de los valores genéticos lo cual repercute en el progreso genético.



Por otro lado debido a lo costoso que es implementar el sistema de apareamiento controlado muchos rebaños no integran los programas de mejoramiento genético, reduciendo la variabilidad genética lo cual es importante para conseguir buenos progresos genéticos. Muchos criadores se han retirado de los programas de mejora debido a la baja natalidad que se consigue. Una herramienta reproductiva que ayuda solucionar los problemas mencionados en otras especies domésticas es la inseminación artificial la cual no es fácilmente aplicable en alpacas debido a sus características fisiológicas (la hembra tiene una ovulación inducida y el tiempo de eyaculación de los machos es en promedio 30 minutos, lo que impide realizar una colección de semen de calidad). Por ello los marcadores genéticos combinando con sistemas de apareamiento serían una posible solución a este problema.

## **2.5 Marcadores moleculares**

Un marcador molecular es un segmento de ADN, no necesariamente con función conocida, con una ubicación física conocida en un cromosoma y cuya herencia se puede seguir. Para que una porción de ADN pueda informar de la variabilidad existente entre individuos debe mostrar una variación experimentalmente detectable entre ellos, y un modo de herencia predecible. Esta variación puede ser considerada a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos, hasta la variación de un solo nucleótido en la secuencia de ADN (Heyen *et al.*, 1997; Ferreira y Grattapaglia, 1998; Pakstis *et al.*, 2007).

Los marcadores genéticos se están utilizando en diversos campos de la producción animal. Entre ellos destacan: la identificación de parentesco, caracterización de la diversidad genética, la identificación de genes responsables de caracteres de interés, el desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades, etc, y de igual forma los marcadores moleculares constituyen hoy una herramienta moderna y poderosa para el viejo arte de la selección (Cornide *et al.*, 2002; Heaton *et al.*, 2002).

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad y ser considerado como ideal (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

- Que sean muy polimórficos, es decir que presenten distintas formas genéticas (alelos) en una población que nos permitan diferenciar los individuos.
- Que estén distribuidos por todos los cromosomas de una especie para obtener información representativa de la posible variación existente.

- Que tengan un bajo coste tanto en la obtención como en la aplicación para que no se encarezca excesivamente su análisis. Su detección en numerosos individuos debe ser fácil, rápida y barata.
- Que sean públicos y no estén sometidos a ningún tipo de patente.
- Que su interpretación sea sencilla y objetiva.
- Que requieran poca cantidad y calidad de muestra de ADN.
- Que sean reproducibles en cualquier experimento de laboratorio, es decir, utilizar marcadores contrastados internacionalmente mediante el intercambio de información de animales analizados en diferentes laboratorios.
- Que sean automatizables para aumentar el rendimiento y abaratar los costes.
- Que sean estables para que las mutaciones no puedan influir en los resultados.
- Que tengan preferiblemente herencia codominante. Según el tipo de aplicación del marcador, la tecnología elegida debe ser capaz de detectar las diferentes formas del marcador, es decir, distinguir entre un homocigoto y un heterocigoto.
- Que sean neutros. El alelo presente en el *locus* del marcador es independiente de la presión de selección que se ejerce sobre el individuo y no tiene ningún efecto sobre ella. Esta afirmación suele ser una suposición porque, generalmente, no hay datos disponibles que confirmen o nieguen esta propiedad.

## 2.6 SNP

### Concepto

Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma (Brookes, 1999; Vignal *et al.*, 2002). Se encuentran distribuidos por todo el genoma y pueden localizarse tanto en regiones codificantes como no codificantes (Sachidanandam *et al.*, 2001).

En este tipo de polimorfismos puede estar presente cualquiera de los cuatro nucleótidos, por lo tanto se debe suponer que cada SNP tendría cuatro alelos. Teóricamente esto es posible, pero en la práctica la mayoría de los SNP tienen solamente dos variantes, la secuencia original

y la versión mutada. Esto se debe a la vía en que estos aparecen y se distribuyen en una población. Un SNP se origina cuando ocurre una mutación puntual en el genoma, convirtiendo un nucleótido en otro. Si la mutación ocurre en los gametos de un individuo, puede heredarse por uno o más descendientes y después de muchas generaciones, el SNP puede establecerse en la población. Para que se produzca un tercer alelo, una nueva mutación debe ocurrir en la misma posición en el genoma de otro individuo, y este individuo y su descendencia deben reproducirse de forma tal que el nuevo alelo quede establecido. Esto no es imposible, pero es poco probable, por lo tanto la mayoría de los SNP son bialelicos (Brookes, 1999).

### **Características**

Los SNP presentan múltiples características, entre las más importantes podemos citar:

- a) Son muy abundantes en el genoma de los mamíferos y se calcula la existencia de un SNP por cada 1000 pares de bases en humanos (Wang *et al.*, 1998) o 1 por cada 500 pares de bases en ratón (Lindblad-Toh *et al.*, 2000) y bovino (Heaton *et al.*, 2001). Si tenemos en cuenta que el tamaño promedio del genoma de los mamíferos es de 3.000 millones de pares de bases se puede prever que las secuencias de ADN de 2 individuos pueden llegar a diferir en unos 3 millones de posiciones, lo que implica un gran potencial para identificación de parentesco.
- b) Los SNP son marcadores muy atractivos desde el punto de vista de su empleo en la identificación de parentesco ya que son genéticamente estables en mamíferos (Markovtsova *et al.*, 2000; Nielsen, 2000; Thomson *et al.*, 2000).
- c) Poseen baja tasa de mutación del orden de  $10^{-8}$  (Nachman y Crowell, 2000; Kondrashov, 2003),
- d) Tienen bajas tasas de error en el genotipado (Kennedy *et al.*, 2003),
- e) La interpretación de los resultados es menos compleja que el caso de otros marcadores (Krawczak, 1999), permiten la representación de los genotipos mediante una “firma digital de ADN” (Fries y Durstewitz, 2001)
- f) El procesado de la muestra y el análisis de los datos es susceptible de una alta automatización (Kruglyak, 1997; Wang *et al.*, 1998; Lindblad-Toh *et al.*, 2000).

- g) Los SNP son marcadores bialélicos, por tanto para conseguir un alto poder de discriminación se requiere el análisis de un mayor número de marcadores.

### **Métodos de detección y análisis**

El método más directo para detectarlos es la secuenciación de segmentos de ADN previamente amplificados por PCR. Una vez localizado el SNP se pueden utilizar diversas técnicas para su análisis, como son: extensión del primer (Pastinen *et al.*, 1996), pirosecuenciación (Ronaghi *et al.*, 1998), espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight) (Andersen y Mann, 2000), microarrays o microchips de DNA (Sчена *et al.*, 1998) y discriminación alélica mediante PCR a tiempo real usando sondas TaqMan (Livak *et al.*, 1995) o utilizando cebadores modificados en 3' (Liu *et al.*, 1997) que también se puede realizar en PCR estándar.

### **Utilización**

Debido a las ventajas que ofrecen los SNP y a la diversidad de métodos disponibles para su estudio se están utilizando frecuentemente en diversas especies en estudios de identificación y paternidad (Heaton *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Pakstis *et al.*, 2007; Van Eenennaam *et al.*, 2007), caracterización de poblaciones (Inagaki *et al.*, 2002), estudios de biodiversidad (Ben-Ari *et al.*, 2005; Twito *et al.*, 2007), búsqueda de asociación con caracteres cuantitativos (Page *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2005), estudios de trazabilidad (Sauer *et al.*, 2002; Capoferri *et al.*, 2005; Goffaux *et al.*, 2005) y elaboración de mapas de ligamiento (Snelling *et al.*, 2005), entre otros.

## **2.7 Microsatélites**

### **Concepto**

Los microsatélites, también llamados “Simple secuencias repetidas” (SSRs), “Polimorfismos de longitud de simples secuencias (SSLPs), “Repeticiones cortas en serie” (STRs), “Secuencias simples repetidas” (SSMs), “Secuencias blanco microsatélite” (STMs), son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb) los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001).

### **Características**

- a) Son muy frecuentes y están repartidos en todo el genoma eucariota (Becerra, 2000; Aranguren-Méndez y Jordana, 2001).

- b) Poseen una tasa de mutación que oscila entre  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  (Bowcock *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995; Brinkmann *et al.*, 1998).
- c) Presentan herencia codominante y son fáciles de detectar metodológicamente (Sirchia *et al.*, 1996; Vega-Pla *et al.*, 1998; Aranguren-Méndez y Jordana, 2001)
- d) Constituyen la clase de marcadores moleculares más polimórficos que se conocen (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Cornide *et al.*, 2002). Aportan un alto grado de información debido al elevado número de alelos por *locus* que presentan (Baumung *et al.*, 2004). Por todo esto hasta el momento aparecen como la herramienta más poderosa de discriminación genética entre animales (Blott *et al.*, 1999).
- e) Requieren de mínimas cantidades de material biológico para su análisis, permitiendo incluso el análisis de muestras degradadas (Vega-Pla *et al.*, 1998; Becerra, 2000).

## Utilidad

Actualmente los microsatélites se utilizan en análisis forenses (Holt *et al.*, 2000), pruebas de paternidad (Lang *et al.*, 1996; Mommens *et al.*, 1998; Penedo *et al.*, 1998; Schnabel *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2004; Agapito *et al.*, 2008; Spencer *et al.*, 2010), estudios de biodiversidad (Peelman *et al.*, 1998; Martín-Burriel *et al.*, 1999; Martín-Burriel *et al.*, 2007), análisis filogenéticos (Ritz y Glowatzki Mullis, 2000; Tapio *et al.*, 2006), construcción de mapas de ligamiento o como marcadores para la detección de QTLs de importancia económica en producción animal (Arranz *et al.*, 1998; Imai *et al.*, 2007). Por las ventajas que poseen estos marcadores, se ha trabajado ampliamente en la búsqueda y empleo en diferentes especies animales, tales como ovino (Dietz *et al.*, 1993; Buchanan y Thue, 1998); caprino (Kemp *et al.*, 1995), porcino (Moran, 1993) y bovino (Giovambattista *et al.*, 2000; Uffo, 2000; Lirón *et al.*, 2006).

