



[REDACTED]

**FUNDACIÓN
PARA LA INNOVACION AGRARIA
AGROPECUARIAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN LA
PLATINA**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

UNIVERSIDAD DE KENTUCKY

PROYECTO

**IDENTIFICACION DE
MARCADORES GENETICOS DE
IMPORTANCIA ECONOMICA EN
CAMELIDOS**

INFORME FINAL (Version Corregida)

Abril 2000

**FUNDACIÓN
PARA LA INNOVACION AGRARIA
AGROPECUARIAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN LA
PLATINA**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

UNIVERSIDAD DE KENTUCKY

PROYECTO

**IDENTIFICACION DE
MARCADORES GENETICOS DE
IMPORTANCIA ECONOMICA EN
CAMELIDOS**

INFORME FINAL (Version Corregida)

Abril 2000

INDICE

	Página
Abreviaturas	1
Antecedentes Generales	3
Nombre del Proyecto	3
Código	3
Región	3
Fecha de aprobación	3
Entidades ejecutoras	3
Jefe del Proyecto	3
Costo total	3
Período ejecución	4
Resumen Ejecutivo	5
Título del Proyecto	5
Financiamiento	5
Instituciones ejecutoras	5
Personal participante	5
Localización del Proyecto	5
Objetivos generales y específicos	6
Principales resultados	7
Informe Final	10
Resumen de la Propuesta original	10
Objetivos Generales	10
Objetivos Especificos	10
Justificación	10
Beneficios del Proyecto	11
Resultados del Proyecto y área de aplicación	12
Capturas de animales silvestres	12
Vicuñas	12
Guanacos	17
Análisis molecular de CSA	24
Obtención de DNA genómico de CSA	24
Preparación de genoteca de CSA	25
Desarrollo de marcadores de microsatélites	28
Identificación de SSR polimórficos en Alpacas	35
Poblaciones y familias de animales	41
Análisis de familias de medios-hermanos usando SSR	41
Resultados de RAPD, AFLP y SCAR	45
RAPD	45
RAPD-SCAR	50
AFLP	51
Análisis Citogenético	55
Definición de la nomenclatura del patrón de bandas GTG para los pares cromosómicos 1 y 2.	55
Resultados Citogenético	56

Propuesta de un modelo sobre la presentación de polimorfismos cromosómicos en camélidos sudamericanos	63
Realización de hibridación in situ fluorescente (FISH)	63
Aspectos Metodológicos	67
Captura de animales silvestres	67
Técnica de muestreo y toma de datos	67
Vicuñas	68
Guanacos	70
Obtención de DNA de CSA	72
Desarrollo de microsátélites en CSA	73
Aplicación de RAPD y AFLP para estudios genéticos en CSA	78
Análisis citogenético.	86
Gastos programados y gastos ejecutados	91
Literatura Citada	92

ABREVIATURAS

µl	Microlitros
A	Adenina
AFLP	Polimorfismo del Largo de Fragmentos Amplificados por PCR
C	Citosina
CA	Dinucleótido de Citosina-Adenina
CEA	Centro de Ecología Aplicada
col	Colaboradores
CRI	Centro Regional de Investigación
CSA	Camélidos sudamericanos
csp	Cantidad suficiente para
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO 260	Absorbancia a 260 nanómetros
EcoRI	Enzima de restricción obtenida de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
FISH	Hibridización Fluorescente <i>In-Situ</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
g	Fuerza de gravedad
G	Guanosina
GTG	Secuencia de microsatélite de tres nucleótidos
HA	Alpacas de Hidango
IGF1	Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactósido
ISAG	International Society for Animal Genetics
KA	Alpacas de Kampenaike
KG	Guanacos de Kampenaike
KL	Llamas de Kampenaike
M	Molar (moles / litro)
m	Metros
mg	Miligramos
mM	Milimolar
MseI	Enzima de Restricción obtenida de <i>Micrococcus spp.</i>
n	Cantidad
ND	No determinado
nm	Nanómetros
p	Brazo pequeño de los cromosomas
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCI	Fenol:cloroformo:isoamil alcohol
PCR	Reacción de Polimerasa en Cadena
PIC	Índice de Contenido Polimórfico
q	Brazo largo de los cromosomas

IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA EN CAMELIDOS
Proyecto FIA 016/94

RAPD	Amplificación de Fragmentos de DNA de Secuencia Anónima
rpm	Revoluciones por minuto
SCAR	Fragmento Amplificado por PCR de Secuencia Conocida
SSC	Tampón de cloruro de sodio más citrato de sodio
SSR	Repeticiones de Secuencia Simple o microsátélites
T	Timidina
TE	Tampón Tris-EDTA
Tris	Acido hidroximetilaminometano
VOLP	Nombre genérico de microsátélites de <i>Lama pacos</i> obtenidos en este trabajo
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil

ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto

IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA EN CAMELIDOS

Código

El proyecto se inicio con el código 016-94, el que cambio posteriormente al código A94-0-P-016

Región

El proyecto se ha ejecutado principalmente en la Región Metropolitana. También se realizaron acciones en la I región (muestreo y captura de vicuñas), VI región (desarrollo de familias e implementación de un registro genealógico) y XII región (muestreo de alpacas y muestreo de guanacos).

Fecha de aprobación

17 de julio de 1996

Entidades Ejecutoras

Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Experimentales Hidango, y CRI- Kampenaike y La Platina, Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía
Universidad de Kentucky,

Jefes del Proyecto

Jorge García-Huidobro
Patricio Hinrichsen

Costo Total

A continuación se indican los aportes financieros para afrontar los costos del proyecto, y sus respectivos porcentajes.

INSTITUCIÓN	PAIS	MONTO	PORCENTAJE
Fundación para la Innovación Agraria	CHILE	117.643.560	34,96%
Instituto de Investigaciones agropecuarias	CHILE	91.463.706	27,18%
Pontificia Universidad Católica de Chile	CHILE	33.210.300	9,87%
Universidad de Kentucky	U.S.A.	94.181.700	27,99%
Total		336.499.266	100,00%

Periodo de ejecución

El Proyecto se comenzó a ejecutar en la fecha de aprobación hasta el 31 de Agosto de 1999, fecha en que se solicitó una prórroga hasta el 31 de octubre 1999 para la realización de un seminario internacional donde se mostraron los resultados obtenidos y las proyecciones de este trabajo

RESUMEN EJECUTIVO

Titulo del Proyecto

IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA EN CAMELIDOS

Financiamiento

El desarrollo de este proyecto ha sido posible gracias al aporte financiero de la FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA, organismo dependiente del MINISTERIO DE AGRICULTURA.

Instituciones ejecutoras

Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Experimentales Hidango, y CRI- Kampenaike y La Platina, Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Universidad de Kentucky

Personal Participante

En el proyecto trabajaron los siguientes profesionales pertenecientes al INIA - CRI La Platina e Hidango: Ing. Agr. Jorge García Huidobro, Bioq. Dr. Patricio Hinrichsen, Med. Vet. Rafael Mancilla, Bioq. Víctor Obreque (Alumno PhD U. de Chile) y Lic. Bioq. Geneviève Merabachvili (Alumna de Magister en Bioquímica de la P.U. Católica), y del CRI- Kampenaike, Med. Vet. Etel Latorre. De la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Chile, los profesores Srs. Fernando Bas y Cristian Bonacic (actualmente alumno de PhD en Oxford, UK) y el Ing. Agr. Sr. Benito González y la Med. Vet. Srta. Beatriz Zapata (alumna de Magister de la P.U. Católica); se contó con la colaboración permanente del Dr. Gus Cothran de la Universidad de Kentucky, quien actuó además como evaluador del avance del proyecto al inicio de la segunda etapa. La participación de María Angélica Alliende (INTA, U. de Chile) fue fundamental para la dirección del trabajo de Beatriz Zapata. Así también, la alumna de Bioquímica de la U. de Santiago, Srta. Paola Mandiola, colaboró en el estudio por SSR de las familias de alpacas y vicuñas. Finalmente, dos estudiantes de la U. Mayor trabajaron en sus tesis de Agronomía (Srs. Ureta y Aros), relacionadas a estudios de los factores que determinan grosor del pelo en alpacas y estudios zoomorfológicos en esta misma especie, respectivamente.

Localización del Proyecto

El proyecto se ha realizado fundamentalmente en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Experimental La Platina, en sus aspectos de identificación de DNA. Las muestras de animales para la identificación de marcadores en camélidos silvestres se obtuvieron en la I Región y XII Región. En la VI Región se han desarrollado los estudios fenotípicos y de familia para alpacas.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo General del Proyecto

Se postuló en este proyecto que como complemento a los análisis tradicionales de mejoramiento genético de diferentes tipos de ganado, que se han basado hasta el día de hoy en métodos científicos cuantitativos, se requería una mejor comprensión de la función y estructura de los genes individuales y de las familias de genes que son responsables de los parámetros de producción, reproducción y salud de las especies camélidos sudamericanos. En este sentido el desarrollo de cualquier marcador molecular de DNA, sería de gran utilidad para la construcción de un mapa genético en CSA.

1. En este proyecto se propuso como objetivo principal el desarrollar marcadores de microsatélites para la especie alpaca (*Lama pacos* L.). En este sentido el proyecto fue exitoso, puesto que se logró obtener un total de más de 50 *loci* de microsatélites, superando las inconveniencias técnicas de no contar con un secuenciador automático, lo que hubiese permitido obtener un número mayor de marcadores en un menor tiempo.
2. Además se propuso que la información que se pudiese obtener con estos microsatélites podría ser utilizadas en el futuro para responder una amplia gama de tópicos, que la tecnología tradicional ha resuelto parcialmente. Entre estos, se incluyen características genotípicas cualitativas y cuantitativas de interés productivo, características relacionadas con defectos congénitos, determinación de grados de hibridismo inter- e intra-especie, consanguinidad de los animales, e identificación de la diversidad genética dentro de cada especie de CSA y entre ellas.

Objetivos Específicos

1. Se creó una Biblioteca Genómica para alpaca con la cual fue posible seleccionar los microsatélites obtenidos en este proyecto
2. Se identificaron el tipo de microsatélites presentes en el genoma de alpaca, y se seleccionaron clones de esta genoteca que presentaban las señales más fuertes por hibridización tipo Southern.
3. Se secuenciaron los clones positivos para definir con precisión la estructura génica de los microsatélites aislados, y para dilucidar las regiones adyacentes a ellos.
4. Se diseñaron partidores de PCR que fueron capaces de amplificar regiones del genoma que contenían a los microsatélites, y se determinó aquellos que entregaban la mayor información sobre la base del nivel de polimorfismo detectado.
5. Se describió la variabilidad genética para una población de 30 a 50 alpacas.

6. Se describió la variabilidad genética (status sub-específico, pureza genética e historia evolutiva) de poblaciones cautivas y silvestres de CSA, incluyendo estudios de familia.
7. Se comenzó el desarrollo de un mapa de ligamiento de la especie alpaca, para lo cual se comenzó a definir familias de medios hermanos.
8. Se capacitó personal y el laboratorio de Biotecnología del INIA La Platina se ha establecido como un laboratorio de referencia para análisis genético de CSA en Chile.
9. La experiencia que se generó en este proyecto, así como el desarrollo y aplicación de estos marcadores de microsatélites altamente polimórficos, serán útiles para construir en el futuro un mapa genético para camélidos sudamericanos tan saturado como sea necesario. Además, permitirá introducir en el país una herramienta para apoyar el mejoramiento genético de diversas especies animales.

Principales resultados

- El laboratorio de Biotecnología de la Platina adquirió las capacidades y experiencia para constituirse en un centro de referencia para identificación genética animal.
- Se han identificado un número significativo de microsatélites con un alto grado de polimorfismo, para su uso en las cuatro especies de Camélidos Sudamericanos. La interacción con la Universidad de Kentucky permitió la secuenciación de clones positivos y las regiones adyacentes a ellos.
- Se han diseñado partidores de PCR que han permitido definir las relaciones de similitud genética entre las especies de camélidos sudamericanos. Para este mismo propósito se optimizó el uso de otras técnicas moleculares (RAPD y AFLP), y se inició el desarrollo de marcadores especie-específicas (SCAR).
- Se cuenta con un método que permite tener certeza para la identificación de padres.
- Se cuenta con la información sobre claras diferencias en el patrón de bandeo GTG entre algunos de los camélidos sudamericanos. Estas diferencias no habían sido reportadas previamente y podrían corresponder a varios factores causales, entre ellos están: (i) reordenamientos cromosómicos producidos durante la especiación y (ii) polimorfismos producidos por inversiones paracéntricas durante la evolución cariotípica
- Es posible que existan además reordenamientos cromosómicos aún no detectados, ya que una gran parte del cariotipo de los camélidos está constituido por cromosomas de tamaño pequeño y con patrones de bandas poco diferenciados.
- Se han generado ideograma cromosómico para guanaco, llama vicuña y alpaca

- Se cuenta con un idiotipo fenotípico de alpaca, sus mediciones zoométricas y sus relaciones.
- Se desarrolló y probó un protocolo de calificación y evaluación de animales para su incorporación al Registro Genealógico de Hidango.
- Se realizó un Seminario Internacional donde se dieron a conocer los resultados obtenidos en el proyecto.
- Además, se detectó un creciente interés a nivel nacional, regional andino e internacional por los trabajos relacionados con genética de CSA, vinculados a algunos de los tres aspectos mencionados más arriba (mapeo genómico, filiación genética o estudios poblacionales). Estos vínculos fueron revelados en contactos directos en reuniones científicas (como la reunión de ISAG, en Nueva Zelandia, Agosto de 1988) o divulgativas (como la patrocinada por FIA y SAG en Santiago, Noviembre de 1998, para presentar los resultados de diferentes estudios en CSA silvestres).
- Se logró la publicación de un artículo en *Animal Genetics*, revista de corriente principal, más otro en la misma revista en proceso de revisión. Así también, se publicó un artículo describiendo la aplicabilidad de los registros genealógicos y su reforzamiento con datos moleculares, así como un artículo de corte similar presentado en la *Revista de la Asociación de Criadores de Caballos Chilenos*. En relación con esto, se ha colaborado con otro proyecto FIA aportando la experiencia de algunos de los investigadores de este grupo de trabajo, para realizar la identificación de un núcleo de caballos chilotes que sea genéticamente representativo. En esto momentos el proyecto se encuentra en su fase de cierre ya que la fecha de término de acuerdo con el contrato es el 31 de julio de 1999, se están terminando con la identificación y utilización de los marcadores encontrados para definir la configuración genética de animales nacidos entre febrero, marzo, mayo y junio del presente año.

Proyecciones

- Los logros obtenidos en este proyecto con las distintas actividades realizadas a la fecha; y los grupos internacionales en esta área del conocimiento con quien el grupo de trabajo ha logrado establecer vínculos muy estrechos de colaboración mutua. Permite prever que la continuidad y consolidación de los resultados tienen una indudable aplicación no solo en los CSA sino que además serían aplicables a todas las especies animales.
- Este proyecto cuya aplicación no es inmediata, permite desarrollar bases tecnológicas sólidas para en amplios sectores que estén en la búsqueda de técnicas: para acelerar los procesos de mejoramiento genético, desarrollo de mapas de ligamiento con lo que se puede evitar la entrada de enfermedades congénitas y por último la identificación y manipulación de genes que podrían ser útiles para el genero humano, no en el futuro cercano sino que en el largo plazo.