## 2.8 Determinación de parentesco a través de marcadores moleculares

La determinación de parentesco a través de marcadores moleculares se basa en la exclusión genética (probabilidad de exclusión). El proceso de exclusión (basada en las leyes de herencia mendeliana) usa incompatibilidades genéticas entre los supuestos padres y las crías, para rechazar una particular hipótesis de asignación de paternidad (Jones y Ardren, 2003). Por ejemplo, en una prueba de paternidad, se tiene una madre y una cría que tienen un genotipo diploide AA y AB respectivamente, para un simple *locus*, y dos machos uno con genotipo AC y el otro con genotipo BC, el primer macho podrá ser excluido en cambio el

segundo no. La probabilidad de exclusión se define como la habilidad de un marcador o de un set de marcadores de excluir una relación de parentesco dada, y es determinada a partir de los genotipos, las frecuencias alélicas en los diferentes *loci* y el número de *loci* independientes testados (Jamieson, 1997).

La eficiencia de un sistema de marcadores genéticos para uso en pruebas de paternidad es juzgado usualmente por la probabilidad de exclusión (Lee *et al.*, 2000).

Habitualmente se ha venido trabajando con marcadores microsatélites para la determinación de parentesco, también en alpacas, pero en los últimos años los marcadores SNP se vienen utilizando para este fin de manera creciente.

## 2.9 Determinación de parentesco a través de marcadores moleculares en camélidos

Entre los estudios que han determinado parentesco a través de marcadores moleculares (microsatélites) en camélidos, tenemos al realizado por Lang *et al.* (1996), en el cual estudiaron a 20 llamas y 20 alpacas, obteniendo información para 15 *loci*. Estos mostraron una probabilidad de exclusión de paternidad de 99.996 %. Los *loci* encontrados fueron los siguientes:

<i>Loci</i>	No de alelos	PIC*
YWLL02	6	0.768
YWLL07	2	0.269
YWLL08	13	0.818
YWLL09	9	0.797
YWLL19	6	0.590
YWLL29	6	0.668
YWLL30	3	0.353
YWLL36	7	0.799
YWLL38	3	0.406
YWLL40	6	0.668
YWLL43	10	0.743
YWLL44	11	0.845
YWLL46	5	0.717
YWLL58	6	0.600
YWLL59	10	0.769

\* **PIC:** Contenido de información del polimorfismo.

Así mismo Rodríguez *et al.* (2004) utilizando 10 marcadores reportados por Penedo *et al.* (1998) y Lang *et al.* (1996) evaluaron el parentesco de 47 alpacas, los cuales mostraron una probabilidad de exclusión de paternidad de 99.99 %. Los marcadores que utilizaron fueron los siguientes:

<i>Loci</i>	No de alelos	PIC*
LCA19	14	0.740
YWLL29	6	0.668
YWLL40	6	0.668
YWLL46	5	0.717
LCA23	11	0.800
LCA22	4	0.620
YWLL36	7	0.799
YWLL43	10	0.743
LCA5	11	0.750
YWLL08	13	0.818

\* **PIC:** Contenido de información del polimorfismo.

De igual forma Agapito et al. (2008) evaluaron un sistema múltiple de microsatélites para la determinación de parentesco en una población de 329 alpacas, encontrando una probabilidad de exclusión total de 99.9456 %.

<i>Loci</i>	No de alelos	PIC*
LCA19	14	0.712
LCA37	18	0.853
YWLL40	6	0.636
YWLL29	8	0.681
YWLL36	17	0.872
LCA5	12	0.755
LCA66	16	0.842
YWLL08	28	0.929
LCA08	10	0.814
YWLL44	16	0.856

\* **PIC:** Contenido de información del polimorfismo.

También Spencer et al. (2010) analizaron un sistema de pruebas de paternidad en camellos. Utilizando 17 microsatélites encontrando una probabilidad de exclusión 99.999 %.

Por otro lado pruebas de paternidad utilizando marcadores SNP en camélidos no se han reportado hasta el momento.

## 2.10 Objetivos

### Objetivo general

Analizar las ventajas e inconvenientes de la utilización de los marcadores SNP para la asignación de parentesco en poblaciones de alpacas.

## **Objetivos específicos**

- Determinar el número de SNP necesarios para la correcta asignación de padres.
- Investigar la utilidad de combinar los sistemas de apareamiento con los marcadores moleculares para asignar paternidad.
- Determinar el número de SNP que se requiere para dar el poder de exclusión comparable a los microsatélites utilizados actualmente en alpacas.
- Revisar las ventajas e inconvenientes de los marcadores SNP en cuanto a coste de la aplicación de los marcadores SNP en la asignación de paternidad en poblaciones de alpacas.

### **2.11 Justificación**

La ejecución del presente trabajo es de importancia debido a que los resultados que se logren contribuirán al conocimiento de las ventajas e inconvenientes de la utilización de los marcadores SNP para la asignación de parentesco en poblaciones de alpacas. Esta información constituirá un punto de partida para ver la aplicabilidad de los marcadores moleculares SNP en la asignación de parentesco en poblaciones de alpacas.

Como ya se ha comentado, el control genealógico de los individuos es básico e incide de distintas formas y a distintos niveles en las producciones animales, por tanto es necesario disponer de alguna herramienta o sistema, fundamentada en la identificación de los individuos, que nos permita determinar la paternidad a posteriori.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se desarrolló tomando en consideración los datos del Programa de Mejora Genética de Camélidos Sudamericanos (PROCASUD) de la Universidad Nacional de Huancavelica (Perú). Las unidades productivas del programa se encuentran en zonas cuyas altitudes oscilan entre 4.000 y 4.800 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas que varían desde -5 °C a 0 °C por las noches y durante el día entre 14 a 18 °C; y con una precipitación pluvial que alcanza los 750 mm/año.

#### **3.1 Escenarios de apareamiento y control de parentesco considerados**

Los escenarios (poblaciones de alpacas) considerados en el presente estudio para realizar las simulaciones de asignación de paternidad con marcadores moleculares (SNP y microsatélites), se determinaron teniendo como referencia los sistemas de apareamiento utilizados en la crianza de alpacas (Tabla 1). A continuación se detalla cada uno de ellos.

##### **Escenario 1**

Para este escenario se consideró una estructura de rebaño de 100 crías, 100 madres y 5 posibles padres.

Este escenario está basado en el sistema de apareamiento controlado el cual consiste en emparejar una alpaca hembra con un macho en instalaciones adecuadas. En promedio un macho puede aparear 20 hembras durante la campaña de apareamiento (enero a marzo). Este tipo de apareamiento es utilizado en los rebaños que integran los programas de mejora genética ya que permite llevar el control de parentesco, el cual es importante en la predicción de los valores genéticos. El inconveniente de este sistema es que se consigue una baja natalidad (40%), requiere infraestructura costosa y abundante mano de obra. Por otro lado los criadores para aumentar la natalidad recurren a prácticas no recomendadas como juntar las alpacas machos y hembras al finalizar la campaña de apareamiento, lo cual genera una cantidad importante de paternidades inciertas, estas acciones de los criadores no se puede controlar debido a lo alejado que están las unidades productivas.

##### **Escenario 2**

En este escenario se consideró una estructura de rebaño de 100 crías, 100 madres y 10 posibles padres.

Este escenario se planteó teniendo como referencia el apareamiento alternado o rotativo; consiste en usar un total de 10% de machos en relación al número de hembras en edad reproductiva, el 50% de los cuales inicia el apareamiento por un lapso de 7 días; a su término, son reemplazados por el 50% restante durante un lapso idéntico. Se continúa alternando a lo largo de 8 semanas, hasta que termina el periodo de apareamiento. Este sistema de apareamiento es moderadamente utilizado a pesar de que se obtiene una tasa de natalidad del 90 % (Novoa *et al.*, 1970; Quispe, 1996) y su implementación no es muy costosa. Los programas de mejoramiento genético no utilizan este tipo de empadre debido a que no permite llevar el control de parentesco.

### Escenario 3

Para este escenario se consideró una estructura de rebaño de 100 crías, 100 madres y 15 posibles padres.

Este escenario, ha sido planteado teniendo en cuenta las características del apareamiento múltiple conocido también como empadre libre, que consiste en formar grupos de hembras compuestas por 100, 200, 300 o máximo 500 animales, y luego aparearlas durante todo el período de apareamiento que normalmente es entre enero a marzo. En ésta modalidad se utiliza el 15 % de machos y no es posible identificar a los progenitores y sus crías, por lo cual rebaños con este sistema de apareamiento no son considerados en los programas de mejora genética. No obstante, es el más utilizado ya que no demanda personal, ni infraestructura y se obtiene una natalidad del 80 % (Huanca, 1992; Quispe, 1996).

**Tabla 1:** Escenarios considerados en base al tipo de apareamiento.

Escenarios	Nº de machos	Nº de hembras
<u>Escenario 1</u> Basado en el apareamiento controlado.	5	100
<u>Escenario 2</u> Basado en el apareamiento alternado.	10	100
<u>Escenario 3</u> Basado en el apareamiento múltiple.	15	100

### **3.2 Características de los marcadores moleculares considerados**

#### **SNP**

Como no hay estudios previos referente a pruebas de paternidad utilizando marcadores SNP en alpacas, para realizar las simulaciones se consideraron paneles de 40, 60, 80 y 100 SNP con MAF (menor frecuencia alélica) de 0.35 los cuales fueron utilizados y recomendados en otras especies (Fisher *et al.*, 2009; Duijvesteijn *et al.*, 2010; Weller *et al.*, 2010). Las frecuencias de los SNP se simularon extrayendo valores de la distribución uniforme rechazando aquellos de  $MAF < 0.35$  (se utilizó para ello la función ALEATORIO de Excel; ver Anejos – Tabla 5).

#### **Microsatélites**

Para realizar la simulación de paternidad se utilizó un panel de 10 microsatélites reportados por Lang *et al.* (1996) y Penedo *et al.* (1998) (ver Anejo – Tabla 6), con los cuales Rodríguez *et al.* (2004) reportaron una probabilidad de exclusión de paternidad total de 99.99 %. De igual forma se utilizaron paneles de 15, 20 y 25 microsatélites, para los cuales se duplicó al azar las frecuencias alélicas de los 10 microsatélites mencionados, en vista que no está disponible esa información para un número tan grande de microsatélites. Cabe destacar, que tampoco existe un panel estándar de microsatélites para determinar parentesco en alpacas, establecidas por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) como en otras especies animales.

### **3.3 Asignación y simulación de paternidad**

Las simulaciones de las poblaciones de alpacas y el poder de asignación de paternidad de los marcadores moleculares (SNP y microsatélites) se realizaron mediante un programa expresamente adaptado para este estudio, el cual fue desarrollado en colaboración con el Dr. Leopoldo Alfonso del área de producción animal de la Universidad Pública de Navarra.

Este programa informático permite simular los genotipos de padres y madres. Luego realiza los apareamientos, asignando un determinado número de hembras a cada macho, generando una cría única para cada uno de ellos, utilizando las leyes de herencia mendeliana. Posteriormente asigna los padres posibles de acuerdo a la información molecular y comprueba si la asignación es correcta de acuerdo a la genealogía simulada. El proceso se repite un determinado número de iteraciones y se calcula el porcentaje medio de hijos cuyo padre se asigna incorrectamente.

Concretando un poco más el programa realiza los siguientes cálculos:

1. Simula una población base determinada por M machos, H hembras para un número X de *loci* independientes cuyas características se le indican como entrada. Para cada *locus* de los animales base asigna un alelo a cada uno de sus cromosomas a partir de una distribución uniforme, el número de alelos y los valores de sus frecuencias.
2. Asume un determinado reparto de hembras por macho y aparea cada macho con el número de hembras indicado, produciendo un único hijo por apareamiento. Escoge, asumiendo igual probabilidad, uno de los alelos del padre y uno de los alelos de la madre.
3. Calcula los errores de asignación de paternidad asumiendo que no se conoce el genotipo de la madre. Para cada hijo comprueba si cada uno de los machos de la población base puede ser o no el padre, mirando si algún alelo del hijo coincide con alguno del padre. Si hay coincidencia compara el posible padre con el padre de verdad y si no se trata del mismo, se contabiliza como asignación incorrecta.
4. El proceso se repite N iteraciones y se calculan los siguientes valores:
  - Heterocigosidad y PIC teóricos, para cada *locus* y para la media de todos los *loci*.

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

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Siendo  $p_i$  y  $p_j$  las frecuencias de los alelos  $i$  y  $j$ , respectivamente, y  $n$  el número total de alelos (Arana *et al.*, 2002).

- Porcentaje de iteraciones en las que se produce alguna asignación de parentesco incorrecta.
- Porcentaje medio de hijos a los que no se les asigna correctamente el padre.

En el presente trabajo, cada escenario se simuló para los 40, 60, 80 y 100 SNP y los 10, 15, 20 y 25 microsatélites previamente indicados asumiendo 100 iteraciones. El número de iteraciones se puede equiparar al número de poblaciones de alpacas que podrían entrar en un

sistema de asignación de parentesco por marcadores de ADN, resultando una población de 10.000 hembras y 500, 1000 y 1500 machos reproductores. El proceso se repitió 20 veces para cada tipo y número de marcadores utilizados de igual forma para cada escenario, lo que permitió calcular no solo el porcentaje medio de hijos a los que no se les asigna correctamente el padre, sino también su variabilidad. Por otro lado en todos los escenarios se asumió que todos los machos tenían la misma probabilidad de aparearse, es decir se asignó el mismo número de hembras a cada macho.

### **3.4 Análisis estadístico**

Para determinar el número de SNP que se requiere para dar el poder de exclusión comparable a los microsatélites se realizó una regresión lineal simple. El análisis de datos se realizó con ayuda del paquete estadístico R.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se observa el porcentaje de las iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos y de hijos sin padre discriminado atribuidos a los paneles de SNP (100, 80, 60 y 40) y microsatélites (25, 20, 15 y 10) correspondientes al Escenario 1. De igual forma podemos apreciar la Heterozigosidad (H) y Contenido de Información Polimórfica (PIC) para cada uno de ellos. También se muestra la desviación típica del porcentaje de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos, y del porcentaje de hijos sin padre discriminado, valores que indican una baja variabilidad entre repeticiones, permitiendo hacer comparaciones adecuadas entre distintas situaciones con los valores medios obtenidos.

Los resultados obtenidos indican, como cabía esperar, que el porcentaje de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos y el porcentaje de hijos sin padre discriminado disminuye según se va incrementando la cantidad de SNP y microsatélites.

En el escenario 1 los paneles de 100 SNP y 25 microsatélites proporcionan porcentajes bajos de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (0.305% y 0.276% respectivamente) y de hijos sin padre discriminado (0.003% en ambos casos). De igual forma los resultados encontrados con los paneles de 80 SNP y 20 microsatélites son buenos ya que de las 100 iteraciones solo en 2 iteraciones aproximadamente no se asigna correctamente el padre a todos los hijos y el porcentaje de hijos sin padre discriminado es de 0.019% y 0.017% respectivamente. Por otro lado los resultados encontrados con los paneles de 60 y 40 SNP, y de igual forma los resultados de los paneles de 15 y 10 microsatélites, indican que en algunas situaciones pueden ser suficientes para la asignación de paternidad.

Cuando se incrementa los valores del PIC y la H aumenta la precisión de la asignación de paternidad (bajo % de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos y de hijos sin padre discriminado) en los paneles de SNP y de microsatélites, como cabía esperar de acuerdo a otros estudios de paternidad donde indican que la eficacia de la asignación de paternidad, está influida por la H y el PIC (Valdés *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2009; Arellano-Vera *et al.*, 2010) la cual a su vez está afectada por el número y frecuencia de alelos. Esto indica que hay que tener en consideración estos datos al momento de seleccionar los marcadores que se van utilizar. Por otro lado los valores encontrados de PIC (68.15) y H (71.04) en el panel de 10 microsatélites son similares a los reportados en otros estudios también utilizando 10 microsatélites (Rodríguez *et al.*, 2004; Agapito *et al.*, 2008). En general nuestros resultados de H y PIC en los microsatélites son similares a las de otros estudios

desarrollados en otras especies, utilizando paneles recomendados por la ISAG (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001; Arana et al., 2002; Schopen *et al.*, 2008).

También se puede observar que existen diferencias entre microsatélites y SNP respecto a los valores de H y PIC, encontrándose valores más altos en los paneles de microsatélites, lo que demuestra por qué se necesitan pocos microsatélites para una asignación correcta de paternidad. Por otro lado los valores encontrados de H y PIC en los SNP son similares a los reportados en otros trabajos (Schopen et al., 2008; Fisher et al., 2009).

**Tabla 2.** Asignación de paternidad utilizando SNP (100, 80, 60 y 40) y microsatélites (25, 20, 15 y 10) en el escenario 1 (5 machos y 100 hembras).

Marcadores	Iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (%)		Hijos sin padre discriminado (%)		H**	PIC***
	$\bar{X}$	DS*	$\bar{X}$	DS*		
100 SNP	0.305	0.130	0.003	0.001	48.40	36.68
80 SNP	1.847	0.528	0.019	0.005	48.34	36.65
60 SNP	17.219	1.258	0.206	0.017	48.23	36.59
40 SNP	83.943	1.374	2.502	0.082	48.00	36.47
25 Microsatélites	0.276	0.131	0.003	0.001	74.61	71.68
20 Microsatélites	1.571	0.679	0.017	0.007	73.20	70.08
15 Microsatélites	21.552	2.053	0.276	0.031	72.00	68.88
10 Microsatélites	77.638	1.790	2.307	0.101	71.04	68.15

\* Desviación estándar.

\*\* Heterocigosidad.

\*\*\* Contenido de información del polimorfismo.

En la Tabla 3 podemos apreciar el porcentaje de las iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos, y de hijos sin padre discriminado atribuidos a los paneles de SNP (100, 80, 60 y 40) y microsatélites (25, 20, 15 y 10) correspondientes al Escenario 2. De igual forma podemos apreciar la Heterozigosidad y Contenido de Información Polimórfica para cada uno de ellos.

En el escenario 2 también se observa que disminuye el porcentaje de iteraciones donde no se asigna correctamente al padre a todos los hijos y de hijos sin padre discriminado según se incrementa la cantidad de SNP y microsatélites. De igual forma mayores valores de PIC y H aparentemente están relacionados con una mayor eficacia en la asignación de paternidad.

Los paneles de 100 SNP y 25 microsatélites también ofrecen porcentajes bajos de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (0.409% y 0.764% respectivamente) y de hijos sin padre discriminado (0.004% y 0.008% respectivamente). Por otro lado los paneles de 40 SNP y 10 microsatélites dan valores altos de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (98.382% y 96.973% respectivamente) y de hijos sin padre discriminado (5.462% y 5.047% respectivamente).

**Tabla 3.** Asignación de paternidad utilizando SNP (100, 80, 60 y 40) y microsatélites (25, 20, 15 y 10) en el escenario 2 (10 machos y 100 hembras).

Marcadores	Iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (%)		Hijos sin padre discriminado (%)		H**	PIC***
	$\bar{X}$	DS*	$\bar{X}$	DS*		
100 SNP	0.409	0.185	0.004	0.002	48.40	36.68
80 SNP	3.700	0.767	0.038	0.008	48.34	36.65
60 SNP	34.409	2.484	0.449	0.036	48.23	36.59
40 SNP	98.382	0.575	5.462	0.145	48.00	36.47
25 Microsatélites	0.764	0.347	0.008	0.003	74.61	71.68
20 Microsatélites	4.664	1.005	0.049	0.011	73.20	70.08
15 Microsatélites	42.045	3.156	0.618	0.047	72.00	68.88
10 Microsatélites	96.973	0.512	5.047	0.117	71.04	68.15

\* Desviación estándar.

\*\* Heterocigosidad.

\*\*\* Contenido de información del polimorfismo.

En la Tabla 4 se observa el porcentaje medio de las iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos y de hijos sin padre discriminado atribuidos a los paneles de SNP (100, 80, 60 y 40) y microsatélites (25, 20, 15 y 10) correspondientes al



Escenario 3. De igual forma podemos apreciar la Heterozigosidad y Contenido de Información Polimórfica para cada uno de ellos.

En el escenario 3 también se observa que disminuye el porcentaje de iteraciones donde no se asigna correctamente al padre a todos los hijos y de hijos sin padre discriminado según se incrementa la cantidad de SNP y microsatélites, al igual que en el escenario 1 y 2.

Por otro lado los paneles de 100 SNP y 25 microsatélites también proporcionan porcentajes bajos de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (0.409% y 0.764% respectivamente) y de hijos sin padre discriminado (0.004% y 0.008% respectivamente).

**Tabla 4.** Asignación de paternidad utilizando SNP (100, 80, 60 y 40) y microsatélites (25, 20, 15 y 10) en el escenario 3 (15 machos y 100 hembras).