- Considerando que uno de los objetivos era contar con un laboratorio de referencia (equipos y personal), debe mencionarse que a través un periodo adicional de este proyecto se podría incorpora un secuenciador de genes ya que se cuenta con la capacidad profesional para su aprovechamiento integro y por lo tanto aprovechar al máximo la inversión en capacitación que se logró. El término de las actividades consideradas en el Proyecto constituye una grave pérdida al patrimonio del conocimiento del país y limita el desarrollo de las técnicas genómicas vinculadas al sector pecuario del país, constituyendo por lo tanto una pérdida de valor incalculable.

INFORME FINAL

RESUMEN DE LA PROPUESTA ORIGINAL OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar marcadores de microsatélites para la especie alpaca (*Lama Pacos L.*). Para (i) Determinar las relaciones filogenéticas de poblaciones dentro de la especie, así como con las otras especies de CSA y (ii) Establecer las bases de un programa de mejoramiento genético asistido por estos marcadores. Contribuir a la comprensión de la función y estructura de los genes que son responsables de las variables productivas, reproductivas y salud de las especies camélidos sudamericanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Crear una biblioteca genómica para la alpaca
- Identificar el o los tipos de microsatélites presentes en el genoma de la alpaca, y seleccionar clones de esta genoteca que presenten las señales más fuertes por hibridación tipo Southern
- Secuenciar lo clones positivos para definir con precisión la estructura génica de los microsatélites aislados y para dilucidar las regiones adyacentes a ellos
- Diseñar partidores de PCR que sean capaces de amplificar regiones del genoma que contengan a los microsatélites
- Describir la variabilidad genética para una población de 30 a50 alpacas
- Describir la variabilidad genética de poblaciones cautivas y silvestres de CSA incluyendo estudios de familia
- Comenzar el desarrollo de un mapa de ligamiento de la especie alpaca
- Capacitar personal y establecer un laboratorio de análisis genético para CSA en Chile.

JUSTIFICACION

La cartografía genética de los animales domésticos constituye una herramienta de gran utilidad para identificar marcadores genéticos relacionados con características fenotípicas necesarios para la selección y mejoría de razas. Este estudio permitirá determinar la variabilidad genética que presentan los CSA y desarrollar una herramienta para genotipificación de individuos. Además esta técnica puede servir para la identificación genotípica de otras especies y razas.

BENEFICIOS DEL PROYECTO

- Desarrollar en el país una herramienta de identificación genotípica y apoyar el mejoramiento genético de diversas especies animales
- Establecer la variabilidad genética de la alpaca
- Proponer antecedentes genotípicos con relación a variables reproductivas
- Generar en el país la capacidad para el análisis y mapeo del genoma de los CSA

RESULTADOS DEL PROYECTO Y AREA DE APLICACIÓN

Los resultados se han ordenado en los siguientes capítulos: Captura de animales silvestres, Obtención de muestras de DNA, Desarrollo de marcadores de microsátelites y otros marcadores para estudios de diversidad genética, filiación y mapeo y estudios citogenéticas.

CAPTURA DE ANIMALES SILVESTRES VICUÑAS

Vicuñas I región

En los cuadros 1 y 2 se resumen la filiación de los animales capturados en 1997 y 1998 en el altiplano de la región de Tarapacá.

Cuadro 1. Inventario de animales muestreados en 1997 para estudio genético (Sector Surire, 19°L.S. 69° 30' L.W.).

Año	Crotal	Grupo	Sexo	Observaciones
1997	1, 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 13	Grupo de machos	Machos	Grupo de machos debería tener alta heterogeneidad genética.
	3, 4, 5, 7, 8	Familia	Hembras	Animal 7 correspondería al macho líder del grupo.
	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22	Grupo de machos	Machos	Grupo de machos debería tener alta heterogeneidad genética.
	23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	Grupo de machos	Machos	Grupo de machos debería tener alta heterogeneidad genética.
	31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	Grupo familiar	Hembras	Animal 35 correspondería al macho líder.
	39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46	Grupo de machos	Machos	Grupo de machos debería tener alta heterogeneidad genética.
	47, 48, 49, 50, 51, 52	Grupo de machos	Machos	Grupo de machos debería tener alta heterogeneidad genética.
	53, 54, 55, 56, 57, 58, 59	Grupo familiar	Hembras	Animales 53 y 55 corresponden a machos. Animal 55 es adulto.
	60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70	Grupo familiar	Hembras	Animales 65 y 70 son machos. Ambos son adultos, no está claro quién es el líder de grupo.
	75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87	Grupo mixto	Hembras y machos	Se mezclan dos grupos.
	89, 90	Crías		Se deben confrontar con grupo del 75-87 para identificar padres.
	71, 72, 73, 74	Crías		Se deben confrontar con grupo del 60-70 para identificar padres

Fuente: C. Bonacic (Ph D Dissertation in prep). Sustainable use of the vicuña in Chile: An ecological and physiological assessment. University of Oxford, UK.

En 1997 se capturó un total de 74 vicuñas en tres jornadas de trabajo.

Cuadro 2. Inventario de animales muestreados en 1998 para estudio genético (Sector Surire, 19°L.S. 69° 30' L.W.).

Año	Crotal	Grupo	Sexo	Observaciones
1998	1, 2, 3, 4, 5, 107, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19,	Grupo Mixto	Machos y hembras	Se mezcló un grupo familiar con uno de machos solteros. 7, 8, 9, 11, 13 son machos adultos. 10, 14, 15 son crías de menos de un año de edad.
	20, 21, 22, 23, 24, Am33, 25, 26, 27	Grupo Familiar	Machos y hembras	Macho del grupo escapa. 21, 22, 23, 24, son crías de menos de 1 año de edad. Am33 se ha recapturado
	28, 29, 30, 31, 32, 33	Grupo Familiar	Machos y hembras	28 es el macho líder. No hay crías.
	116, 34, 35, 121, 36, 37	Grupo Familiar	Machos y hembras	37 es el macho líder. 35 y 34 son crías. 116, 121 se han recapturado
	134, 38, Am18, 136, 39, 140, 40, 41, 42,	Grupo Mixto	Machos y hembras	Se mezcló un grupo familiar con uno de machos solteros. 134, Am18, 39 son machos adultos. 40 y 41 son crías de menos de un año de edad. 134, Am18, 136, 140 se han recapturado
	43, 44, 52, 53, 109, 127, 112	Grupo de Machos	Machos	109, 112 y 127 se han recapturado.
	45, 46, 47	Grupo Familiar	Machos y hembras	El macho escapa a la captura. 47 es una cría de menos de un año de edad.
	48, 49, 50, 51	Grupo Familiar	Machos y hembras	El macho escapa a la captura. 49 es una cría de menos de un año de edad.
	54		Hembra	Cría. se desconoce su grupo familiar.
	Am10, 55, 56, 58, 59, Am24, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66	Grupo de Machos	Machos	Am10 y Am24 se han recapturado.
	67, 68, 69, 70, 71, 72	Grupo Familiar	Machos y Hembras	Macho líder escapa a la captura. 68 y 69 son crías de menos de un año de edad.
	74, 159, 158, 75, 76	Grupo de Machos	Machos	158 y 159 se recapturaron.
	77, 78, 79, 80, Am43, 81, 82	Grupo Familiar	Machos y Hembras	Am43 es el macho líder. 77 es cría de menos de un año de edad.

Fuente: C. Bonacic (Ph D Dissertation in prep). Sustainable use of the vicuña in Chile: An ecological and physiological assessment. University of Oxford, UK.

En 1998, durante tres jornadas de captura (19, 20 y 21 de octubre) se captura un total de 95 vicuñas, de las cuales 15 individuos ya habían sido capturados en períodos anteriores (1997). A continuación se entregan algunos resultados de las medidas corporales de vicuñas capturadas en el altiplano de la I región.

Cuadro 3. Medidas corporales de vicuñas muestreadas en 1998 por edad.

Variable	Edad	n	Media ± DS	Rango
Peso (kg)	<1	16	17.6 ± 1.9	14 - 20
	1	7	22.6 ± 4.4	17 - 29
	2	23	29.6 ± 4.9	21 - 42
	3	15	33.4 ± 4.6	25 - 43
	4	14	36.5 ± 4.9	29 - 46
	5	14	39.9 ± 4.3	29 - 45
	6	4	41.3 ± 5.0	34 - 45
Circunferencia Torácica (cm)	<1	17	66.5 ± 7.3	43 - 77
	1	6	78.2 ± 7.0	66 - 85
	2	23	81.4 ± 8.4	59 - 96
	3	14	84.8 ± 10.2	63 - 99
	4	14	89.7 ± 9.4	62 - 101
	5	13	89.1 ± 6.7	79 - 98
	6	4	89.9 ± 6.4	83 - 98

Fuente: C. Bonacic (Ph D Dissertation in prep). Sustainable use of the vicuna in Chile: An ecological and physiological assessment. University of Oxford, UK.

Tanto la caracterización de medidas corporales por sexo y por edad permitirán establecer las variables fenotípicas de los animales muestrados y su correspondiente correlación con los datos productivos tales como peso del vellón, finura y largo de mecha. Los datos de medidas corporales, a su vez, podrían ser utilizados en los estudios genéticos como variables fenotípicas asociadas a los patrones genéticos a determinar.

En el anexo 1 se entregan más antecedentes con relación a variables de medidas corporales. Se intentó la captura de vicuñas mediante el uso de rifle hipodérmico en el sector de Cauquenes en junio de 1999, sin embargo no se logró el objetivo debido a los siguientes factores:

- Gran distancia de vicuñas al tirador.
- Problemas climáticos, especialmente el viento que desviaba los dardos.
- Dosis del sedante en baja concentración, pese a usar dosis que logró inmovilizar guanacos en la misma región.
- El acercamiento en vehículos tuvo resultados variables, debido principalmente a la reactividad de los grupos y a que se encuentran fuera del Parque Nacional Lauca, donde los animales aceptan el acercamiento gracias a la protección dada por CONAF.
- El acercamiento a los grupos familiares se dificultó por la conducta de vigilancia del macho líder y de hembras que apoyaban esta actividad. No obstante se logró el dardeo de 2 ejemplares machos sin resultados positivos.

Vicuñas II región

Se hizo un muestreo de un total de 4 ejemplares mantenidos en cautiverio. Todos ellos provenían de captura de crías de pocas semanas de edad y eran mantenidos en cautiverio en espacios reducidos, a excepción de un ejemplar en la municipalidad de Ollagüe, el que compartía un corral con un rebaño de llamas.

Los ejemplares correspondientes a esta subespecie fenotípicamente se diferencian de la existente en la I región por su mayor tamaño, por la carencia de fibras largas en el pecho, y porque el área blanca de vientre alcanza hasta la mitad del los flancos (Norambuena, 1992).

A continuación se resumen los resultados de medidas corporales, variables hematológicas, de perfil bioquímico y de características lanimétricas de vicuñas en la II región.

Cuadro 4. Parámetros estudiados según grupo de edad en vicuñas de la II región mantenidas en cautiverio.

Variable	Subadultos	Adulto
Edad	3 años	15 años
N	3	1
Peso	41,3 ± 6,03	36,5
Perímetro Torácico	80,0 ± 12,29	90
Hemograma parcial		
VGA (%)	39,6 ± 4,51	52,00
Recuento total Leucocitos (n/ul)	13.925 ± 2.792	10.420
Baciliformes (n/ul)	150	
Neutrófilos segmentados (n/ul)	7.556 ± 2.957	6.877
Linfocitos (n/ul)	5.698 ± 495	2.605
Monocitos (n/ul)	417 ± 84	938
Eosinófilos (n/ul)	451	
Otros tipos de leucocitos (n/ul)	0	0
Neutrófilos/Linfocitos	1,38 ± 0,6	2,6
Perfil bioquímico		
NUS (mg/dl)	34,3 ± 6,6	31
Creatinina (mg/dl)	1,5 ± 0,1	1,6
GPT (u/l)	9,0 ± 2,0	18
GGT (u/l)	2,3 ± 1,5	5
Fosfatasa alcalina (u/l)	65,6 ± 7,5	32
Bilirrubina total (mg/dl)	0,30 ± 0,06	0,33
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,06 ± 0,01	0,05
Glicemia (mg/dl)	110,0 ± 14,0	129
Lanimetría		
Diámetro (µm)	14,0 ± 0,3	19,8
Longitud de fibra (mm)	49,1 ± 17,8	36,1
Longitud de pelo (mm)	69,3 ± 37,9	61,8
Medulación (%)	0,3 ± 0,5	34,00
Continua (%)	0,0	11,20
Discontinua (%)	0,0	11,20
Fragmentada (%)	0,2 ± 0,4	11,80
Pelo (%)	0,6 ± 0,6	1,30

Clinicamente los animales se encuentran sanos, observándose valores hematológicos y perfil bioquímico dentro de los rangos reportados por otros autores (Fowler, 1989). Los valores obtenidos indican que los animales se encuentran en buen estado de salud.

Productivamente, la fibra de las vicuñas correspondientes a la categoría de edad de subadultas se encuentra bajo los rangos determinados para especímenes de *V. v. mensalis*. No obstante se observa que la finura es afectada por el aumento en la edad, lo cual ha sido encontrado en otros estudios y en las especies de Camélidos domésticos. Lo anterior afecta al individuo macho de la categoría adulto, el cual posee alrededor de 15 años de edad.

Vicuñas III región

Las vicuñas correspondientes a esta región son fenotípicamente iguales a los ejemplares de la II región. El híbrido que fue muestreado poseía el fenotipo de *V. v. vicugna*.

A continuación se resumen los resultados de medidas corporales, variables hematológicas, de perfil bioquímico y de características lanimétricas de vicuñas de la III región, los cuales se encuentran en el Zoológico de Quilpué, V región.

Cuadro 5. Parámetros estudiados según grupo de edad en vicuñas de la III región mantenidas en cautiverio.

Variable	<i>V. v. vicugna</i>	<i>V. v. vicugna x V. v. mensalis</i>
Edad	5 años (adulto)	2 años (juvenil)
N	2	1
Peso (kg)	46 - 56	43
Perímetro Torácico (cm)	88 - 100	86
Hemograma parcial		
VGA (%)	38,5 ± 6,3	40
Recuento total Leucocitos (n/μl)	6.900 ± 848	10.750
Neutrófilos segmentados (n/μl)	3.799 ± 1.096	4.085
Linfocitos (n/μl)	2.403 ± 101	4.738
Monocitos (n/μl)	358 ± 294	860
Eosinofilos (n/μl)	189	537
Basiliformes (n/μl)	244 ± 78	537
Otros tipos de leucocitos (n/μl)	0	0
Neutrófilos/Linfocitos	1,58	0,86
Perfil bioquímico		
NUS (mg/dl)	31,5 ± 9,2	29
Creatinina	1,3 ± 0,1	1,6
GPT (u/l)	13,0 ± 2,8	10
GGT (u/l)	7,0 ± 4,2	9
Fosfatasa alcalina (u/l)	69,5 ± 19,0	74
Bilirrubina total (mg/dl)	0,29 ± 0,04	0,28
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,05 ± 0,00	0,06
Proteínas plasmáticas (g/dl)	6,4	-
Fibrinógeno (mg/dl)	600	-
Glicemia (mg/dl)	124,0 ± 33,9	121
Lanimetría		
Diámetro (μm)	14,5 ± 1,2	13,3
Longitud de fibra (mm)	57 ± 7	62,3
Longitud de pelo (mm)	79 ± 14	86,2
Medulación (%)	19,0 ± 2,8	6

Variable	<i>V. v. vicugna</i>	<i>V. v. vicugna x</i> <i>V. v. mensalis</i>
Continua (%)	9,4 ± 4,5	2
Discontinua (%)	3,1 ± 2,4	4,1
Fragmentada (%)	6,2 ± 4,8	0
Pelo (%)	0,0 ± 0,0	0

Las características observadas no difieren de aquellas de ejemplares de la II región. Cabe destacar que el ejemplar híbrido posee una conformación similar a la subespecie de vicuña argentina.