Marcadores	Iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (%)		Hijos sin padre discriminado (%)		H**	PIC***
	$\bar{X}$	DS*	$\bar{X}$	DS*		
100 SNP	0.565	0.319	0.006	0.003	48.40	36.68
80 SNP	5.948	0.952	0.062	0.010	48.34	36.65
60 SNP	49.635	1.957	0.729	0.046	48.23	36.59
40 SNP	99.870	0.137	8.302	0.151	48.00	36.47
25 Microsatélites	1.209	0.460	0.012	0.005	74.61	71.68
20 Microsatélites	7.374	1.033	0.078	0.011	73.20	70.08
15 Microsatélites	56.757	1.842	0.930	0.035	72.00	68.88
10 Microsatélites	99.713	0.213	7.615	0.173	71.04	68.15

\* Desviación estándar.

\*\* Heterocigosidad.

\*\*\* Contenido de información del polimorfismo.

En los distintos escenarios (1, 2 y 3) podemos observar que el porcentaje de asignaciones incorrectas de paternidad disminuye drásticamente con un asumible aumento de

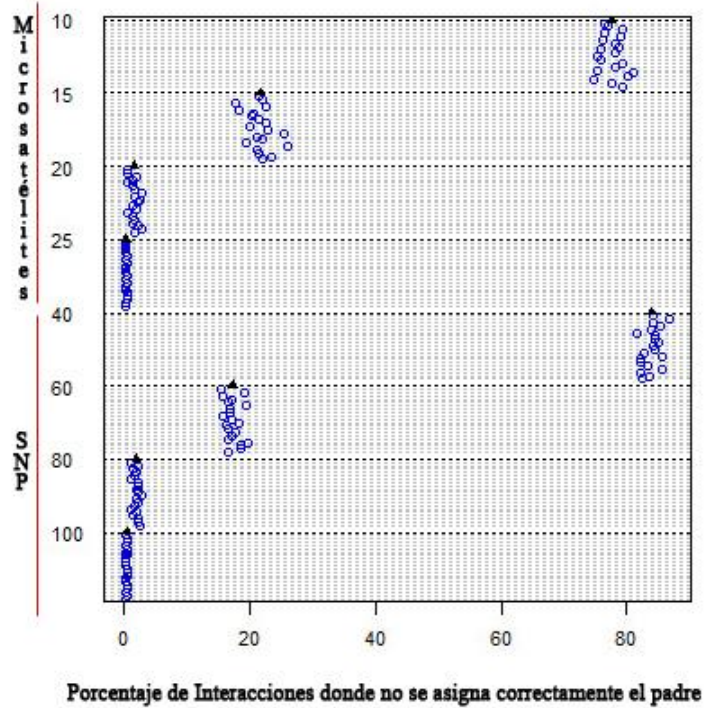
marcadores (SNP y microsatélites), lo cual coincide con otros estudios (Anderson y Garza, 2006; Hill *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2009; Duijvesteijn *et al.*, 2010).

De acuerdo a los resultados una asignación casi perfecta se alcanza utilizando paneles de 100 SNP en los tres escenarios, lo cual concuerda con los resultados encontrados en otros estudios (Hill *et al.*, 2008; Duijvesteijn *et al.*, 2010). De igual forma utilizando paneles de 25 microsatélites se consigue una asignación casi perfecta en todos los escenarios.

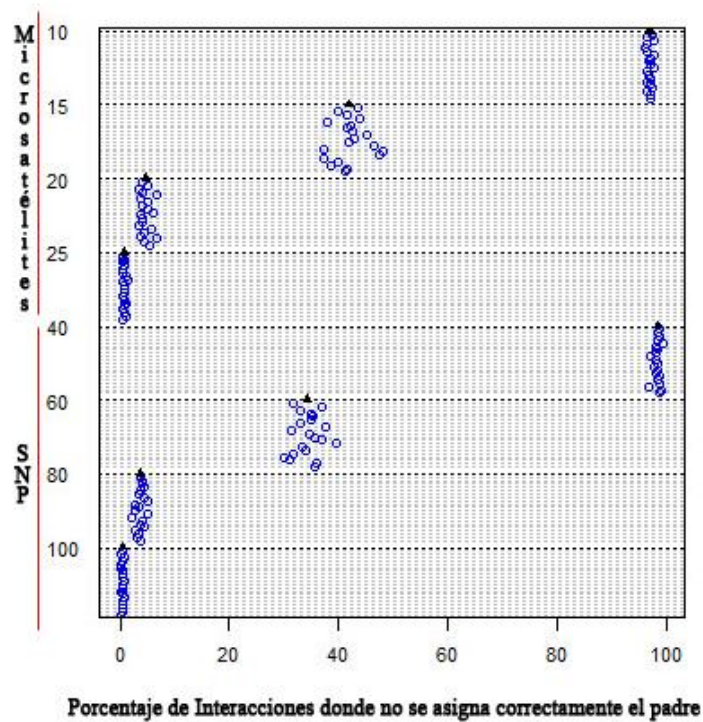
Si comparamos los SNP con los microsatelites respecto a su eficacia en la asignacion de paternidad en los tres escenarios, podemos observar que ambos marcadores ofrecen buenos resultados.

Al analizar la combinación de los marcadores (SNP y microsatélites) con los sistemas de apareamiento (Escenario 1, 2 y 3) se puede apreciar que en el escenario 1 se obtiene mejores resultados seguido por el 2 y 3. Cabía esperar este resultado pues los sistemas de apareamiento difieren solo en la cantidad de machos (posibles padres) y a menor número de padres potenciales se consiguen mejores resultados.

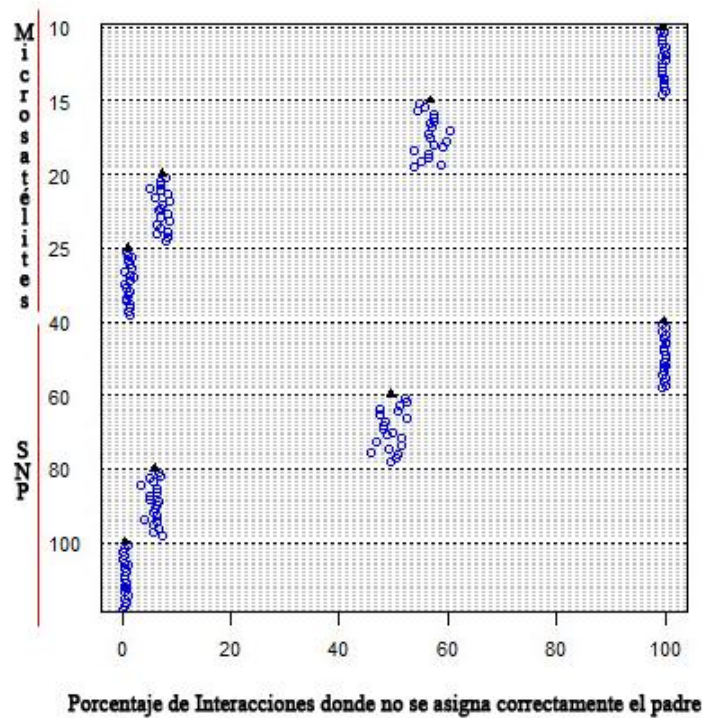
De acuerdo a los resultados (Figuras 1,2 y 3) podemos observar que un panel de 40 SNP (donde la frecuencia del alelo menor fue de 0.35) en los tres escenarios ha demostrado ser una herramienta de diagnóstico de paternidad comparable con el panel de 10 microsatélites reportados por Rodríguez *et al.* (2004). De acuerdo a los resultados de la regresión lineal simple aproximadamente 3.9 SNP equivalen a 1 microsatélite. Similares resultados reportan en otros estudios (Amorim y Pereira, 2005; Weller *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2009; Tokarska *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Comparación de los marcadores SNP y microsatélites respecto al porcentaje de interacciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos en el escenario 1.



**Figura 2.** Comparación de los marcadores SNP y microsatélites respecto al porcentaje de interacciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos en el escenario 2.



**Figura 3.** Comparación de los marcadores SNP y microsatélites respecto al porcentaje de interacciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos en el escenario 3.

Los marcadores SNP serían una alternativa útil para solucionar la problemática del control de parentesco que tienen los programas de mejora genética en alpacas. De acuerdo al análisis de los resultados la combinación del apareamiento alternado (escenario 2) y el panel de 100 SNP sería una buena alternativa, en vista que esta combinación proporciona 0.409% de iteraciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos, claramente muy superiores en cuanto a eficacia al panel de 10 microsatélites (96.973% de interacciones donde no se asignan correctamente el padre a todos los hijos) recomendados en otros estudios (Rodríguez et al., 2004; Agapito et al., 2008; Arellano-Vera et al., 2010). Por otro lado usar el empadre alternado sumaría otras ventajas como una natalidad de 90% (Novoa et al., 1970; Quispe, 1996) y reducción de costes en la actividad de apareamiento (mano de obra e infraestructura), lo que se traduciría en la inclusión de más rebaños en los programas de mejora genética, lo cual incrementaría la variabilidad genética y garantizaría la sostenibilidad de estos programas. Por otro lado en los paneles de SNP se pueden incluir SNP de regiones codificantes que sirvan simultáneamente para identificación genética y para establecer posibles asociaciones con caracteres productivos (Sanz, 2010) lo cual haría que se optimicen los recursos.

Las características anteriormente mencionadas de los SNP combinadas con el hecho de que los SNP son genéticamente estables (Markovtsova et al., 2000; Nielsen, 2000; Thomson

et al., 2000), abundantes en el genoma de los mamíferos (Heaton et al., 2002), tienen baja tasa de mutación (Nachman y Crowell, 2000; Kondrashov, 2003), bajas tasas de error en el genotipado (Kennedy et al., 2003), fáciles de interpretar (Krawczak, 1999) y ofrecen un alto potencial para la automatización (Kruglyak, 1997; Wang et al., 1998; Lindblad-Toh et al., 2000) hacen que los SNP sean una alternativa prometedora para asignar paternidad en alpacas y en otras especies.

Una desventaja de los SNP es que tienen un contenido informativo bajo, en comparación con los microsatélites que son altamente polimórficos. Sin embargo, esta desventaja puede ser compensada por un mayor número de SNP como se puede apreciar en nuestros resultados. Esto concuerda con lo reportado en otros estudios (Vignal et al., 2002; Werner *et al.*, 2004; Weller et al., 2006; Wang y Santure, 2009; Weller et al., 2010).