GUANACOS

Guanacos I región

Se capturó un total de 3 guanacos silvestres en los alrededores de Putre. Todos ellos correspondían a ejemplares machos adultos de grupos de machos solteros. Fenotípicamente son similares a los animales de la subespecie *guanicoe*, diferenciándose por una menor superficie de fibra clara en el vientre.

La captura se realizó en tres jornadas, con una efectividad de disparo del 40% (animal dardeado/número de disparos) y una eficiencia de sedación del 50% (animales sedados/animales dardeados). Esta diferencia se debe principalmente a que hubo animales en que el dardo no perforó la piel o llegó a la zona costal, área de baja absorción y por lo tanto de baja efectividad.

La baja eficiencia de aciertos se debe a:

- Las condiciones climáticas, especialmente el viento, que desviaban los dardos.
- La distancia de acercamiento, ya que a mayor distancia las probabilidades de acierto disminuyen.
- La estimación de la distancia *in viso*.

No hubo dificultades con el manejo de los rifles, dardos o de las dosis de Xilazina (7 mg/kg. PV) y Tiletamina Zolazepam (5 mg/Kg PV), siendo recomendados para otros estudios de captura de guanacos.

El animal sedado con Tiletamina Zolazepam fue dardeado en el cuello, el efecto se hizo notar a los 6 minutos para luego hacer caer al animal a los 8 minutos. El animal estuvo inmóvil aproximadamente 44 minutos, para luego entrar en etapa de recuperación.

Los animales sedados con Xilazina fueron dardeados en la pierna al nivel de la tibia y su efecto comenzó a los 5 minutos, para hacer caer al animal a los 10 minutos. La caída del animal no es inmediata y queda reactivo al medio. Esta situación hizo necesaria la administración de Xilazina intravenosa en dosis de 1 mg/kg. El animal permanece inmóvil aproximadamente 30 minutos, para luego entrar en etapa de recuperación.

A continuación se resumen los resultados de medidas corporales, de perfil bioquímico y de características lanimétricas de los guanacos muestreados en la I región.

Cuadro 6. Parámetros estudiados en guanaco perteneciente a poblaciones precordilleranas de la I región.

Variable	Adultos
Edad	> 3 años
N	3
Perímetro Torácico (cm)	114 ± 5,3
Rango de peso estimado* (kg)	86 - 113
Perfil bioquímico	
NUS (mg/dl)	19,1 ± 5,4
A. Urico (mg/dl)	3,7 ± 0,5
Colesterol (mg/dl)	22,7 ± 19,4
Triglicéridos (mg/dl)	40,0 ± 6,9
AST o GOT (u/l)	141,0 ± 10,4
Fosfatasa alcalina (u/l)	46,0 ± 9,1
Bilirrubina total (mg/dl)	0,37 ± 0,31
Proteínas plasmáticas (g/dl)	7,2 ± 0,2
Albumina (g/dl)	4,0 ± 0,1
CPK (U/l)	52,6 ± 11,2
P inorgánico (mg/dl)	5,7 ± 0,5
Ca (mg/dl)	6,6 ± 0,5
Glicemia	
Lanimetría	
Diámetro (µm)	17,1 ± 1,2
Longitud de fibra (mm)	37 ± 7
Longitud de pelo (mm)	67 ± 11
Medulación (%)	32 ± 26
Continua (%)	11 ± 6
Discontinua (%)	12 ± 11
Fragmentada (%)	10 ± 10
Pelo (%)	2 ± 1

*Bas *et al.*, 1999. Peso (kg) = $5,69 * 10^{-3} * [\text{perímetro torácico (cm)}]^{3,04}$ para *L. g. guanicoe* en cautiverio.

El perímetro torácico, el tamaño y la apariencia, indicarían que los animales capturados estaban cerca o sobre los 100 kg. de peso. La estimación de peso de una ejemplar capturada el año anterior por CONAF, fue de 120 Kg.

Tanto el largo como el diámetro de fibra fina se encuentra dentro del rango descrito para la especie. La alta proporción de fibras meduladas indicarían que los ejemplares se encontraban en edad adulta, lo cual fue corroborado por el desgaste dentario de uno de los individuos.

En este caso de guanacos adultos capturados en la I región, con dardos anestésicos, los valores de perfil bioquímico fueron similares a los reportados para la subespecie *L. g. guanicoe* en cautiverio (Bas *et al.* 1999) y la llama (Fowler, 1989), ya que esta es la especie domestica mas cercana (Palma, 1999) de la cual se cuenta información. Se puede concluir que los animales estaban en buen estado de salud y nutrición.

Guanaco II región

El animal muestreado corresponde a una cría de 9 meses de edad proveniente de poblaciones costeras de la región de Antofagasta. Fenotípicamente difiere de la subespecie *guanicoe* por su apariencia más fina, especialmente al nivel de patas y cráneo, mayor tamaño de orejas y una menor extensión del pelaje claro en el vientre. A continuación se resumen los resultados morfométricos, hematológicos, de perfil bioquímico y de características lanimétricas de la cría de guanaco mantenido en cautiverio en la II región.

Cuadro 7. Parámetros estudiados en la cría de guanaco de la II región.

Variable	Resultado
Identificación	
Edad	9 meses
Sexo	Hembra
Peso (kg)	32
Perímetro Torácico (cm)	74
Hemograma parcial	
VGA (%)	44
Recuento total Leucocitos (n/μl)	13.175
Baciliformes (n/μl)	2.635
Neutrófilos segmentados (n/μl)	5.797
Linfocitos (n/μl)	5.138
Monocitos (n/μl)	1.318
Eosinófilos (n/μl)	658
Otros tipos de leucocitos (n/μl)	0
Relación Neutrófilos/Linfocitos	1,13
Perfil bioquímico	
NUS (mg/dl)	21
Creatinina (mg/dl)	0,9
GPT (u/l)	20
GGT (u/l)	6
Fosfatasa alcalina (u/l)	58
Bilirrubina total (mg/dl)	0,28
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,04
Glicemia (mg/dl)	107
Lanimetría	
Diámetro (μm)	14,6 ± 2,2
Longitud de fibra (mm)	50,2 ± 6,1
Longitud de pelo (mm)	61,1 ± 13,9
Medulación (%)	30,0
Continua (%)	17,2
Discontinua (%)	12,4
Fragmentada (%)	9,7
Pelo (%)	4,0

No existen valores de referencias para la población del cual proviene el guanaco, por lo que se extrapola de la experiencia y estudios llevados a cabo por la Pontificia universidad Católica de Chile en guanacos en cautiverio provenientes de Tierra del Fuego, XII región (Bas *et al.*, 1999)

Clinicamente la ejemplar se encuentra en buenas condiciones, sin un aparente estrés psíquico por el cautiverio. Al comparar los valores de las variables hematológicas y de perfil bioquímico de la cría de guanaco proveniente de la II región, con los valores registrados para crías mantenidas en cautiverio en la Zona Central (Bas *et al.*, 1999), estos se encontraban dentro del rango observado, lo que sugiere un buen estado de salud del animal.

En relación con los resultados lanimétricos, se observa un diámetro menor en el individuo de *L. g. huanacus* en relación con *L. g. guanicoe* para edades similares. Esta diferencia se hace también notoria en las fibras finas con medulación fragmentada, siendo mayor en el ejemplar de la región de Antofagasta. Cabe destacar que las crías poseen un menor diámetro y una mayor longitud de fibra que animales de mayor edad (Bas *et al.*, 1995). En relación con el largo de fibra se observan valores similares, no así en el largo del pelo, el cual es menor al registrado en la subespecie sureña. El mercado de fibras finas para camélidos silvestres exige un diámetro inferior a 17 μm y un largo superior a 32 mm para el proceso de hilado (Bas, 1997).

Guanacos III región

Este grupo muestreado en cautiverio correspondió a guanacos de dos poblaciones diferentes provenientes de distintas zonas de la región. Tres ejemplares pertenecían al ecotipo de la costa: un macho de 3 años, una hembra y una cría. El resto de los guanacos correspondían a un ecotipo cordillerano, ocho de los cuales nacieron en cautiverio a partir de una pareja de sobre 15 años de edad que aun permanecían en el grupo. No obstante la literatura indica que la población regional de guanacos pertenecen a una sola subespecie (*L. g. huanacus*).

Fenotípicamente los tres ejemplares provenientes de poblaciones costeras son similares en apariencia a la ejemplar de la II región. No se observa la misma notoriedad en ejemplares provenientes de la cordillera.

A continuación se entregan las variables correspondientes a zoometría, perfil bioquímico y características de la fibra de guanacos provenientes de la III región.

Cuadro 8. Parámetros estudiados según grupo de edad en guanacos mantenidos en cautiverio en la III región.

Variable	Crías	Juveniles	Subadultos	Adultos
Edad	0 - 1 año	1 - 2 años	2 - 3 años	> 15 años
N	2	3	6	2
Perímetro Torácico (cm)	80,5 ± 0,7	95 ± 2,8	102 ± 2,1	110 ± 4,2
Peso promedio estimado* (kg)	35	59	73	91
Hemograma parcial				
VGA (%)	47 ± 1,4	45,7 ± 3,5	42,5 ± 3,4	36,5 ± 2,1
Recuento total Leucocitos (n/μl)	4.850 ± 1060	16.516 ± 2.838	10.254 ± 4.117	9.175 ± 3.429
Baciliformes (n/μl)		403 ± 234	494 ± 391	251 ± 27
Neutrófilos segmentados (n/μl)	9.882 ± 11.203	4.370 ± 425	3.190 ± 1.800	4.037 ± 1.509
Linfocitos (n/μl)	2.837 ± 1.055	11.339 ± 2.964	6.013 ± 2.797	4.452 ± 1.905
Monocitos (n/μl)	130 ± 105	2.481 ± 3.848	265 ± 72	435 ± 42
Neutrófilos/Linfocitos	0,71 ± 0,22	0,4 ± 0,1	0,67 ± 0,34	0,92 ± 0,05
Perfil bioquímico				
NUS (mg/dl)	30,5 ± 3,5	31,5 ± 13,4	23,8 ± 8	31,5 ± 3,5
Creatinina (mg/dl)	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,0
GPT (u/d)	8,0 ± 7,1	14 ± 11,3	5,5 ± 2,8	7,5 ± 0,7
GGT (u/l)	2,5 ± 0,7	4 ± 2,8	1,7 ± 1,2	3,5 ± 3,5
Fosfatasa alcalina (u/l)	44,5 ± 24,7	49 ± 5,7	33,2 ± 14,1	31 ± 4,2
Bilirrubina total (mg/dl)	0,32 ± 0,08	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,29 ± 0,02
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00
Proteínas plasmáticas (g/dl)	6,7 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,9	6,8 ± 0,6
Fibrinógeno (mg/dl)	50 ± 0,0	200 ± 0	108 ± 142	125 ± 106
CPK (u/l)	41,0 ± 14,1	18 ± 4,2	36,3 ± 25,4	24 ± 7,1
Glicemia (mg/dl)	84,5 ± 17,7	68 ± 7,1	75 ± 9	62,5 ± 2,1
Lanimetría				
Diámetro (μm)	16,2 ± 1	16,1 ± 1	16,8 ± 1	20,2 ± 1,9
Longitud de fibra (cm)	5,0 ± 0,0	4,5 ± 0,4	4,5 ± 0,8	4,5 ± 0,8
Longitud de pelo (cm)	7,4 ± 1,5	8,6 ± 1,5	8,7 ± 2,6	10,0 ± 3,5
Medulación (%)	20,5 ± 13,4	7,1 ± 7,1	8,2 ± 6,6	34,5 ± 6,4
Continua (%)	4,3 ± 4,2	3,3 ± 2,7	4,8 ± 4,3	14,5 ± 3,8
Discontinua (%)	2 ± 0	2 ± 2,3	2 ± 1,9	10,5 ± 2,7
Fragmentada (%)	0,7 ± 0,9	2 ± 2,4	1,5 ± 1,3	9,5 ± 0,4
Pelo (%)	1,6 ± 2,3	1,1 ± 0,3	2 ± 1,6	3 ± 1,5

*Bas *et al.*, 1999. Peso (kg) = $5,69 * 10^{-3} * [\text{perímetro torácico (cm)}]^{3,04}$ para *L. g. guanicoe* en cautiverio.

Las crías muestreadas tenían alrededor de 8 meses de edad en el momento de la visita. El peso es inferior al registrado en *L. g. guanicoe* en cautiverio (Bas *et al.*, 1999), lo cual podría deberse a las condiciones de crianza. El largo de fibra es mayor al de las otras categorías de edad, lo cual se observa también en la subespecie de la patagonia.

Los valores encontrados tanto en las variables hematológicas como en las de perfil bioquímico se encuentran dentro de rangos reportados en estudios previos realizados en guanacos mantenidos en cautiverio en la zona central (Bas *et al.*, 1999). Para el caso de los guanacos adultos no se cuenta con una base de datos local de referencia. Sin embargo al comparar los valores encontrados con los reportados por Fraser y Moorby (1998) para proteínas plasmáticas y por

Hawkey y Gulland (1988) para variables hematológicas, se encontró que los valores obtenidos para los animales muestreados en el estudio estaban dentro del rango reportado, lo cual indica que los animales se encontraban en buen estado de salud y nutrición.

El diámetro de fibra es similar entre las tres primeras categorías de edad (crias, juveniles, subadultos), sin embargo para la categoría adultos el diámetro aumenta a valores sobre 20 μm , lo cual se debe al efecto de la edad sobre este parámetro, ya que ambos ejemplares poseían sobre 15 años.

Guanacos IV región

No se logró la captura de guanacos debido a las siguientes razones:

- Distancia de acercamiento de los guanacos a los escondites fuera del alcance de los rifles.
- Problemas climáticos, especialmente el viento que desviaba los dardos.
- Dosis del sedante en baja concentración. Se logró dardear a 2 guanacos pero el sedante no hizo el efecto deseado.
- Problemas con uno de los rifles de largo alcance.

La persecución en vehículo tuvo resultados positivos en un comienzo en relación con la distancia de acercamiento, específicamente ante guanacos machos solitarios. Pero la alta frecuencia en el uso de esta técnica provocó una mayor distancia de huida de los animales en el tiempo.

El acercamiento a los grupos familiares se dificultó por la conducta de vigilancia del macho líder y de hembras que apoyaban esta actividad.

Guanacos XII región

Información referente al grupo de guanacos procedentes de Tierra del Fuego, XII región, puede ser encontrada en el Informe Final Proyecto PUC – FIA N° 056/94 “*Estudio de la adaptación y manejo en semicautiverio del guanaco en la zona central*”.

CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE CAPTURA DE CSA SILVESTRES

Se logró el muestreo de vicuñas y guanacos pertenecientes a todas las subespecies presentes en Chile: *Lama guanicoe cacsilensis*, *Lama guanicoe huanacus*, *Lama guanicoe guanicoe*, *Vicugna vicugna mensalis* y *Vicugna vicugna vicugna*, algunos de cuyas poblaciones nunca se había tenido acceso para estudios relacionados a este informe.