Otro aspecto a tener en cuenta para determinar la aplicabilidad de los SNP en la verificación de paternidad son los costes económicos que acarrearán. Actualmente para el genotipado de los SNP existe una gran diversidad de metodologías disponibles, y se estima que la producción de un genotipo está en el orden de 0,01 \$ (Heaton *et al.*, 2005), sin embargo dependiendo de la metodología utilizada para el genotipado los costes pueden variar. La automatización en el genotipado de SNP, sugeriría un ahorro económico.

Desarrollar una metodología de genotipado con SNP a menor escala y frecuencia tiene un coste elevado (equipos caros), por lo cual sería mejor realizar esta actividad mediante una empresa que brinda estos servicios. Teniendo como referencia las tarifas de la empresa CEGEN (<http://www.cegen.org/primera.php?que=cost&lang=cast>) genotipar el rebaño (500 crías y 50 machos) del Programa de Mejora Genética de Camélidos Sudamericanos (PROCASUD) de la Universidad Nacional de Huancavelica (Perú) tendría un coste aproximado de 6500 euros (utilizando 100 SNP). Cabe destacar que este coste hace referencia después de haber puesto a punto la técnica.

## V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos las principales conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- Los marcadores SNP constituyen una herramienta utilizable para solucionar la problemática del control de parentesco que tienen los programas de mejoramiento genético en alpacas.
- Un panel de 100 SNP con MAF de 0.35 proporciona una asignación de paternidad casi perfecta en los sistemas de apareamiento habitualmente utilizados en alpacas (apareamiento controlado, alternado y múltiple). De igual forma un panel de 25 microsatélites proporcionan una asignación de paternidad casi perfecta en los tres sistemas.
- Se requieren 40 SNP aproximadamente para dar un poder de exclusión comparable a un panel de 10 microsatélites (3.9 SNP equivalen aproximadamente a 1 microsatélite en las situaciones analizadas).
- Ambos tipos de marcadores son aplicables en la asignación de parentesco, la elección de cualquiera de ellos dependerá del objetivo y situación de cada proyecto.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Agapito, J., J. Rodríguez, P. Herrera-Velít, O. Timoteo, P. Rojas, P. J. Boettcher, F. García and J. R. Espinoza (2008). "Parentage testing in alpacas (*Vicugna pacos*) using semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 10 microsatellite markers." *Animal Genetics* 39(2): 201-203.
- Amorim, A. and L. Pereira (2005). "Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: A comparative analysis with STRs." *Forensic science international* 150(1): 17-21.
- Andersen, J. S. and M. Mann (2000). "Functional genomics by mass spectrometry." *FEBS letters* 480(1): 25-31.
- Anderson, E. C. and J. C. Garza (2006). "The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference." *Genetics* 172(4): 2567-2582.
- Arana, A., B. Soret, I. Lasa and L. Alfonso (2002). "Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry." *Meat Science* 61(4): 367-373.
- Aranguren-Méndez, J. and J. Jordana (2001). Utilización de marcadores de adn (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. X Congreso Venezolano de Zootecnia. Guanare - Venezuela.
- Arellano-Vera, W., A. M. Sifuentes-Rincón, R. Garcidueñas-Piña and G. M. Parra-Bracamonte (2010). "Importancia de la verificación-asignación de progenitores en sistemas extensivos de pie de cría." *Rev. Cient.(Maracaibo* 20(1): 53-60.
- Arranz, J. J., W. Coppieters, P. Berzi, N. Cambisano, B. Grisart, L. Karim, F. Marcq, L. Moreau, C. Mezer and J. Riquet (1998). "A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation." *Animal Genetics* 29(2): 107-115.
- Baumung, R., H. Simianer and I. Hoffmann (2004). "Genetic diversity studies in farm animals—a survey." *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121(6): 361-373.
- Becerra, V. (2000). "Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética." *Agricultura técnica* 60(3): 270-281.
- Ben-Ari, G., D. Zenvirth, A. Sherman, G. Simchen, U. Lavi and J. Hillel (2005). "Application of SNPs for assessing biodiversity and phylogeny among yeast strains." *Heredity* 95(6): 493-501.
- Blancou, J. (2001). "A history of the traceability of animals and animal products." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 20(2): 413.
- Blott, S., J. Williams and C. Haley (1999). "Discriminating among cattle breeds using genetic markers." *Heredity* 82(6): 613-619.
- Bourdon, R. M. and R. M. Bourbon (1997). *Understanding animal breeding*, Prentice Hall.
- Bowcock, A., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. Kidd and L. L. Cavalli-Sforza (1994). "High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites." *Nature* 368(6470): 455-457.
- Brinkmann, B., M. Klitschar, F. Neuhuber, J. Hühne and B. Rolf (1998). "Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat." *The American Journal of Human Genetics* 62(6): 1408-1415.
- Brookes, A. J. (1999). "The essence of SNPs." *Gene* 234(2): 177-186.
- Buchanan, F. C. and T. D. Thue (1998). "Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep." *Canadian journal of animal science* 78(3): 425-428.
- Bustinza, A. (2001). *La alpaca, conocimiento del gran potencial andino*. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 343 pág.
- Capoferri, R., A. Galli and G. Bongioni (2005). *Molecular traceability in meat producing animals by SNPs*. 4th World Italian Beef Cattle Congress. Milano - Italy.
- Cardoso, F. F. and R. J. Tempelman (2004). "Genetic evaluation of beef cattle accounting for uncertain paternity." *Livestock Production Science* 89(2-3): 109-120.
- CEPES (2005). *Retos y Perspectivas del Productor de Camélidos Domésticos*, Sociedad Peruana de Alpacas Registradas. Lima - Perú.

- Cornide, M., A. Arencibia, V. Berovides, D. Calvo, E. Canales, O. Coto, C. González, M. Rodríguez, J. Sánchez and A. Sigarroa (2002). "Marcadores moleculares." *Nuevos horizontes en la genética y selección de las plantas*. Editorial Felix Varela. La Habana, Cuba 367.
- Cunningham, E. and C. Meghen (2001). "Biological identification systems: genetic markers." *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 20(2): 491-497.
- Dietz, A., J. Womack, P. Swarbrick and A. Crawford (1993). "Assignment of five polymorphic ovine microsatellites to bovine syntenic groups." *Animal Genetics* 24(6): 433-436.
- Duijvesteijn, N., M. Soares, W. Van Haeringen, J. Merks, E. Knol and B. Harlizius (2010). *Paternal Identification In Pigs By SNP's*. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig - Germany.
- FAO (2005). *Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en el Perú*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. TCP/RLA/.
- Ferreira, M. and D. Grattapaglia (1998). "Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético." *Embrapa-cenargen*. Brasilia 220.
- Fisher, P. J., B. Malthus, M. C. Walker, G. Corbett and R. J. Spelman (2009). "The number of single nucleotide polymorphisms and on-farm data required for whole-herd parentage testing in dairy cattle herds." *Journal of Dairy Science* 92(1): 369-374.
- Forbes, S. H., J. T. Hogg, F. C. Buchanan, A. M. Crawford and F. W. Allendorf (1995). "Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep." *Molecular Biology and Evolution* 12(6): 1106.
- Fries, R. and G. Durstewitz (2001). "Digital DNA signatures for animal tagging." *Nature biotechnology* 19(6): 508-508.
- Giovambattista, G., M. Ripoli, J. De Luca, P. Mirol, J. Lirón and F. Dulout (2000). "Male mediated introgression of *Bos indicus* genes into Argentine and Bolivian Creole cattle breeds." *Animal Genetics* 31(5): 302-305.
- Goffaux, F., B. China, L. Dams, A. Clinquart and G. Daube (2005). "Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection." *Forensic science international* 151(2-3): 239-247.
- Heaton, M. P., W. M. Grosse, S. M. Kappes, J. W. Keele, C. G. Chitko-McKown, L. V. Cundiff, A. Braun, D. P. Little and W. W. Laegreid (2001). "Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes." *Mammalian Genome* 12(1): 32-37.
- Heaton, M. P., G. P. Harhay, G. L. Bennett, R. T. Stone, W. M. Grosse, E. Casas, J. W. Keele, T. P. L. Smith, C. G. Chitko-McKown and W. W. Laegreid (2002). "Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle." *Mammalian Genome* 13(5): 272-281.
- Heaton, M. P., J. E. Keen, M. L. Clawson, G. P. Harhay, N. Bauer, C. Shultz, B. T. Green, L. Durso, C. G. Chitko-McKown and W. W. Laegreid (2005). "Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226(8): 1311-1314.
- Heyen, D., J. Beever, Y. Da, R. Everts, C. Green, H. Lewin, S. Bates and J. Ziegler (1997). "Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing." *Animal Genetics* 28(1): 21-27.
- Hill, W., B. Salisbury and A. Webb (2008). "Parentage identification using SNP genotypes: application to product tracing." *Journal of Animal Science*: jas. 2007-0276v2001.
- Holt, C. L., C. Stauffer, J. M. Wallin, K. D. Lazaruk, T. Nguyen, B. Budowle and P. S. Walsh (2000). "Practical applications of genotypic surveys for forensic STR testing." *Forensic science international* 112(2-3): 91-109.
- Huanca, T. (1992). *Efecto de los criterios técnicos de selección sobre los sistemas tradicionales del empadre en alpacas*. Informe Técnico Nro 7-91. Proyecto Alpacas. INIAA - COTESU11C. Puno - Perú.
- Imai, K., T. Matsuhige, T. Watanabe, Y. Sugimoto and N. Ihara (2007). "Mapping of a quantitative trait locus for beef marbling on bovine chromosome 9 in purebred Japanese Black cattle." *Animal Biotechnology* 18(2): 75-80.
- Inagaki, S., Y. Yamamoto, Y. Doi, T. Takata, T. Ishikawa, K. Yoshitome, S. Miyaishi and H. Ishizu (2002). "Typing of Y chromosome single nucleotide polymorphisms in a Japanese population by a multiplexed single nucleotide primer extension reaction." *Legal Medicine* 4(3): 202-206.
- Jamieson, A. (1997). "Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion." *Animal Genetics* 28(6): 397-400.



- Jones, A. G. and W. R. Ardren (2003). "Methods of parentage analysis in natural populations." *Molecular Ecology* 12(10): 2511-2523.
- Kemp, S., O. Hishida, J. Wambugu, A. Rink, A. Teale, M. Longeri, R. Ma, Y. Da, H. Lewin and W. Barendse (1995). "A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers." *Animal Genetics* 26(5): 299-306.
- Kennedy, G. C., H. Matsuzaki, S. Dong, W. Liu, J. Huang, G. Liu, X. Su, M. Cao, W. Chen and J. Zhang (2003). "Large-scale genotyping of complex DNA." *Nature biotechnology* 21(10): 1233-1237.
- Kondrashov, A. S. (2003). "Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases." *Human mutation* 21(1): 12-27.
- Krawczak, M. (1999). "Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms." *Electrophoresis* 20(8): 1676-1681.
- Kruglyak, L. (1997). "The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies." *Nature genetics* 17(1): 21-24.
- Lang, K., Y. Wang and Y. Plante (1996). "Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas." *Animal Genetics* 27(4): 293-293.
- Lee, H. S., J. W. Lee, G. R. Han and J. J. Hwang (2000). "Motherless case in paternity testing." *Forensic science international* 114(2): 57-65.
- León-Velarde, C. and J. Guerrero (2001). Improving quantity and quality of Alpaca fiber; using a simulation model for breeding strategies. The Third International Symposium on Systems Approaches for Agricultural Development. Lima - Perú. 9.
- Li, Y., F. Wenzel, W. Holzgreve and S. Hahn (2006). "Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI TOF MS using cell free fetal DNA in maternal plasma: Influence of size fractionation." *Electrophoresis* 27(19): 3889-3896.
- Lindblad-Toh, K., E. Winchester, M. J. Daly, D. G. Wang, J. N. Hirschhorn, J. P. Lavolette, K. Ardlie, D. E. Reich, E. Robinson and P. Sklar (2000). "Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse." *Nature genetics* 24(4): 381-386.
- Lirón, J. P., P. Peral-García and G. Giovambattista (2006). "Genetic characterization of Argentine and Bolivian Creole cattle breeds assessed through microsatellites." *Journal of Heredity* 97(4): 331.
- Liu, Q., E. C. Thorland, J. A. Heit and S. S. Sommer (1997). "Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes." *Genome research* 7(4): 389.
- Livak, K. J., J. Marmaro and J. A. Todd (1995). "Towards fully automated genome-wide polymorphism screening." *Nature genetics* 9(4): 341-342.
- Markovtsova, L., P. Marjoram and S. Tavaré (2000). "The age of a unique event polymorphism." *Genetics* 156(1): 401.
- Martín-Burriel, I., E. GarcoAa-Muro and P. Zaragoza (1999). "Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites." *Anim. Genet* 30: 177-182.
- Martín-Burriel, I., C. Rodellar, J. A. Lenstra, A. Sanz, C. Cons, R. Osta, M. Reta, S. De Argüello and P. Zaragoza (2007). "Genetic diversity and relationships of endangered Spanish cattle breeds." *Journal of Heredity* 98(7): 687.
- McGregor, B. (2006). "Production, attributes and relative value of alpaca fleeces in southern Australia and implications for industry development." *Small Ruminant Research* 61(2-3): 93-111.
- Mommens, G., A. Van Zeveren and L. Peelman (1998). "Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L." *Animal Genetics* 29(1): 12-18.
- Montes, M., I. Quicaño, R. Quispe, E. Quispe and L. Alfonso (2008). "Quality characteristics of Huacaya alpaca fibre produced in the Peruvian Andean Plateau region of Huancavelica." *Spanish Journal of Agricultural Research* 6(1): 33-38.
- Moran, C. (1993). "Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes." *Journal of Heredity* 84(4): 274.
- Mrode, R. and R. Thompson (2005). Linear models for the prediction of animal breeding values, Cabi.

- Nachman, M. W. and S. L. Crowell (2000). "Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans." *Genetics* 156(1): 297.
- Nielsen, R. (2000). "Estimation of population parameters and recombination rates from single nucleotide polymorphisms." *Genetics* 154(2): 931.
- Novoa, C., J. Sumar and E. Franco (1970). "Empadre complementario de hembras alpacas vacías." *Bol. Ext. IVITA Perú* 4: 53-59.
- Page, B., E. Casas, M. Heaton, N. Cullen, D. Hyndman, C. Morris, A. Crawford, T. Wheeler, M. Koohmaraie and J. Keele (2002). "Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle." *Journal of Animal Science* 80(12): 3077.
- Pakstis, A. J., W. C. Speed, J. R. Kidd and K. K. Kidd (2007). "Candidate SNPs for a universal individual identification panel." *Human genetics* 121(3): 305-317.
- Pastinen, T., J. Partanen and A. Syvanen (1996). "Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation." *Clinical chemistry* 42(9): 1391.
- Paucar, R., L. Alfonso and E. C. Quispe (2009). Alpatec (versión 1.0), programa informático aplicado al manejo de registros zootécnicos en alpacas. V Congreso mundial de camélidos. Riobamba – Ecuador, 1:78.
- Peelman, L., F. Mortiaux, A. Van Zeveren, A. Dansercoer, G. Mommens, F. Coopman, Y. Bouquet, A. Burny, R. Renaville and D. Portetelle (1998). "Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds." *Animal Genetics* 29(3): 161-167.
- Penedo, M., A. Caetano and K. Cordova (1998). "Microsatellite markers for South American camelids." *Animal Genetics* 29:398-413.
- Quispe, E., J. Mueller, J. Ruiz, L. Alfonso and G. Gutiérrez (2008). "Actualidades sobre adaptación, producción, reproducción y mejora genética en camélidos." Universidad Nacional de Huancavelica. Primera Edición. Huancavelica, Perú: 93–112.
- Quispe, T. (1996). Sistemas de empadre en alpacas. *Rev. Argentina de Producción Animal*. 16(4):357-361.
- Ritz, L. and M. Glowatzki Mullis (2000). "Phylogenetic analysis of the tribe Bovini using microsatellites." *Animal Genetics* 31(3): 178-185.
- Rodríguez, J., J. C. Wheeler, C. S. Dodd, M. W. Bruford and R. Rosadio (2004). "Determinación de parentesco en alpacas (*Vicugna pacos*) por medio del análisis de ADN microsatélite." *Rev Inv Vet Perú* 15(2): 113-119.
- Ronaghi, M., M. Uhlén and P. Nyren (1998). "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." *Science(Washington)* 281(5375): 363-365.
- Sachidanandam, R., D. Weissman, S. C. Schmidt, J. M. Kakol, L. D. Stein, G. Marth, S. Sherry, J. C. Mullikin, B. J. Mortimore and D. L. Willey (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." *Nature* 409(6822): 928-933.
- Sanz, A. (2010). Trazabilidad genética en ganado bovino: estudio comparativo de la eficacia de microsatélites y SNPs. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza: 175.
- Sanz, A., U. O., M. I. and S. Martínez (2002). "Empleo de los microsatélites para determinar paternidad en bovinos cubanos." *Rev. Salud Anim* 24, 166-9.
- Sarno, R. J., W. L. Franklin, S. O'BRIEN, W. E. Johnson, B. Gonzáles, P. Bas, C. Tala and A. Iriarte (1998). "Uso de marcadores genéticos para la conservación de los camélidos sudamericanos silvestres." Seminario Manejo Sustentable de la Vicuña y el Guanaco, Santiago, 18-19 nov 1998.
- Sauer, S., D. H. Gelfand, F. Boussicault, K. Bauer, F. Reichert and I. G. Gut (2002). "Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry." *Nucleic Acids Research* 30(5): e22.
- Schena, M., R. A. Heller, T. P. Thenault, K. Konrad, E. Lachenmeier and R. W. Davis (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics." *Trends in Biotechnology* 16(7): 301-306.
- Schnabel, R., T. Ward and J. Derr (2000). "Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, *Bison bison* and domestic cattle." *Animal Genetics* 31(6): 360-366.
- Schopen, G. C. B., H. Bovenhuis, M. H. P. W. Visker and J. A. M. v. Arendonk (2008). "Comparison of information content for microsatellites and SNPs in poultry and cattle." *Animal Genetics* 39(4): 451-453.

- Sherman, G. B., S. D. Kachman, L. L. Hungerford, G. P. Rupp, C. P. Fox, M. D. Brown, B. M. Feuz and T. R. Holm (2004). "Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage." *Animal Genetics* 35(3): 220-226.
- Sirchia, S. M., I. Garagiola, C. De Andreis, I. Gazzoli, M. Gramegna and G. Colucci (1996). "Characterization of four microsatellites in an Italian population and their application to paternity testing." *Molecular and Cellular Probes* 10(2): 155-158.
- Snelling, W. M., E. Casas, R. T. Stone, J. W. Keele, G. P. Harhay, G. L. Bennett and T. P. L. Smith (2005). "Linkage mapping bovine EST-based SNP." *BMC genomics* 6(1): 74.
- Spencer, P. B. S., K. J. Wilson and A. Tinson (2010). "Parentage testing of racing camels (*Camelus dromedarius*) using microsatellite DNA typing." *Animal Genetics* 41(6): 662-665.
- Stone, R., E. Casas, T. Smith, J. Keele, G. Harhay, G. Bennett, M. Koohmaraie, T. Wheeler, S. Shackelford and W. Snelling (2005). "Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: Development of a low-density single nucleotide polymorphism map." *Journal of Animal Science* 83(10): 2280.
- Tapio, I., S. Värvi, J. Bennewitz, J. Maleviciute, E. Fimland and Z. Grislis (2006). "Prioritization for conservation of northern European cattle breeds based on analysis of microsatellite data." *Conservation biology* 20(6): 1768-1779.
- Thomson, R., J. K. Pritchard, P. Shen, P. J. Oefner and M. W. Feldman (2000). "Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(13): 7360.
- Tokarska, M., T. Marshall, R. Kowalczyk, J. M. Wojcik, C. Pertoldi, T. N. Kristensen, V. Loeschke, V. R. Gregersen and C. Bendixen (2009). "Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison." *Heredity* 103(4): 326-332.
- Tosh, J. J. and J. W. Wilton (1994). "Effects of data structure on variance of prediction error and accuracy of genetic evaluation." *J Anim Sci* 72(10): 2568-2577.
- Twito, T., S. Weigend, S. Blum, Z. Granevitze, M. Feldman, R. Perl-Treves, U. Lavi and J. Hillel (2007). "Biodiversity of 20 chicken breeds assessed by SNPs located in gene regions." *Cytogenetic and Genome Research* 117(1-4): 319-326.
- Uffo, O. (2000). "Aplicación de Marcadores Moleculares para el estudio de la Biodiversidad del ganado bovino cubano." CENSA, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba 145.
- Valdés, R., M. Víctor, G. De La Fuente, J. Carlos, S. Meléndez, M. De oca and W. González (2006). "Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México." *Ciencia UANL* 9(2).
- Van Eenennaam, A., R. Weaber, D. Drake, M. Penedo, R. Quaas, D. Garrick and E. Pollak (2007). "DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting." *Journal of Animal Science* 85(12): 3159.
- Vega-Pla, J., D. F. D. A. Cara, J. J. G. Pavón and G. Dorado (1998). "Propuesta de metodología para la localización de microsatélites en el genoma equino." *Arch. Zootec* 47: 189-194.
- Vignal, A., D. Milan, M. SanCristobal and A. Eggen (2002). "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics." *Genetics Selection Evolution* 34(3): 275-306.
- Wang, D. G., J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester and J. Spencer (1998). "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome." *Science* 280(5366): 1077.
- Wang, J. and A. W. Santure (2009). "Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy." *Genetics* 181(4): 1579.
- Weller, J. I., G. Glick, E. Ezra, Y. Zeron, E. Seroussi and M. Ron (2010). "Paternity validation and estimation of genotyping error rate for the BovineSNP50 BeadChip." *Animal Genetics* 41(5): 551-553.
- Weller, J. I., E. Seroussi and M. Ron (2006). "Estimation of the number of genetic markers required for individual animal identification accounting for genotyping errors." *Animal Genetics* 37(4): 387-389.