La metodología utilizada en la captura de Camélidos silvestres fue adecuada, sin embargo persisten problemas de tipo puntuales con relación a variables técnicas, especialmente en la captura con rifle y dardos.

Los parámetros de tipo hematológicos, de perfil bioquímico, de zoometría y de características lanimétricas, se encuentran dentro de los rangos descritos para las especies en cuestión. No

obstante, debido a que algunas variables provienen de animales en cautiverio, lo cual unido a una baja cantidad de animales muestreados, no es posible determinar tendencias claras por subespecie, requiriendo más información en el futuro para este tipo de análisis.

El contexto biométrico, fisiológico, lanimétrico y sanitario obtenido para cada subespecie constituyen algunas de las bases sobre la cual se basan los análisis genético moleculares. Esta información en conjunto con los resultados genéticos constituye el primer estudio que tipifica la variabilidad genética de este recurso animal.

El trabajo realizado por la Pontificia Universidad Católica y la Unidad de Conservación de Vida Silvestre de la Universidad de Oxford ha sido posible gracias al apoyo de otras Instituciones y personas tales como el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Sr. Jorge García-Huidobro, Sr. Patricio Hinrichsen y su equipo), Universidad de Oxford (Dr. David Mac Donald), la Fundación para la Innovación Agraria (Sr. Ignacio Briones A.), la Corporación Nacional Forestal (Dr. José Luis Galáz, Sr. Alberto Bordeau, Sr. Benjamín Cornejo, Sr. Claudio Cunazza), Servicio Agrícola y Ganadero (Dr. Charif Tala, Sr. Agustín Iriarte, Sr. Oscar Camacho, Sr. Hibert Martínez, Sr. Luis Cofré, Sr. José Andaur, Sr. Carlos González, Sr. Santiago Sandoval), Care for The Wild International (Ms. Lindsey Gillson y Dr. William Jordan), Macauley Land Use Research (Mr. Jerry Laker, Ms. Hillary Redden), University Federation for Animal Welfare (Dr. J. Kirkwood), Quiborax Salar de Surire, The British Council, el Zoológico de Quilpué (Sr. Juan Cádiz, Dr. Luis Carrasco, al personal), a particulares (Sra. Soza, Humberto Urgandarín, Juana Ayvire, Raúl Apei, y otros), y a la I.M de Ollagüe.

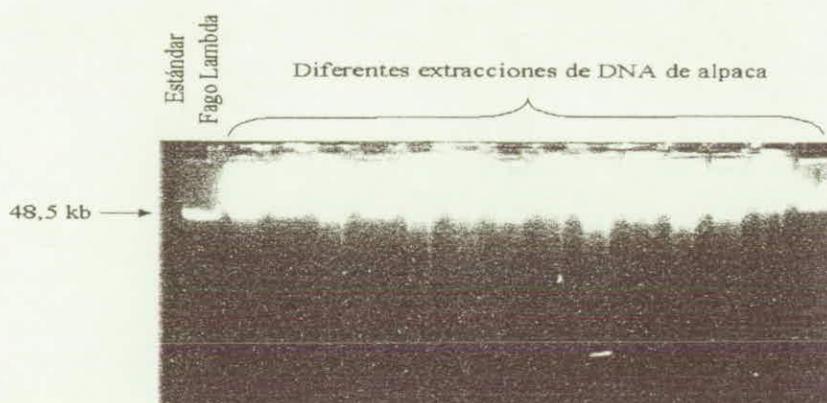
El equipo de trabajo está compuesto por Fernando Bas, Cristian Bonacic, Beatriz Zapata, Benito González, Pía Bustos, Eleny Montero y Doris Prehn.

ANÁLISIS MOLECULAR DE CSA

Obtención de DNA genómico de CSA.

Se obtuvo un buen rendimiento en cada una de las purificaciones de DNA, observándose en general que el estado de integridad de cada una de las muestras de DNA obtenidos cumplía los requisitos mínimos exigido en cuanto a integridad y pureza. En la Figura 1 se puede observar 14 muestras distintas de DNA de alpaca, nótese que el tamaño del DNA obtenido presenta todos valores superiores a 48.5 kb.

Figura 1. Gel de agarosa al 1% que muestra los DNA de 14 muestras de alpaca, obtenidas como se describió en la metodología. El primer carril consiste en el estándar usado, fago Lambda sin digerir.

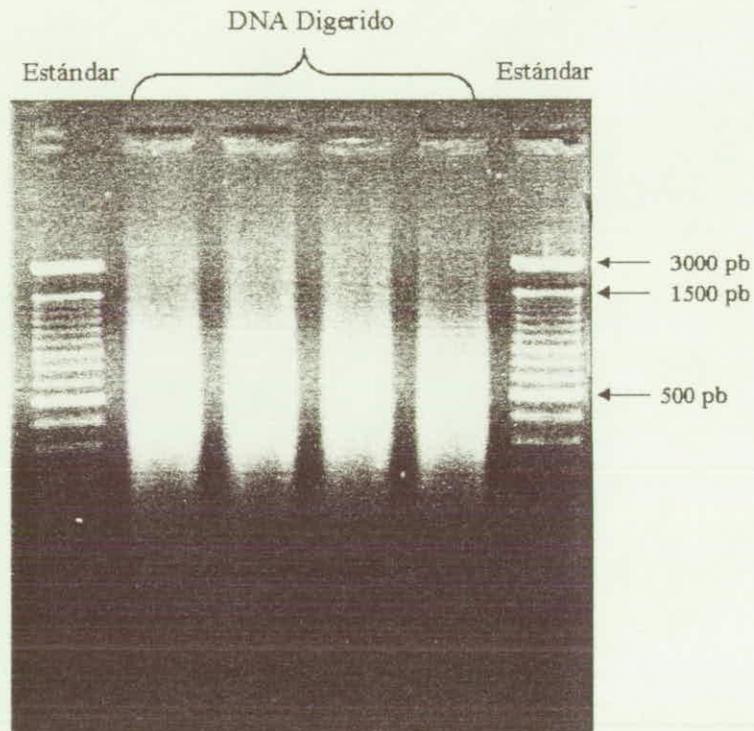


Otros métodos utilizados para la purificación de DNA fueron menos exitosos, especialmente cuando se usaron otras sales en el tampón de lisis de eritrocitos, diferentes al cloruro de amonio. Cabe mencionar que el DNA extraído se mantuvo intacto por largos periodos de almacenamiento, lo cual resultó ser muy conveniente puesto que todas estas preparaciones de DNA fueron utilizadas posteriormente para estimar los índices de polimorfismo de los partidores diseñados para amplificar los diferentes *loci* de microsatélites desarrollados.

Preparación de genotecas de CSA

La primera etapa en la preparación de una genoteca parcial de DNA de alpaca fue la digestión del DNA genómico con las enzimas de restricción elegidas (BglII y BclII). La adecuada digestión del DNA fue analizada separando los fragmentos generados en electroforesis de agarosa. Como se muestra en la Figura 2, el DNA genómico se observó como un conjunto de bandas ("chorreado" de DNA).

Figura 2. Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.4%, en el que se muestra la digestión del DNA genómico con BglII y BclII. Dos estándares se muestran en los carriles extremos.



También se puede apreciar en la Figura 2 que la digestión del DNA genómico resultó ser óptima con un bandeo que va desde los 100 pb hasta más de 3.000 pb. En la figura se indica especialmente el tamaño de 500 pb, zona en la cual consideramos nosotros como tamaño promedio óptimo para ser clonado, en base a la facilidad de secuenciar dichos tamaños sin la necesidad de subclonamientos.

Figura 3. Gel de agarosa al 1.0%, donde se muestra los fragmentos entre 500-700 pb obtenido desde un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

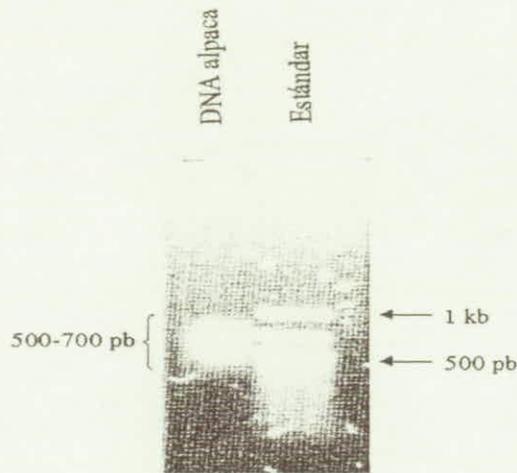
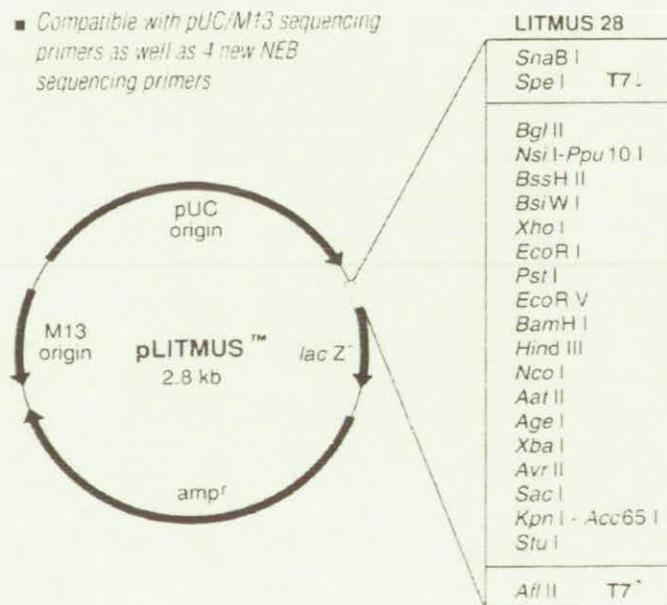
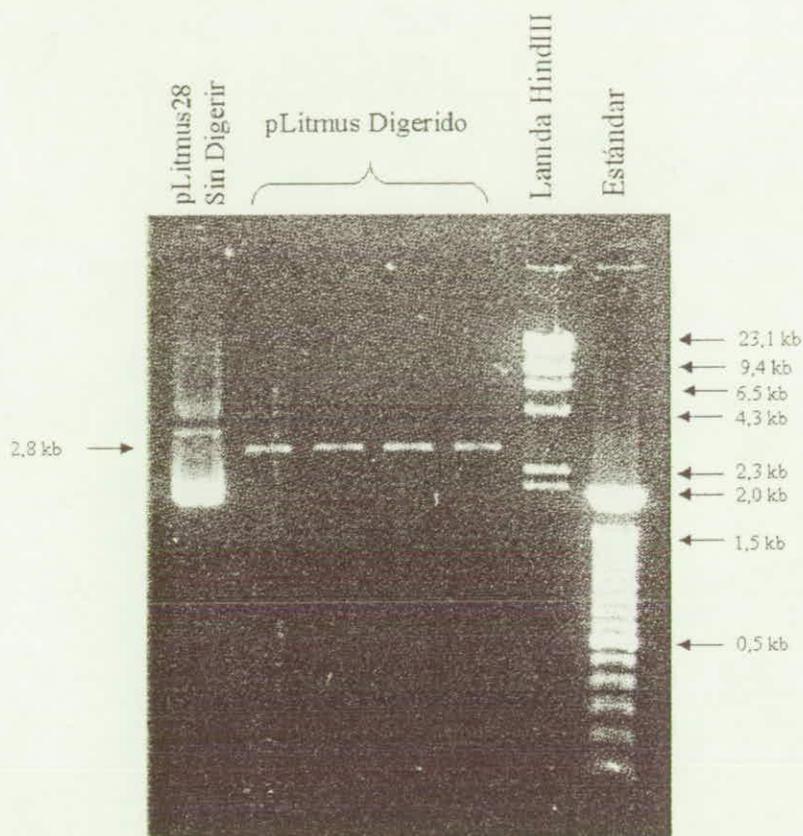


Figura 4. Esquema que muestra la estructura del vector de clonamiento pLitmus28 usado en la obtención de la genoteca de alpaca.



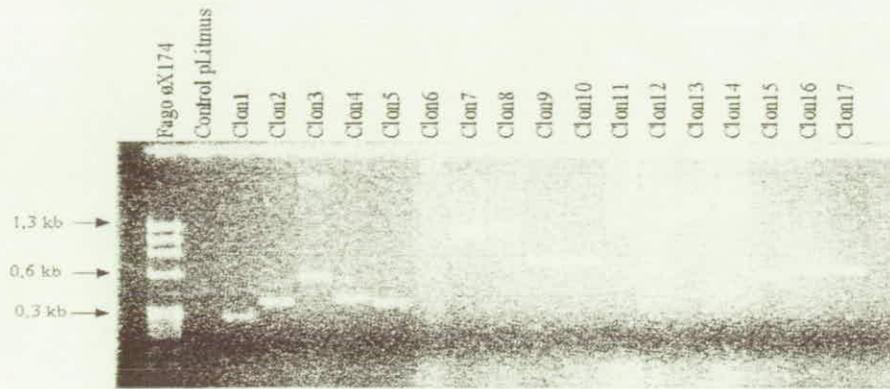
El vector pLITMUS que también fue digerido, pero en este caso utilizando solamente la enzima BamHI. Como se observa en la Figura 5, el vector linearizado mostró el tamaño esperado de 2.8 kb.

Figura 5. Gel de agarosa al 1.0% donde se muestra el vector de clonamiento pLitmus28 circular y linearizado con BamHI. En los dos últimos carriles de la derecha se muestran dos diferentes estándares.



Luego de realizar las reacciones de ligación y transformación bacteriana, se seleccionaron aleatoriamente cerca de 30 clones recombinantes (colonias blancas). Todos estos clones resultaron tener un fragmento de DNA de diferentes tamaños (entre 300 bp y 1.500 bp), como se aprecia en la Figura 6. Nótese que en esta electroforesis sólo se resuelven cinco bandas del estándar de peso molecular ϕ X174-HaeIII (entre 300 y 1.300 bp), corrido en el carril del extremo izquierdo. Como control se utilizó el vector de clonamiento sólo, obsérvese que en dicho carril no se observa amplificado, lo cual se esperaba puesto que no presenta inserto alguno.

Figura 6. Análisis de 17 colonias blancas (transformantes) mediante una reacción de PCR para determinar en forma rápida el tamaño aproximados de los insertos clonados.



Se prepararon dos genotecas parciales de alpaca, una fue preparada en el laboratorio de Biotecnología de La Platina, y fue guardada como mezcla de ligación; y la otra fue preparada el laboratorio del Dr. Gus Cothran en la Universidad de Kentucky, con el doble propósito de ampliar el número de clones recombinantes (se estimó que el número de clones obtenido en la primera serie de experimentos fue unas 40 veces inferiores al mínimo necesario para tener representada la totalidad del genoma), y además tener fragmentos de un tamaño más definido para la posterior secuenciación. Dado que se obtuvo un gran número de colonias recombinantes, éstas se usaron directamente para realizar el análisis de los clones que llevaban secuencias de microsatélites.

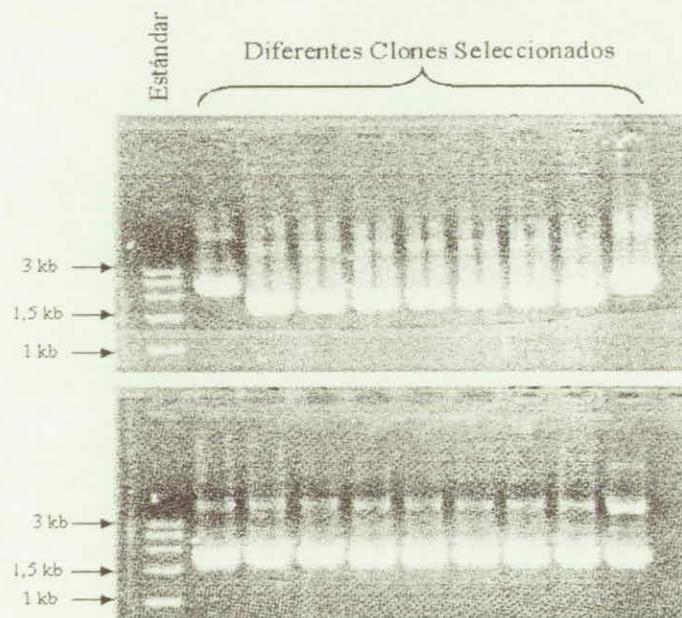
Desarrollo de marcadores de microsatélites

Mediante el análisis de las bacterias transformadas con una reacción de ligación adecuada, se obtuvieron aproximadamente 125 clones positivos después de ser analizados por medio de la hibridación (“Southern blot”) con la sonda poli(TG). Cabe destacar que el análisis realizado con el sistema de detección Genius System (Boehringer Mannheim) fue hecho por duplicado, y que aquellos clones que presentaban una reacción positiva en una primera instancia, fueron nuevamente analizados con la misma sonda, con el fin de minimizar al máximo la selección de falsos positivos.

Aquellas colonias seleccionadas positivas, fueron tomadas cuidadosamente utilizando mondadientes previamente esterilizados, para luego proceder a crecer dichas colonias en un medio de cultivo rico (agar LB) conteniendo ampicilina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Cada uno de los clones positivos seleccionados fuer crecido en medio de cultivo liquido (LB) como se indica en los materiales y métodos, utilizando 3 ml de dicho cultivo para realizar una extracción de plasmidio ("miniprep"). La cantidad y calidad de las extracciones de estos plasmidios se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Gel de agarosa con muestras de extracción de plasmidios de los distintos clones positivos obtenidos después del análisis por hibridización.



Cada uno de los clones a los cuales se le realizó la extracción de plasmidio fue posteriormente secuenciado, obteniéndose de esta forma la secuencia total del inserto clonado. Las secuencias de algunos clones que presentaban secuencias de microsatélites se muestran a continuación en las Figuras 8 y 9. En los gráficos mostrados, cada nucleótido está representado por un pico de una tinción fluorescente diferente.

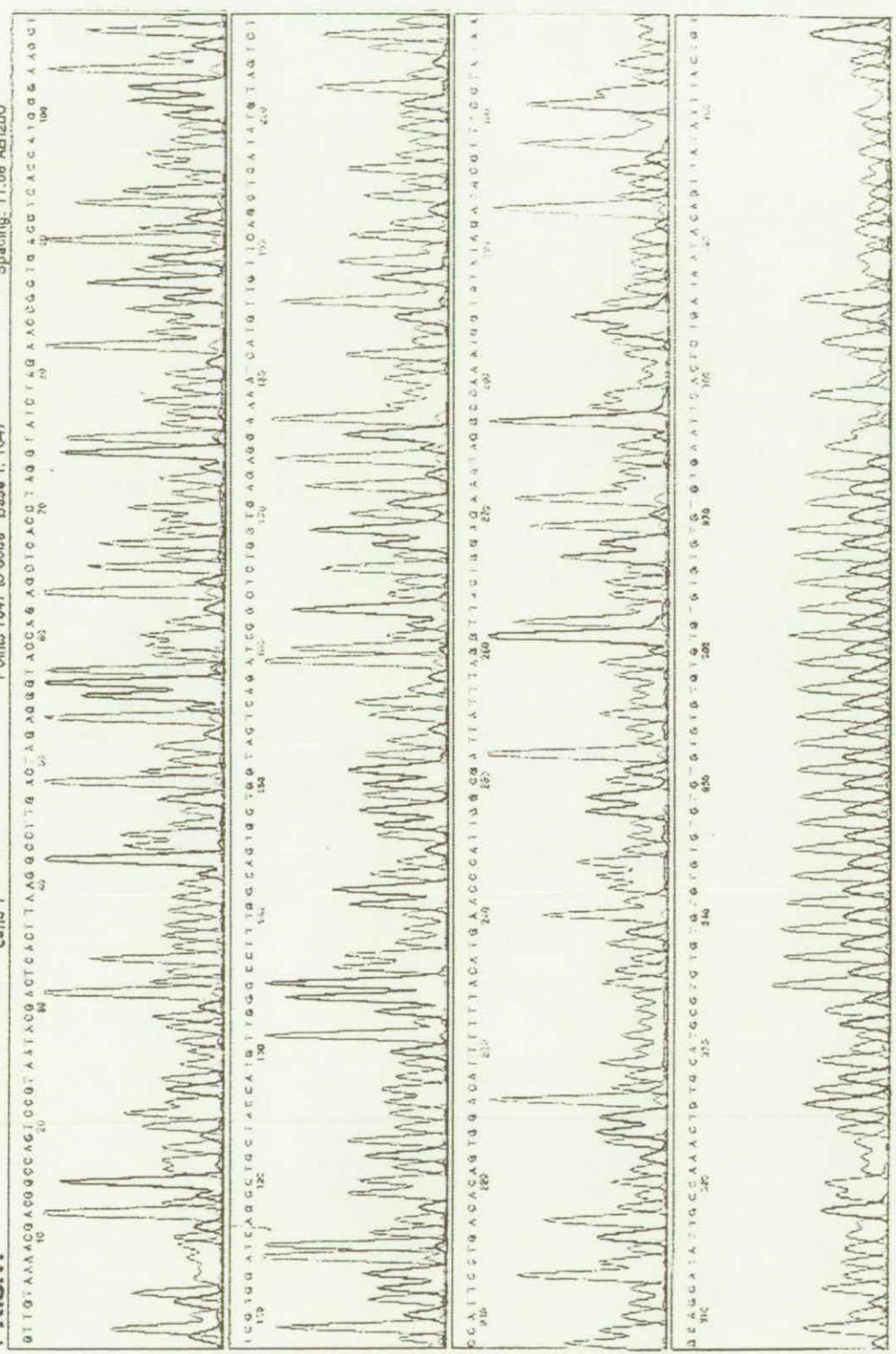
IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA EN CAMELIDOS
 Proyecto FIA 016/94

Model 377
 Versión 2.1.1

01-V01F
 V01F
 Lane 1

Signal G:180 A:467 T:213 C:134
 D14%Ac(A Set-AuyPrimor)
 95030291 updated automatic
 P:0115 1047 to 9016 Base 1: 1047

Page 1 of 1
 Fri, Jun 6, 1997 4:08 PM
 Fri, Jun 6, 1997 12:03 PM
 Spacing: 11.06 ABI200



Del total de clones positivos seleccionados y secuenciados solamente un porcentaje aproximado de 40% de ellos presentó secuencias de microsatélites factibles de ser utilizados en las siguientes etapas del proyecto. Un Cuadro resumen de la eficiencia de obtención de estos microsatélites se muestra a continuación.

Cuadro 9. Resumen que grafica la eficiencia en la obtención de secuencias de microsatélites.

I ^a Selección de clones +	2 ^a Selección de clones +	Clones Secuenciados	Positivos para Microsatélites	Partidores Diseñados	Loci Polimorficos
260	130 (50%)*	130	70 (54%)**	62 (89%***)	40 (65%****)

*Con respecto a 260; **Con respecto a 130; ***con respecto a 70; ****con respecto a 62.

Todas aquellas muestras que presentaban repeticiones (TG)_n, fueron secuenciadas en ambas direcciones, y dichas secuencias fueron introducidas al programa Oligo (versión 5.0), con el fin de diseñar los partidores de PCR adecuados para cada clon. Las características de las secuencias de microsatélites, así como el tamaño de los insertos clonados fueron almacenados en una base de datos.

Figura 10. Detalles entregados por el programa Oligo concernientes a las características de los partidores diseñados y su especificidad.

```
VICTO204.SEQ Length:409 Tue May 12 18:09:50 1998

UPPER PRIMER -VICTO204:116U18- positive strand.
Priming efficiency of the perfect match is 410 (above the threshold).
Not found.

UPPER PRIMER -VICTO204:116U18- negative strand.
Priming efficiency of the perfect match is 410 (above the threshold).
Priming efficiency: 410 (above the threshold).
5' (116) AAAGTAATCCCCACCCA (133)3'
      |||
3' (116) tttcattaaggggtgggt (133)5'
      |||
J204

VICTO204.SEQ Length:409 Tue May 12 18:09:50 1998

LOWER PRIMER -VICTO204:268L23- positive strand.
Priming efficiency of the perfect match is 446 (above the threshold).
Priming efficiency: 446 (above the threshold).
5' (268) GGAATAGAGGAATAAAAGTCGTT (290)3'
      |||
3' (290) ccttatctccttattttcagcaa (268)5'
      |||
J204

LOWER PRIMER -VICTO204:268L23- negative strand.
Priming efficiency of the perfect match is 446 (above the threshold).
Not found.
```

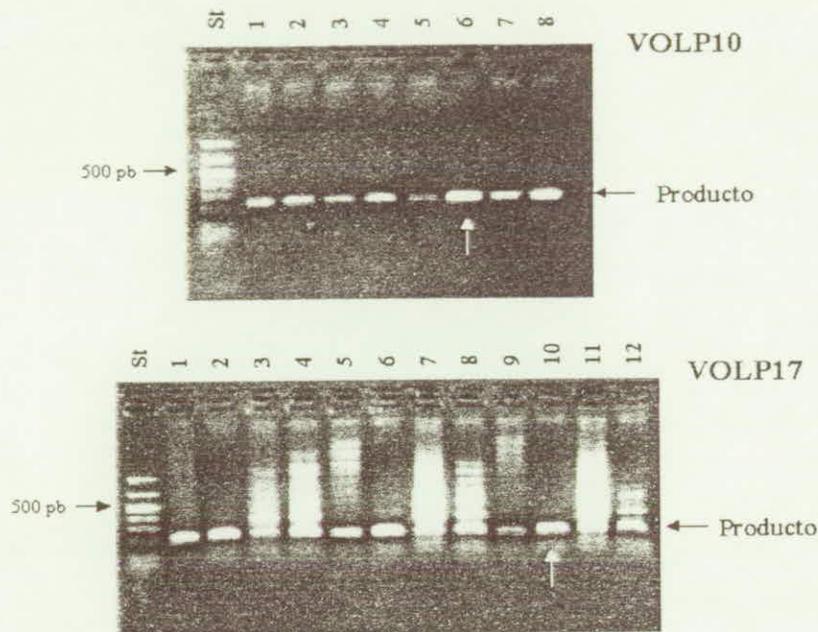
Figura 11. Se muestra, a modo de ejemplo, las condiciones de PCR y características de los partidores diseñados por el programa Oligo versión 5.0.

VICTO204.SEQ Length:409 Tue May 12 18:09:50 1998					
PCR					
Optimal Annealing Temperature: 50.1° (Max = 66.4°)					
	Position and Length		Tm [°C]	GC [%]	3' DG [kcal/mol]
Product	175		80.2	38.3	-----
Upper Primer	116	18	63.7	44.4	-9.4
Lower Primer	268	23	63.4	34.8	-8.4
Product Tm - Lower Primer Tm			16.8		
Primers Tm difference			0.4		
	Concentration				
Upper Primer	200.0 nM				
Lower Primer	200.0 nM				
Monovalent Cation	50.0 mM				
Free Mg[2+]	0.7 mM				
Total Na[+] Equivalent 155.8					

La etapa siguiente consistió en la determinación de las condiciones óptimas de amplificación para los partidores diseñados. En la siguiente Figura se muestra el producto amplificado de cinco partidores, donde se definieron éstas condiciones.

Para determinar cuales eran las condiciones óptimas de Mg^{++} , presencia de otros iones y del pH de la reacción de PCR, se utilizó un sistema de 12 buffer de Amersham, con el cual se ensayaron los distintos pares de partidores. En esta Figura se muestra el resultado obtenido con dos loci (VOLP10 y VOLP17). Los números representan los distintos buffer y las flechas blancas indican el buffer donde se obtuvo el mejor amplificado.

Figura 12. Geles de agarosa 1.0%, donde se muestra para dos *loci* (VOLP10 y VOLP17) el producto de PCR usando 12 diferentes buffer (Opti-Prime PCR Optimization Kit de Stratagene). La flecha blanca indica la condición en la cual se obtuvo la óptima amplificación del *locus*; buffer #6 para VOLP10 y buffer #10 para VOLP17.

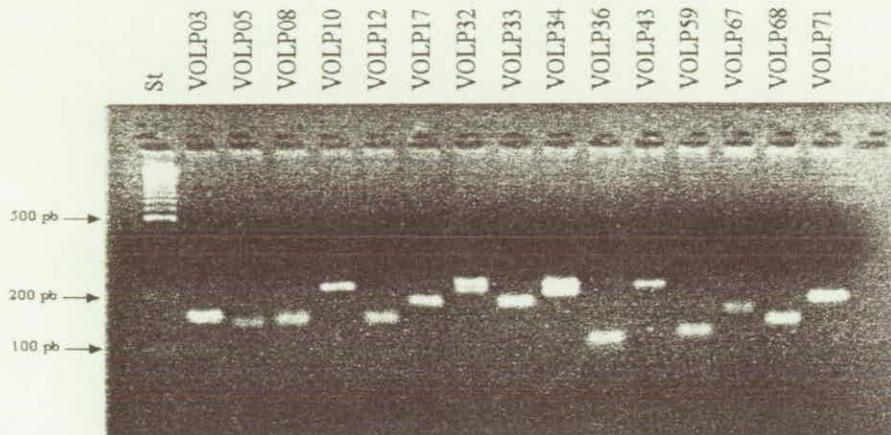


A continuación se muestra un Cuadro con las características de cada uno de los Buffer utilizados. Las concentraciones que se indican corresponden a las concentraciones finales en las reacciones de PCR.

Cuadro 10. Condiciones de pH y concentración de magnesio y potasio presentes en los diferentes buffer utilizados para las reacciones de PCR. La flecha (←) indica aquellos buffer que cuyas condiciones fueron las más óptimas para la mayoría de los *loci* de microsatélites desarrollados (buffer #6 y #10).

10 mM Tris-HCl	MgCl ₂	25 mM KCl	75 mM KCl
pH 8.3	1.5 mM	Buffer #1	Buffer #2
pH 8.3	3.5 mM	Buffer #3	Buffer #4
pH 8.8	1.5 mM	Buffer #5	Buffer #6 ←
pH 8.8	3.5 mM	Buffer #7	Buffer #8
pH 9.2	1.5 mM	Buffer #9	Buffer #10 ←
pH 9.2	3.5 mM	Buffer #11	Buffer #12

Figura 13.- Amplificación de 15 diferentes *loci* de microsatélites, utilizando una muestra de DNA de alpaca. Obsérvese que los productos amplificados se encuentran en un rango de tamaño entre 100 a 220 pb.



Identificación de SSR polimórficos en alpacas

Para analizar el nivel de polimorfismo que presentaba cada uno de los pares de partidores diseñados, muestras de los productos amplificados de cada uno de los diferentes *loci* en un grupo de 36 alpacas fueron observados en geles de mayor resolución (poliacrilamida) bajo condiciones denaturantes. Un ejemplo de lo observado se muestra en la Figura 12.