Werner, F. A. O., G. Durstewitz, F. A. Habermann, G. Thaller, W. Krämer, S. Kollers, J. Buitkamp, M. Georges, G. Brem, J. Mosner and R. Fries (2004). "Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds." *Animal Genetics* 35(1): 44-49.

Wheeler, J. C. (1995). "Evolution and present situation of the South American Camelidae." *Biological Journal of the Linnean Society* 54(3): 271-295.

Wuliji, T., G. Davis, K. Dodds, P. Turner, R. Andrews and G. Bruce (2000). "Production performance, repeatability and heritability estimates for live weight, fleece weight and fiber characteristics of alpacas in New Zealand." *Small Ruminant Research* 37(3): 189-201.

## VII. ANEJOS

**Tabla 5:** Frecuencias de los SNP considerados para las simulaciones.

0.57 - 0.43	0.45 - 0.55	0.63 - 0.37	0.42 - 0.58
0.58 - 0.42	0.59 - 0.41	0.44 - 0.56	0.63 - 0.37
0.44 - 0.56	0.62 - 0.38	0.47 - 0.53	0.42 - 0.58
0.56 - 0.44	0.57 - 0.43	0.61 - 0.39	0.63 - 0.37
0.62 - 0.38	0.38 - 0.62	0.60 - 0.40	0.57 - 0.43
0.45 - 0.55	0.41 - 0.59	0.52 - 0.48	0.64 - 0.36
0.49 - 0.51	0.62 - 0.38	0.60 - 0.40	0.40 - 0.60
0.47 - 0.53	0.50 - 0.50	0.63 - 0.37	0.39 - 0.61
0.59 - 0.41	0.56 - 0.44	0.49 - 0.51	0.56 - 0.44
0.44 - 0.56	0.46 - 0.54	0.47 - 0.53	0.50 - 0.50
0.59 - 0.41	0.53 - 0.47	0.35 - 0.65	0.55 - 0.45
0.65 - 0.35	0.47 - 0.53	0.39 - 0.61	0.61 - 0.39
0.37 - 0.63	0.35 - 0.65	0.40 - 0.60	0.55 - 0.45
0.56 - 0.44	0.40 - 0.60	0.46 - 0.54	0.53 - 0.47
0.60 - 0.40	0.48 - 0.52	0.60 - 0.40	0.37 - 0.63
0.52 - 0.48	0.61 - 0.39	0.37 - 0.63	0.64 - 0.36
0.40 - 0.60	0.41 - 0.59	0.51 - 0.49	0.50 - 0.50
0.55 - 0.45	0.45 - 0.55	0.46 - 0.54	0.40 - 0.60
0.47 - 0.53	0.44 - 0.56	0.62 - 0.38	0.64 - 0.36
0.63 - 0.37	0.60 - 0.40	0.62 - 0.38	0.50 - 0.50
0.59 - 0.41	0.54 - 0.46	0.63 - 0.37	0.59 - 0.41
0.54 - 0.46	0.42 - 0.58	0.40 - 0.60	0.62 - 0.38
0.49 - 0.51	0.50 - 0.50	0.58 - 0.42	0.61 - 0.39
0.42 - 0.58	0.49 - 0.51	0.40 - 0.60	0.61 - 0.39
0.41 - 0.59	0.38 - 0.62	0.42 - 0.58	0.36 - 0.64

**Tabla 6:** Microsatélites considerados para las simulaciones.

<b>Microsatélite</b>	<b>Número de Alelos</b>	<b>Tamaño de los alelos</b>	<b>Alelos</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>PE*</b>
<b>LCA 19*</b>	12	85 – 117	85	0.1170	0.548
			89	0.0213	
			91	0.0106	
			93	0.0319	
			95	0.0213	
			99	0.1277	
			101	0.4787	
			103	0.0638	
			105	0.0319	
			107	0.0213	
			111	0.0638	
			117	0.0106	
<b>YWLL 29**</b>	9	214 – 234	214	0.0957	0.634
			216	0.2128	
			218	0.0957	
			220	0.3191	
			222	0.0745	
			224	0.1277	
			226	0.0532	
			228	0.0106	
			234	0.0106	
<b>YWLL 40**</b>	5	180 – 188	180	0.2340	0.408
			182	0.0106	
			184	0.0957	
			186	0.1489	
			188	0.5106	
<b>YWLL 46**</b>	4	97 – 109	97	0.8085	0.174
			103	0.0106	
			105	0.0745	
			109	0.1064	
<b>YWLL 43**</b>	8	128 – 156	128	0.0326	0.452
			138	0.0109	
			142	0.2826	
			144	0.0761	
			146	0.4674	
			148	0.0217	
			150	0.0978	
156	0.0109				
<b>LCA 5*</b>	7	188 – 206	188	0.2021	0.575
			190	0.0851	
			192	0.0957	
			194	0.0638	
			202	0.3617	
			204	0.1809	
206	0.0106				
<b>YWLL 08**</b>	20	134 – 186	134	0.1489	0.844
			138	0.0106	
			140	0.0638	

			142	0.0532	
			148	0.0426	
			150	0.1170	
			152	0.0745	
			154	0.0319	
			156	0.0532	
			158	0.0319	
			162	0.0106	
			166	0.0745	
			168	0.0319	
			170	0.0426	
			176	0.0745	
			178	0.0851	
			180	0.0106	
			182	0.0213	
			184	0.0106	
			186	0.0106	
<b>LCA 23*</b>	11	132 – 160	132	0.0106	0.621
			136	0.0851	
			138	0.0532	
			142	0.2128	
			144	0.0106	
			146	0.2447	
			148	0.2660	
			149	0.0106	
			156	0.0106	
			158	0.0106	
			160	0.0851	
<b>LCA 22*</b>	4	113 – 119	113	0.6383	0.294
			115	0.2340	
			117	0.0532	
			119	0.0745	
<b>YWLL 36**</b>	11	149 – 179	149	0.2340	0.733
			151	0.1277	
			153	0.0638	
			157	0.1596	
			159	0.0745	
			165	0.0851	
			169	0.0532	
			171	0.0319	
			173	0.0213	
			175	0.1277	
			179	0.0213	

\* Penedo et al. (1998)

\*\* Lang et al. (1996)

\*\*\* PE: probabilidad de exclusión

**Tabla 7.** Porcentajes de interacciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (INCP) y de hijos sin padre discriminado (HSPD), utilizando SNP (40, 60, 80 y 100) y microsatélites (10, 15, 20 y 25) en el escenario 1 (5 machos y 100 hembras).

Panel de 40 SNP		Panel de 60 SNP		Panel de 80 SNP		Panel de 100 SNP		Panel de 10 Microsatélites		Panel de 15 Microsatélites		Panel de 20 Microsatélites		Panel de 25 Microsatélites	
INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD
82.476	2.408	16.571	0.198	2.476	0.029	0.191	0.002	79.429	2.337	22.095	0.274	1.524	0.015	0.191	0.002
83.619	2.469	18.476	0.219	2.286	0.025	0.571	0.006	77.524	2.383	23.429	0.303	2.667	0.031	0.191	0.002
82.286	2.530	18.476	0.227	2.095	0.021	0.191	0.002	74.667	2.105	21.333	0.261	2.095	0.021	0.381	0.004
85.714	2.562	19.619	0.225	1.333	0.013	0.381	0.004	80.191	2.482	20.952	0.290	1.333	0.015	0.571	0.006
83.238	2.337	16.571	0.213	1.905	0.019	0.381	0.004	80.952	2.227	25.905	0.351	1.714	0.017	0.381	0.004
82.095	2.531	17.143	0.194	0.952	0.010	0.191	0.002	75.429	2.166	19.429	0.261	1.333	0.015	0.191	0.002
82.286	2.476	17.524	0.210	1.714	0.017	0.191	0.002	78.095	2.343	22.095	0.271	0.571	0.006	0.191	0.002
85.524	2.591	16.571	0.194	2.095	0.021	0.381	0.004	79.429	2.427	21.143	0.255	1.905	0.021	0.381	0.004
82.667	2.526	16.191	0.183	1.900	0.019	0.571	0.006	75.810	2.284	25.524	0.330	1.333	0.015	0.191	0.002
84.571	2.562	18.286	0.231	2.857	0.029	0.381	0.004	75.429	2.170	22.857	0.286	2.095	0.021	0.381	0.004
84.191	2.491	17.143	0.227	2.095	0.021	0.191	0.002	78.095	2.257	20.000	0.265	2.476	0.027	0.191	0.002
85.143	2.587	15.619	0.181	1.905	0.019	0.191	0.002	75.810	2.202	22.667	0.282	1.714	0.017	0.191	0.002
84.571	2.446	16.762	0.206	2.286	0.023	0.191	0.002	78.667	2.368	21.333	0.288	2.857	0.029	0.191	0.002
84.381	2.610	16.762	0.204	2.095	0.021	0.381	0.004	78.286	2.351	20.191	0.263	1.524	0.015	0.381	0.004
81.714	2.339	19.238	0.229	0.952	0.013	0.191	0.002	76.191	2.248	20.571	0.259	1.333	0.015	0.191	0.002
84.000	2.516	16.381	0.192	1.524	0.015	0.381	0.004	79.048	2.322	18.286	0.225	0.571	0.006	0.571	0.006
85.333	2.469	17.143	0.204	1.905	0.021	0.191	0.002	76.571	2.448	22.476	0.276	1.333	0.015	0.191	0.002
84.191	2.423	15.619	0.183	1.333	0.013	0.381	0.004	79.429	2.415	17.524	0.219	1.905	0.021	0.191	0.002
86.667	2.627	19.048	0.229	2.286	0.023	0.381	0.004	77.143	2.291	21.905	0.303	0.571	0.006	0.191	0.002
84.191	2.549	15.238	0.183	0.952	0.010	0.191	0.002	76.571	2.316	21.333	0.257	0.571	0.006	0.191	0.002
<b>83.943*</b>	<b>2.502</b>	<b>17.219</b>	<b>0.206</b>	<b>1.847</b>	<b>0.019</b>	<b>0.305</b>	<b>0.003</b>	<b>77.638</b>	<b>2.307</b>	<b>21.552</b>	<b>0.276</b>	<b>1.571</b>	<b>0.017</b>	<b>0.276</b>	<b>0.003</b>
<b>1.374**</b>	<b>0.082</b>	<b>1.258</b>	<b>0.017</b>	<b>0.528</b>	<b>0.005</b>	<b>0.130</b>	<b>0.001</b>	<b>1.790</b>	<b>0.101</b>	<b>2.053</b>	<b>0.031</b>	<b>0.679</b>	<b>0.007</b>	<b>0.131</b>	<b>0.001</b>