Las Figuras 14, 15, 16 y 17 corresponden a Geles de poliacrilamida de 4 *loci* (VOLP203, VOLP204, VOLP92 e IGF1 respectivamente) amplificados en distintas muestras de camélidos sudamericanos. Obsérvese que tres de ellos (VOLP203, VOLP204 y VOLP92) presentan un amplio grado de polimorfismo representado por la diferencia de bandas existentes entre las distintas muestras amplificadas. Por su parte el *locus* IGF1, es aparentemente monomórfico para los camélidos sudamericanos.

Figura 14. Gel de poliacrilamida tipo secuenciación con amplificados de CSA utilizando los partidores del *locus* VOLP204.



Figura 15. Gel de poliacrilamida tipo secuenciación con amplificados de CSA utilizando los partidores del *locus* VOLP203.



Figura 16. Gel de poliacrilamida tipo secuenciación con amplificados de CSA utilizando los partidores del *locus* VOLP92.



Figura 17. Gel de poliacrilamida tipo secuenciación con amplificados de CSA utilizando los partidores del *locus* IGF1.



Cuadro 11. Resumen de los *loci* de microsatélites publicados, los partidores para amplificar estas secuencias fueron diseñados de acuerdo al programa Oligo, basados en las secuencias adyacentes a los microsatélites.

Locus	Tipo de Repetición	Alelos (n)	Tamaño (pb)	H. Observada	PIC
VOLP01	(TG) ₂₀	5	240-256	0.235	0.384
VOLP03	(TG) ₁₃	8	129-169	0.799	0.740
VOLP04	(TG) ₁₉	13	226-258	0.914	0.863
VOLP05	(TG) ₁₃	6	134-150	0.790	0.753
VOLP08	(TG) ₁₀	3	148-152	0.226	0.214
VOLP10	(TG) ₃ TA(TG) ₇ TA(TG) ₇	3	231-235	0.596	0.521
VOLP12	(TG) ₃ CG(TG) ₄ CG(TG) ₇ CT(TG) ₂	2	136,148	0.080	0.077
VOLP17	(TG) ₁₄	12	184-228	0.784	0.733
VOLP32	(TG) ₂₀	12	192-247	0.797	0.802
VOLP33	(TG) ₁₁	4	177-183	0.775	0.528
VOLP42	(TG) ₁₄	4	185-193	0.680	0.448
VOLP50	(TA) ₄ CATGT(TA) ₃ T(GA) ₂ TA	3	178-204	0.474	0.389
VOLP55	(TA) ₃ (TG) ₁₄	9	159-189	0.771	0.755
VOLP59	(TG) ₁ [(CG) ₂ (TG) ₃] ₂ [(CG) ₂ (TG) ₄]	5	112-136	0.683	0.614
VOLP67	(TG) ₃ (G) ₄ (TG) ₃ CG(TG) ₇	5	158-170	0.671	0.584
VOLP68	(CA) ₁₁	5	136-146	0.579	0.497
VOLP72	(CA) ₁₄	11	150-190	0.538	0.791
VOLP73	(TG) ₈	4	190-200	0.676	0.456
VOLP77	(TG) ₁₉	11	144-168	0.667	0.786
VOLP81	(TG) ₁₃	5	205-213	0.632	0.456
VOLP83	(CA) ₁₆	4	183-189	0.148	0.454
VOLP90	(CA) ₄ TA(CA) ₃ AA(CA) ₄ TA(CA) ₃ (TA) ₂ CA	3	153-171	0.256	0.249
VOLP92	(CA) ₁ (GT) ₃	8	194-218	0.813	0.686

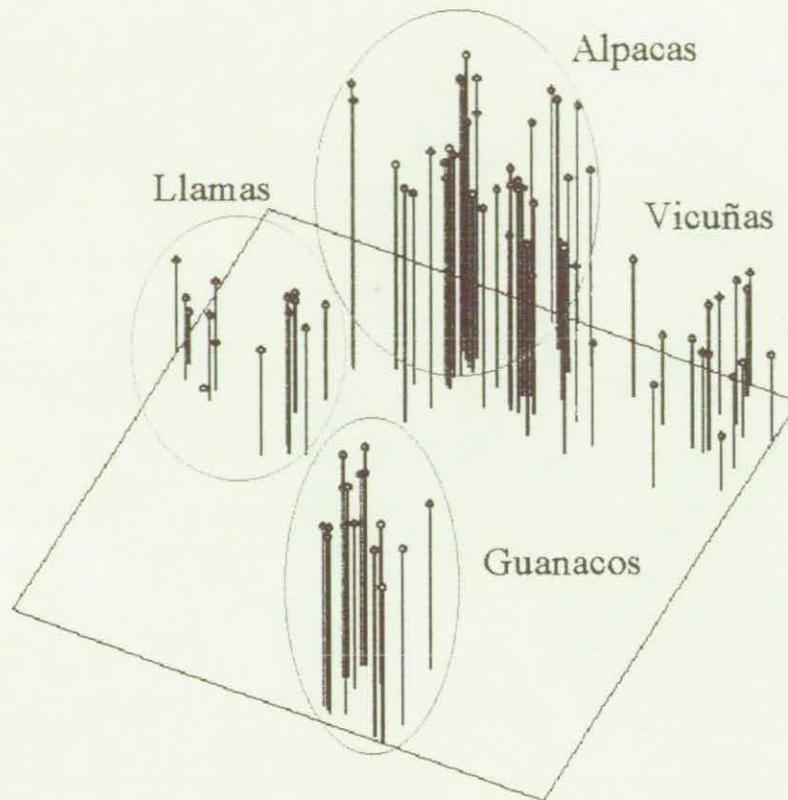
H: Heterocigosidad, n: número de alelos, PIC: poliforming index conten y pb: pares de bases.

Como se puede apreciar, algunos marcadores de microsatélites son muy variables en el tamaño de los fragmentos amplificados, como VOLP17 y VOLP-32. Por el contrario, otros partidores son escasamente polimórficos, como VOLP-12. Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron definidos *a priori*, de tal forma que se pueda discriminar fácilmente entre los diferentes alelos encontrados.

Figura 18. Dendrograma obtenido a partir del análisis de 85 muestras (39 alpacas, 14 llamas, 16 guanacos y 16 vicuñas) con 23 *loci* de microsatélites mostrados en la Cuadro 2.



Figura 19. Análisis de componentes principales (PCA) obtenidos con el mismo número de animales y *loci* que en la Figura anterior.



Posterior al análisis de polimorfismo de los distintos *loci* analizados, se procedió a estudiar si estos microsatélites desarrollados por nosotros permitían diferenciar de alguna forma las cuatro *taxas* de camélidos sudamericanos. Mediante un análisis estadístico realizado con el programa NTSYSpc2, utilizando como datos las frecuencias alélicas y genotípicas de los 23 *loci* de microsatélites informativos ya caracterizados se obtuvieron los siguientes resultados de similitud representada en un dendrograma (Figura 19) y de agrupación en un análisis de componentes principales (PCA) el que se muestra en la Figura 20. Se observan los cuatro grupos de CSA separados, siendo los guanacos los más homogéneos.

Poblaciones y familias de animales

Se describen a continuación las familias de alpacas que se han generado y actualmente se mantienen en el CRI Hidango. En la Cuadro 4 se listan las familias de alpacas que se están estructurando para ser usadas en el desarrollo del mapa genético de ligamiento. Se debe considerar que aun estos grupos (familias) son un número muy reducido de animales, el que debiera ser de unas 25 crías como mínimo por familia, en un total de unas 10 familias aproximadamente. Bajo estos números, los análisis estadísticos son muy débiles, entregando resultados de ligamiento con baja consistencia en sus resultados. La idea es continuar aumentando estos números, continuando los cruzamientos dirigidos, con el fin de realizar los análisis de mapeo. Las eventuales familias que se puedan seguir mejorando, así como también la existencia de conversaciones para contar con familias de otros centros de investigación, como UC-Davis (Dra. Cecilia Torres-Penedo) y algunos particulares, hacen posible pensar en un futuro proyecto dirigido específicamente a la localización genética de nuestros marcadores y asociarlos a algunas características interesantes desde el punto de vista científico y pecuario.

Cuadro 13. Familias (10) que se están construyendo para el análisis de ligamiento genético (mapeo).

	PADRES									
	032	017	027	01	004	395	304	9403	0	028
CRIA 1	9603	9512	9605	9403	9519	9711	9903	9909	9506	9615
CRIA 2	9609	9513	9613	9405	9532	9718	9904	9916	9616	9823
CRIA 3	9622	9516	9630	9406	9606	9723	9912	9919	9816	9902
CRIA 4	9625	9517	9632	9409	9608	9728	9913	9920	9834	
CRIA 5	9633	9525	9635	9410	9611	9730	9914			
CRIA 6	9710	9526	9713	9412	9614	9805				
CRIA 7	9716	9541	9719	9417	9809	9807				
CRIA 8	9721	9610	9722	9419	9824	9813				
CRIA 9	9726	9619	9731	9428	9832	9825				
CRIA 10	9734	9620	9732	9430	9833	9827				
CRIA 11	9806	9629	9733	9436	9905	9827				
CRIA 12	9810	9702	9737	9444	9911	9907				
CRIA 13	9811	9705	9812	9808	9917	9908				
CRIA 14	9815	9712	9819							
CRIA 15	9821	9714	9918							
CRIA 16	9826	9729	9921							
CRIA 17	9828									
CRIA 18	9906									

Análisis de familias de medios-hermanos ("Half-Sibs) usando SSR

A continuación, se presentan algunos resultados gráficos (geles de poliacrilamida) donde se han realizado análisis de filiación de algunas alpacas, utilizando para ellos algunos *loci* de microsatélites desarrollados en el contexto de este proyecto. Esta información constituye los primeros esfuerzos conducentes a generar el conjunto de datos necesarios para determinar grupos de ligamiento. Las familias mostradas (27 y 32, numeración correspondiente a los crotales de los padres) fueron analizadas con el partidor VOLP-92, VOLP-204 y VOLP-33 (Figura 20 hasta Figura 25).

Figura 20. Análisis de la familia denominada 027 (número de crotal del padre) con el *locus* VOLP92.

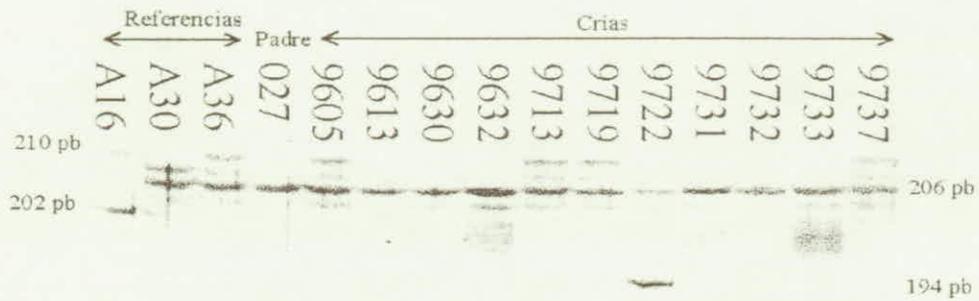


Figura 21. Análisis de la familia denominada 032 (número de crotal del padre) con el *locus* VOLP92.

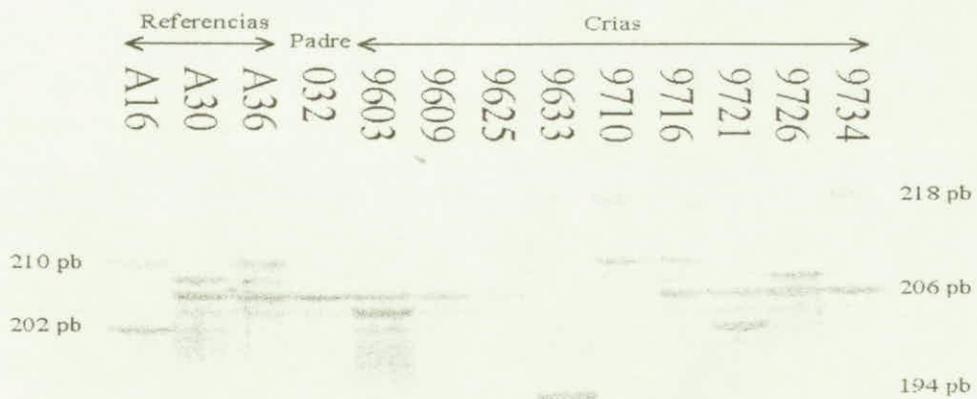


Figura 22. Análisis de la familia denominada 027 (número de crotal del padre) con el *locus* VOLP204.

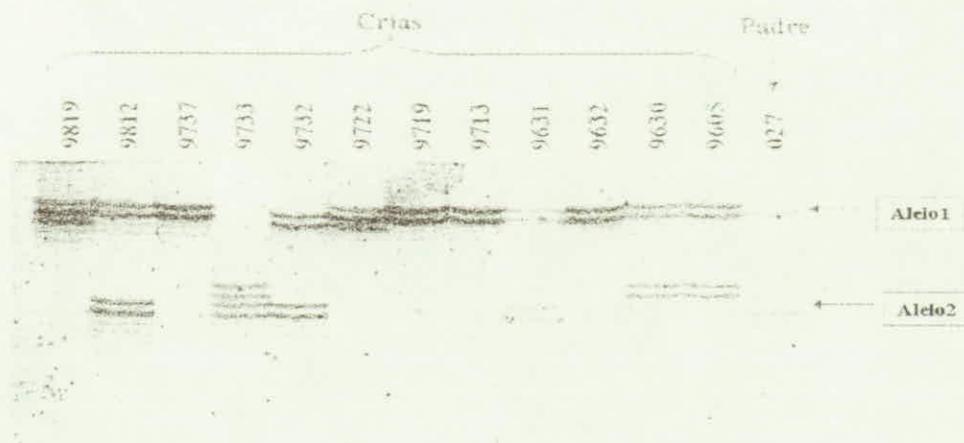


Figura 23. Análisis de la familia denominada 032 (número de crotal del padre) con el *locus* VOLP204.