\* Media

\*\* Desviación estándar

**Tabla 8.** Porcentajes de interacciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (INCP) y de hijos sin padre discriminado (HSPD), utilizando SNP (40, 60, 80 y 100) y microsatélites (10, 15, 20 y 25) en el escenario 2 (10 machos y 100 hembras).

Panel de 40 SNP		Panel de 60 SNP		Panel de 80 SNP		Panel de 100 SNP		Panel de 10 Microsatélites		Panel de 15 Microsatélites		Panel de 20 Microsatélites		Panel de 25 Microsatélites	
INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD
98.909	5.467	35.636	0.466	3.636	0.036	0.182	0.002	97.091	5.126	41.273	0.582	5.455	0.055	0.364	0.004
99.091	5.558	36.000	0.478	3.091	0.033	0.546	0.006	97.273	5.095	41.455	0.613	4.364	0.047	1.273	0.013
96.909	5.295	30.909	0.407	3.455	0.035	0.364	0.004	96.364	5.111	38.546	0.566	6.727	0.071	0.727	0.007
98.727	5.271	30.000	0.369	2.727	0.027	0.546	0.007	97.454	4.842	39.818	0.576	3.818	0.042	0.364	0.004
98.364	5.349	31.818	0.446	4.546	0.047	0.364	0.004	97.273	5.107	37.273	0.558	4.546	0.047	0.909	0.009
98.727	5.260	34.000	0.436	3.636	0.036	0.727	0.007	96.364	4.831	47.636	0.691	5.636	0.056	1.273	0.013
98.182	5.624	33.273	0.447	4.000	0.044	0.364	0.004	97.273	4.918	48.000	0.715	3.273	0.033	0.727	0.007
98.364	5.422	39.455	0.522	2.000	0.022	0.182	0.002	96.727	5.082	37.273	0.538	4.000	0.040	0.546	0.006
97.818	5.327	37.091	0.502	4.909	0.049	0.364	0.004	96.364	5.120	46.546	0.671	4.182	0.044	0.909	0.009
98.546	5.667	35.636	0.467	2.727	0.027	0.546	0.006	97.636	5.113	41.818	0.593	3.818	0.038	0.727	0.007
98.000	5.656	34.727	0.473	3.455	0.035	0.727	0.007	97.273	4.878	42.909	0.616	6.000	0.067	0.909	0.009
97.273	5.571	31.455	0.406	2.909	0.029	0.364	0.004	96.727	5.166	45.273	0.664	5.091	0.055	0.546	0.006
98.182	5.416	37.636	0.482	4.909	0.053	0.546	0.006	97.273	5.084	42.546	0.620	4.182	0.046	1.455	0.015
98.364	5.509	32.909	0.456	4.546	0.046	0.364	0.004	97.636	5.242	41.455	0.624	5.091	0.053	1.273	0.013
98.182	5.740	35.091	0.446	3.455	0.036	0.182	0.002	96.546	5.082	42.182	0.595	3.818	0.040	0.546	0.006
99.273	5.529	35.455	0.449	3.818	0.038	0.182	0.002	96.000	4.947	38.000	0.566	6.546	0.066	0.364	0.004
98.546	5.246	35.091	0.449	4.364	0.046	0.364	0.004	96.546	4.935	44.000	0.647	4.182	0.044	0.727	0.007
98.727	5.455	33.091	0.409	4.182	0.042	0.727	0.007	97.636	5.107	41.455	0.635	3.273	0.033	0.364	0.004
98.546	5.402	37.091	0.469	4.000	0.040	0.182	0.002	96.546	4.989	40.000	0.629	5.091	0.055	0.909	0.009
98.909	5.476	31.818	0.409	3.636	0.038	0.364	0.004	97.455	5.167	43.455	0.655	4.182	0.044	0.364	0.004
<b>98.382*</b>	<b>5.462</b>	<b>34.409</b>	<b>0.449</b>	<b>3.700</b>	<b>0.038</b>	<b>0.409</b>	<b>0.004</b>	<b>96.973</b>	<b>5.047</b>	<b>42.045</b>	<b>0.618</b>	<b>4.664</b>	<b>0.049</b>	<b>0.764</b>	<b>0.008</b>
<b>0.575**</b>	<b>0.145</b>	<b>2.484</b>	<b>0.036</b>	<b>0.767</b>	<b>0.008</b>	<b>0.185</b>	<b>0.002</b>	<b>0.512</b>	<b>0.117</b>	<b>3.156</b>	<b>0.047</b>	<b>1.005</b>	<b>0.011</b>	<b>0.347</b>	<b>0.003</b>

\* Media

\*\* Desviación estándar



**Tabla 9.** Porcentajes de interacciones donde no se asigna correctamente el padre a todos los hijos (INCP) y de hijos sin padre discriminado (HSPD), utilizando SNP (40, 60, 80 y 100) y microsatélites (10, 15, 20 y 25) en el escenario 3 (15 machos y 100 hembras)

Panel de 40 SNP		Panel de 60 SNP		Panel de 80 SNP		Panel de 100 SNP		Panel de 10 Microsatélites		Panel de 15 Microsatélites		Panel de 20 Microsatélites		Panel de 25 Microsatélites	
INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD	INCP	HSPD
99.652	8.397	49.391	0.685	7.304	0.073	0.174	0.002	99.478	7.600	53.739	0.911	8.000	0.089	1.391	0.014
100.000	8.454	50.609	0.717	5.913	0.063	0.348	0.004	100.000	7.591	58.609	0.990	8.348	0.087	1.217	0.012
99.826	8.268	50.957	0.743	6.609	0.068	0.870	0.009	99.826	7.513	55.130	0.890	6.261	0.070	1.391	0.014
100.000	8.137	45.739	0.654	5.739	0.061	0.522	0.005	99.826	7.543	56.348	0.908	8.348	0.087	1.391	0.014
99.652	8.031	49.044	0.746	6.261	0.068	1.044	0.010	99.826	7.722	56.522	0.925	6.957	0.073	0.696	0.007
99.826	8.059	51.304	0.777	4.174	0.047	0.348	0.004	99.826	7.343	53.739	0.894	6.435	0.068	0.870	0.009
99.826	8.360	46.957	0.675	6.435	0.066	0.870	0.009	99.652	7.950	58.957	0.932	8.870	0.094	1.217	0.012
100.000	8.160	51.304	0.753	5.913	0.061	0.522	0.005	99.478	7.640	57.565	0.913	6.957	0.071	1.391	0.014
99.826	8.162	48.870	0.757	6.087	0.068	0.696	0.007	99.652	7.558	59.652	0.964	8.522	0.087	0.870	0.009
100.000	8.397	49.739	0.730	6.435	0.068	0.348	0.004	99.478	7.685	56.870	0.955	6.609	0.071	0.522	0.005
100.000	8.257	48.174	0.717	6.783	0.071	0.522	0.005	100.000	7.551	56.348	0.897	7.130	0.080	1.391	0.014
99.826	8.235	48.000	0.675	5.217	0.052	0.870	0.009	99.652	7.473	60.522	0.986	7.304	0.078	2.087	0.023
99.826	8.320	48.348	0.692	5.044	0.050	0.348	0.004	100.000	7.673	57.044	1.007	8.870	0.094	1.391	0.014
100.000	8.374	52.348	0.817	6.435	0.066	1.217	0.012	99.826	7.543	56.696	0.880	6.087	0.063	0.348	0.004
100.000	8.567	47.478	0.663	6.261	0.063	0.522	0.005	100.000	7.379	57.391	0.943	8.522	0.090	1.913	0.019
99.826	8.577	50.957	0.798	3.478	0.035	0.174	0.002	99.478	7.515	57.565	0.920	6.957	0.071	1.391	0.014
100.000	8.296	47.652	0.701	5.739	0.057	0.348	0.004	99.652	8.070	57.391	0.943	5.044	0.054	1.044	0.010
99.652	8.461	51.130	0.748	5.217	0.054	0.174	0.002	99.478	7.708	54.435	0.915	7.130	0.075	1.913	0.019
100.000	8.230	52.522	0.777	7.130	0.073	0.348	0.004	99.826	7.757	55.826	0.929	7.130	0.082	1.044	0.010
99.652	8.290	52.174	0.764	6.783	0.073	1.044	0.010	99.304	7.492	54.783	0.903	8.000	0.084	0.696	0.007
<b>99.870*</b>	<b>8.302</b>	<b>49.635</b>	<b>0.729</b>	<b>5.948</b>	<b>0.062</b>	<b>0.565</b>	<b>0.006</b>	<b>99.713</b>	<b>7.615</b>	<b>56.757</b>	<b>0.930</b>	<b>7.374</b>	<b>0.078</b>	<b>1.209</b>	<b>0.012</b>
<b>0.137**</b>	<b>0.151</b>	<b>1.957</b>	<b>0.046</b>	<b>0.952</b>	<b>0.010</b>	<b>0.319</b>	<b>0.003</b>	<b>0.213</b>	<b>0.173</b>	<b>1.842</b>	<b>0.035</b>	<b>1.033</b>	<b>0.011</b>	<b>0.460</b>	<b>0.005</b>

\* Media

\*\* Desviación estándar