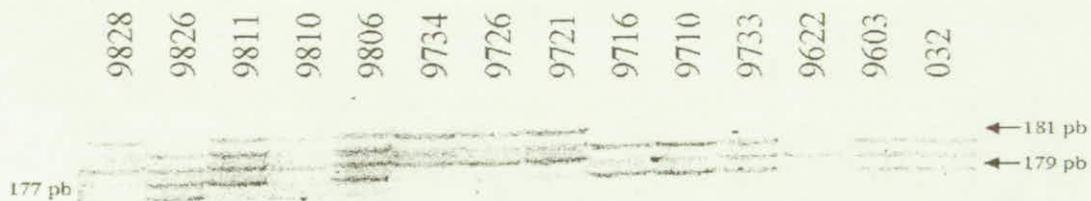


Figura 24. Análisis de la familia denominada 032 (número de crotal del padre) con el locus VOLP33

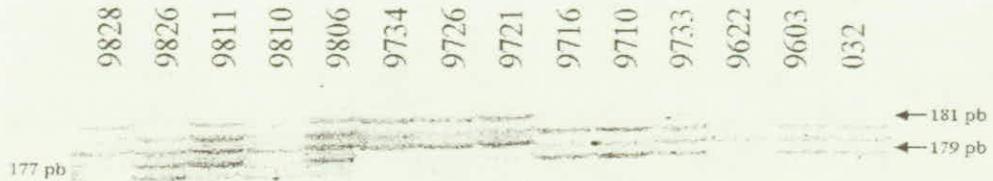
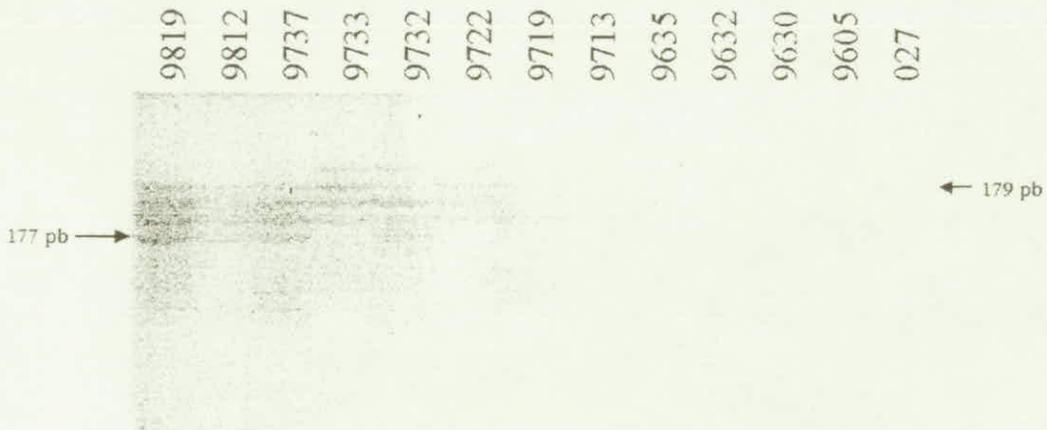


Figura 25. Análisis de la familia denominada 027 (número de crotal del padre) con el locus VOLP33.



RESULTADOS DE RAPD, AFLP Y SCAR.

El DNA de los Camélidos Sudamericanos (CSA) utilizado para el análisis con RAPD y AFLP fue recolectadas en distintas regiones del país, las alpacas se obtuvieron principalmente de la zona central en el centro de investigación de Hidango y de la región austral, en la zona de Kampeinake, las llamas y los guanacos también provienen de la región austral, en la zona de Kampeinake mientras que las muestras de vicuñas se recolectaron en la primera región, en el salar de Surire. El total de muestras utilizadas en estos análisis se muestran en la siguiente Cuadro.

Cuadro 14. Muestras de CSA utilizadas para los análisis de RAPD y AFLP.

1	HA08	17	KL9606	33	VAM37
2	KA9605	18	KL9605	34	VAM38
3	KA9607	19	KL9608	35	VAM16
4	KA9616	20	KL9603	36	VAM17
5	KA9613	21	KL9611	37	VAM45
6	KA9620	22	VAM3	38	VAM46
7	KA9631	23	VAM4	39	KG9708
8	HA04	24	VAM5	40	KG9797
9	HA09	25	VAM7	41	KG9763
10	HA9207	26	VAM8	42	KG9755
11	KA23	27	VAM31	43	KG9770
12	KA9618	28	VAM32	44	KG9703
13	KA9624	29	VAM33	45	G712
14	KA9629	30	VAM34	46	G782
15	KA9627	31	VAM35	47	G795
16	KL020	32	VAM36		

KA, alpacas; KL, llamas; VAM, vicuñas; KG/G, guanacos

RAPD

Para las reacciones de RAPD primero se debieron determinar las condiciones óptimas de reacción, como son la concentración de DNA y la concentración de magnesio presente. Para esto se probaron diferentes concentraciones de DNA genómico que variaban entre los 0,3 ng/μl y los 100 ng/μl, manteniendo las condiciones estándar para el resto de los reactivos que se utilizaban, con esto se determinó que la concentración óptima de DNA se encontraba entre los 3 y los 30 ng/μl, por lo que una concentración de 10 ng/μl de DNA fue considerada como la más adecuada para trabajar. De la misma manera fue determinada la mejor concentración de magnesio que debía utilizarse considerando valores entre 1 y 5 mM; en una primera etapa se encontró que la

reacción era óptima entre 2,5 y 3,5 mM, el ensayo se repitió, pero esta vez el rango de trabajo considerado fue entre 2 y 3,5 mM con variaciones de 0,5 mM; de esta forma se pudo establecer que la mejor concentración de magnesio para trabajar era 3,0 mM ya que el patrón de bandas obtenidas para todas las especies era constante y con una mayor claridad que si se utilizaban valores de concentración mayores o menores.

Cuadro 15. Descripción de los partidores utilizados para el análisis de RAPD.

Partidores	Secuencia	Nº bandas polimórficas	Candidato marcador SCAR *
OPA 9	5'-GGGTAACGCC-3'	4	
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'	5	
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'	5	
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'	6	A, V, L.
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'	3	
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'	3	G
OPB2	5'-TGATCCCTGG-3'	3	
OPB3	5'-CATCCCCCTG-3'	4	
OPB6	5'-TGCTCTGCCC-3'	2	
OPB7	5'-GGTGACGCAG-3'	3	
OPB11	5'-GTAGACCCGT-3'	4	
OPB12	5'-CCTTGACGCA-3'	6	A, V.
OPB13	5'-TTCCCCCGCT-3'	6	A, V.
OPB14	5'-TCCGCTCTGG-3'	4	
OPB19	5'-ACCCCCGAAG-3'	4	
OPF5	5'-CCGAATTCCC-3'	3	
OPF6	5'-GGGAATTCGG-3'	6	A, V.
OPF17	5'-AACCCGGGAA-3'	5	
OPI1	5'-ACCTGGACAC-3'	6	
OPI4	5'-CCGCCTAGTC-3'	6	
OPI10	5'-ACAACGCGAG-3'	7	
OPI11	5'-ACATGCCGTG-3'	3	
OPI14	5'-TGACGGCGGT-3'	5	L.
OPI18	5'-TGCCCAGCCT-3'	1	
OPI19	5'-AATGCGGGAG-3'	6	A, V.
G31		5	
G45		6	
G48		5	A, V, G.

Abreviaturas: A= Alpaca; G= Guanaco; V= Vicuña; L= Llama; SCAR= Sequence Characterized Amplified Region. Los partidores usados fueron principalmente de Operon Technologies Inc. Siendo los tres últimos de Wako, Japón.

Una vez que se establecieron definitivamente las condiciones de trabajo se hizo una selección de los partidores aleatorios que al parecer entregaban una mayor información de polimorfismos en las especies estudiadas. Los partidores que se probaron eran principalmente de la compañía Operon Technologies Inc. de las series A y B, y algunos de las series F e I, aunque también se

probaron algunos partidores de la compañía Wako de Japón, de la serie G. En general, estos partidores tienen un tamaño entre 10 a 12-meros y presentan un alto porcentaje de C o G en su secuencia. Para el ensayo de los partidores fue seleccionado un individuo de cada especie a estudiar y su DNA fue amplificado con distintos partidores de una misma serie para encontrar los que presentaban un bandeo claro, fácil de interpretar y con un bajo "background" al trabajar con las condiciones ya establecidas, de esta manera se probaron alrededor de 70 partidores, de los cuales se seleccionaron 28 que al parecer mostraban diferencias importantes entre los diferentes patrones polimórficos y que podrían entregar diferencias claras en el estudio de los CSA. Los partidores seleccionados con sus secuencias nucleotídicas se presentan en la Cuadro 7. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la Figura siguiente, donde se ha usado el partidador OPB-04 para analizar individuos de las cuatro especies de CSA.

Como resultado de la amplificación del DNA de los CSA mediante esta técnica se encontraron diferencias en el bandeo entre las especies, los que en algunos casos entregaban diferencias claras en los patrones, mientras que en otros era un poco más complicado encontrarlas necesitando un análisis minucioso. Mediante una observación rápida del bandeo se pudo decir que existían diferencias asociadas a las especies, es decir, algunas bandas que se encontraban en llamas solía verse también en guanacos y no hallarse en ninguna de las otras dos especies, en otros casos podía decirse que había bandas presentes solamente en alpacas y vicuñas y no en las otras o sencillamente hallarse bandas que solo se observaban en una especie en particular, como podían ser los guanacos. Las diferencias de bandeo se observan claramente en las Figuras donde se indican las bandas más significativas para cada especie.

Las diferencias que se podían observar a simple vista en algunos casos y en otros con un mayor cuidado se transformaron en una matriz binaria donde el valor cero indicaba la ausencia del polimorfismo y el valor uno su presencia, cuando se completo este análisis, se introdujo la matriz en el programa estadístico NTSYS-pc, de manera de poder obtener gráficamente las relaciones existentes entre los animales de las distintas especies, estos resultados se entregaron por dendrograma y por análisis de componentes principales. Con el dendrograma se obtuvieron dos grandes grupos que a su vez estaban subdivididos en dos más pequeños; un grupo mayor contenía a las alpacas y a las vicuñas y el otro encerraba a las llamas y a los guanacos. Estas divisiones concuerdan con las agrupaciones que se plantean para estas especies, ya que se dice que para los CSA existen dos grandes grupos, los silvestres como guanaco y vicuña, y los domésticos como llamas y alpacas; donde los guanacos tendrían una relación más cercana con las llamas y que las vicuñas lo harían con las alpacas; por otro lado, en el dendrograma también se encontró un animal que se sabía era un llamo híbrido que fenotípicamente se asemejaba a una alpaca y que en el dendrograma se encuentra ligado directamente al grupo de las llamas aunque se establece como un individuo único en este grupo. En el caso de los grupos de vicuñas estudiados no se encontró relación entre los grupos familiares. Con el PCA se obtuvieron también cuatro grupos claramente identificables, siendo algunos de ellos muy cerrados como es el caso de los guanacos, esto se puede deber a que todos los individuos de esta especie provienen de una misma región y se encuentran lo bastante aislados como para presentar semejanzas con alguna de las otras especies analizadas o incluso tal vez con otros grupos de guanacos provenientes de otra zona. En el caso de las vicuñas también podemos observar que son un grupo bastante homogéneo y cerrado, lo que se explica con que todas provienen de una misma zona bastante aislada como para

que exista mezcla con otros grupos. Por otro lado, también se puede observar que existen algunos individuos que se encuentran entre dos grupos como sería el caso de dos llamas que al parecer presentan una carga genotípica que los relaciona también con el grupo de alpacas, de una de ellas se sabe que es una llama-alpaca o guarizo por lo que tiene información genotípica de ambos grupos, en cambio en el caso del otro individuo, se podría pensar que también es un guarizo que no fue identificado o que alguno de sus progenitores lo era.

La Figura 26 a continuación ilustra una reacción de RAPD (partidor OPA-09) característica para individuos de las cuatro especies de CSA. Se puede apreciar: (i) la gran cantidad de sitios genéticos (*loci*) amplificados; y (ii) la alta homogeneidad revelada mediante esta metodología entre las especies, entre las cuales se encuentran escasas bandas polimórficas (flechas laterales).

Figura 26. Perfil de RAPD de muestras de CSA, utilizando el partidor OPA-9. Las flechas indican las bandas polimórficas.

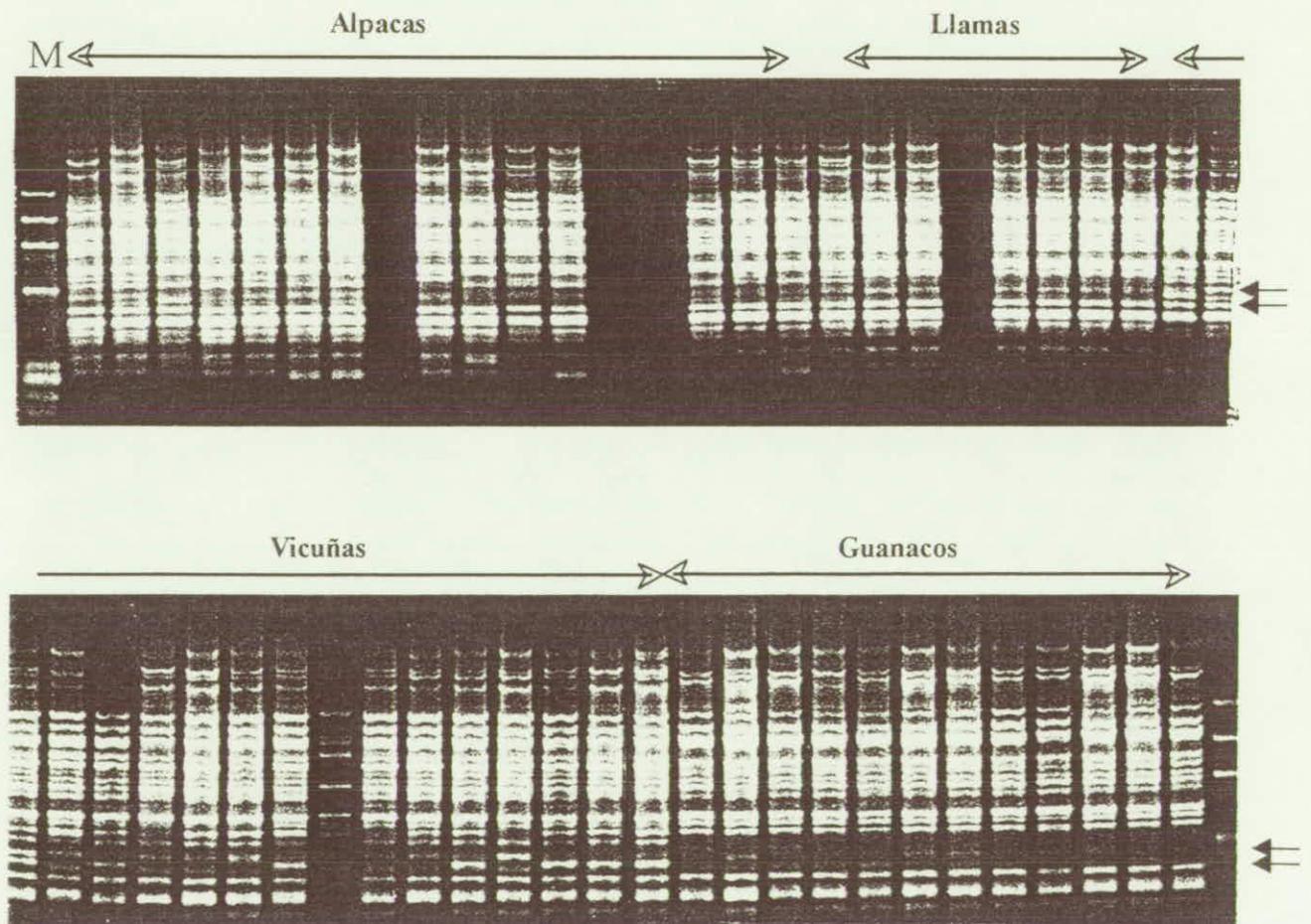
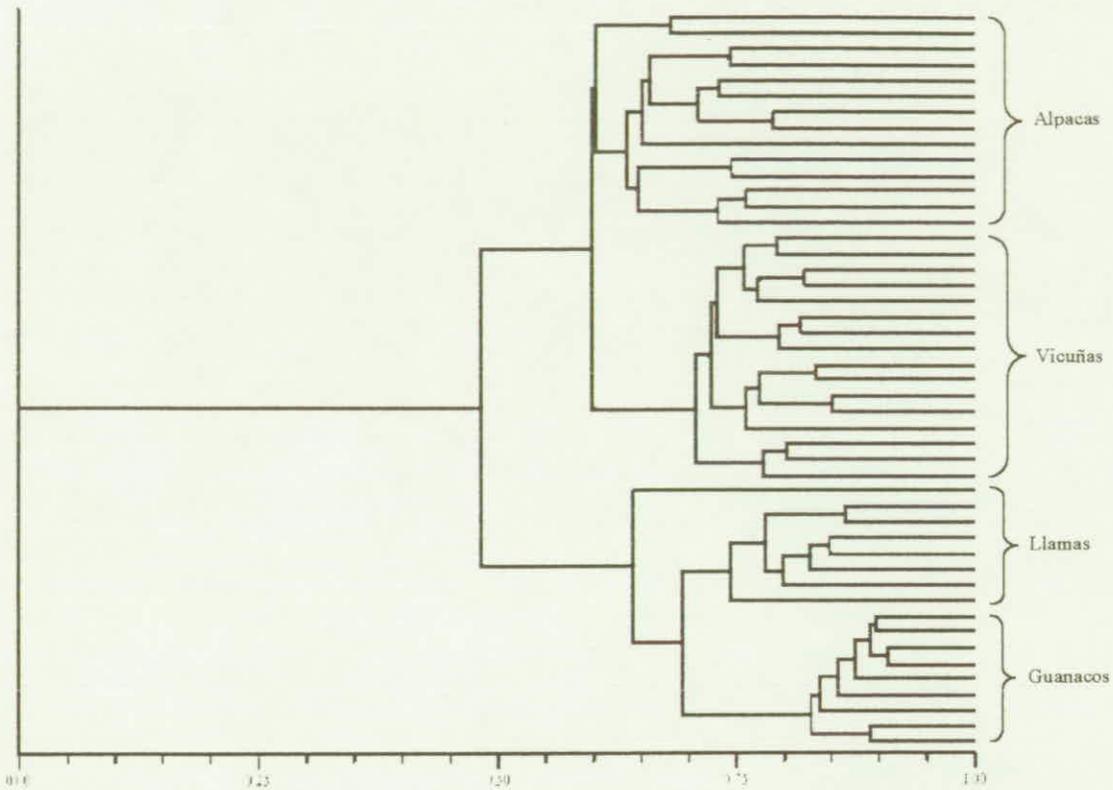
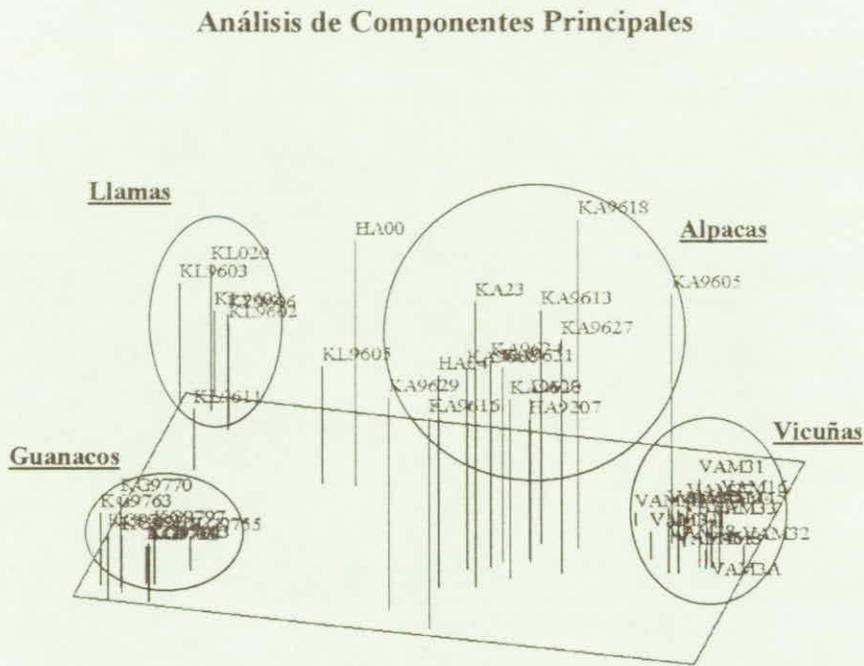


Figura 27. Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de RAPD obtenidos en muestras de alpacas, llamas, guanacos y vicuñas.



La información de polimorfismos fue sometida a diferentes análisis estadísticos, y como se ilustra en la figura precedente, correspondiente a un análisis de agrupamiento ("clustering") usando el algoritmo UPGMA para generar un dendrograma, las cuatro especies de CSA se separan en grupos genéticos discretos. El análisis de componentes principales basados en estos datos demuestra que efectivamente las diferencias genéticas son estadísticamente significativas, como lo ilustra el gráfico de la página siguiente.

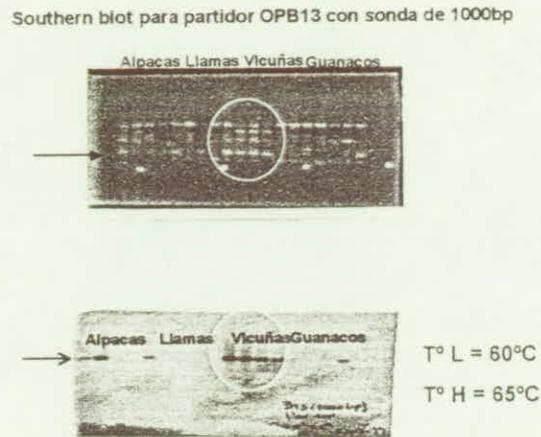
Figura 28. Análisis de componentes principales (PCA) obtenidos con los mismos datos de RAPD utilizados en el dendograma.



RAPD-SCAR.

En este momento se tienen clones de bandas de RAPD que mostraron polimorfismos para algunas de las especies (Figura siguiente). La secuenciación de estos fragmentos de DNA permitirá diseñar partidores de PCR específicos que reconozcan los extremos de ellos, de tal forma que se podrán utilizar como marcadores específicos de las distintas especies. En la página siguiente se muestra una figura con los fragmentos clonados provenientes de los distintos partidores y los respectivos pesos moleculares.

Figura 29. En la parte superior se muestra un gel de RAPD con las bandas polimórficas obtenidas con el partidor OPB13. En la parte inferior de la figura, se observa el resultado de la hibridación con la sonda de 1000 pb.



Cuadro 16. Fragmentos clonados de reacciones RAPD usando distintos partidores. Se indican el número de bandas clonadas y el tamaño de los respectivos fragmentos.

Partidores de RAPD	Especies que reconoce	Tamaño	N° de bandas
A17	alpaca-vicuña	200 pb	6
A17	vicuña	400 pb	1
B12	llama-guanaco	350 pb	4
B12	alpaca-vicuña	1000 pb	4
B12	llama-guanaco	1100 pb	
B13	llama-guanaco	600 pb	3
B13	vicuña	1000 pb	2
I19	alpaca-vicuña	650 pb	4

AFLP

Para esta reacción se utilizaron básicamente los mismos animales que para la reacción de RAPD, salvo algunas diferencias, la lista de los animales se indica en la siguiente Cuadro al igual que la concentración en que se encuentran.

Lo primero que se hizo para este estudio fue estandarizar la concentración de las muestras a 250 ng para cada reacción, en algunos casos fue necesario hacer diluciones del material de inicio y en otros solo agregar una mayor cantidad de volumen para igualar la concentración necesaria, una vez que se hizo esto se realizaron las dos primeras etapas que eran digestión del DNA con enzimas de restricción tipo EcoRI y MseI y luego la ligación de adaptadores que contenían la complementariedad al corte realizado y parte de la secuencia de los partidores que se usaban en las etapas posteriores. Después de esto, se continuó con la amplificación no selectiva (PCR+1) del DNA tratado, con lo que recién fue posible determinar la eficiencia de las dos etapas anteriores mediante geles de agarosa al 1% preteñidos con bromuro de etidio; en muchos casos se encontró amplificación pero de no muy buena calidad, por lo que finalmente se decidió precipitar de nuevo las muestras de DNA que se estaban trabajando para ver si mejoraban los resultados; se encontró que la amplificación mejoro debido principalmente a que la eficiencia de la reacción de digestión del material inicial aumento. Un gel típico de AFLP obtenido en el análisis de CSA se muestra en la Figura 27. La combinación de los 10 partidores que se utilizaron para las reacciones de AFLP se describen en la Cuadro 9.

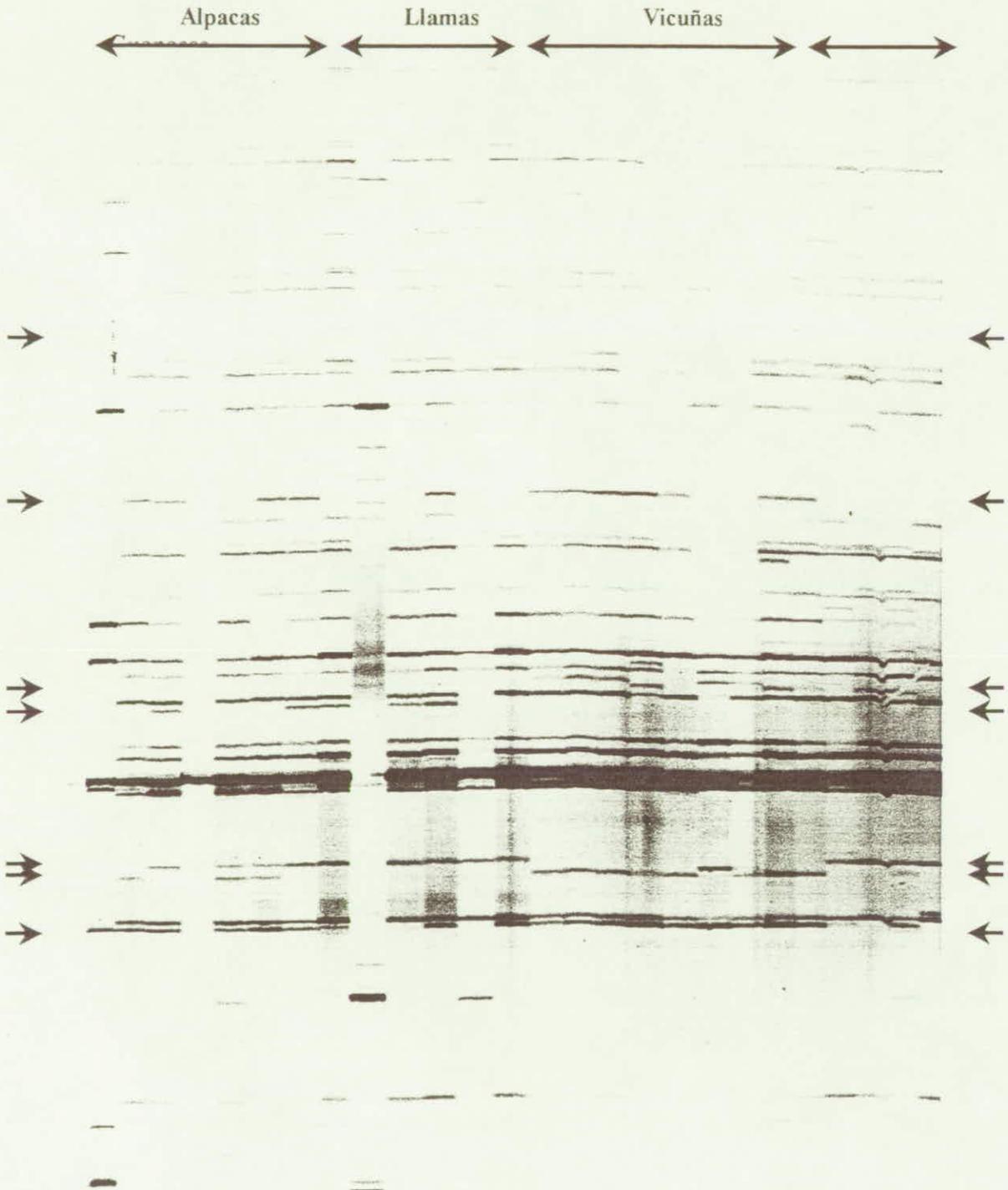
Cuadro 17. Combinaciones de partidores utilizados para las reacciones de AFLP. La letra E simboliza los partidores que se unen a los sitios EcoRI, y la letra M simboliza los partidores que se unen a los sitios MseI.

E-AAC/M-CAG	E-ACC/M-CAA
E-ACG/M-CAA	E-ACA/M-CAA
E-AGG/M-CAA	E-ACG/M-CTT
E-AAC/M-CTA	E-ACG/M-CTG
E-ACT/M-CTG	E-ACC/M-CAG

Con estas combinaciones se obtuvieron alrededor de 134 polimorfismos entre las especies, los que variaban para los partidores entre 8 y 20. Muchos de estos polimorfismos, a pesar de no ser tan notorios en todos los casos, si indicaban diferencias importantes, especialmente en el grupo de los guanacos y en algunas llamas estudiadas.

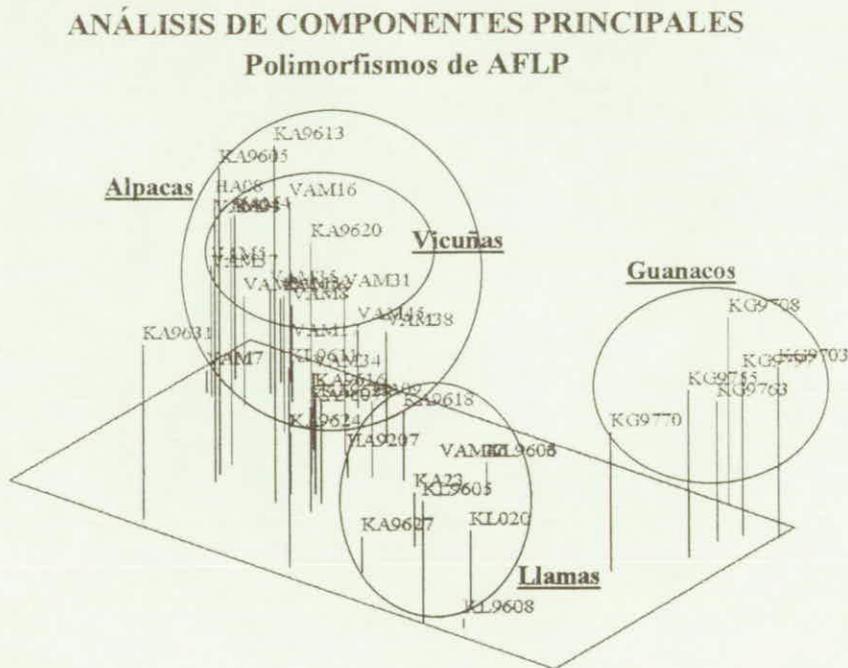
El análisis de los polimorfismos de AFLP se hizo de la misma manera que para el estudio de RAPD, por lo tanto, se construyó una matriz binaria con los valores uno para la presencia del polimorfismo y cero para su ausencia, luego esta matriz se introdujo en el programa estadístico NTSYS-pc con el cual se construyo un dendrograma y se hizo un análisis de componentes principales. Con el dendrograma se diferenciaron dos grupos más importantes que a su vez estaban divididos también en dos, un grupo contemplaba a las alpacas y a las vicuñas y el otro a las llamas y a los guanacos. Además si se observa con mas detención el grupo de las vicuñas se observa que la separación de las ramas coincide con los supuestos grupos familiares de estos animales y que la rama que encierra tres individuos separa a los especimenes machos de dos grupos distintos. Con el PCA se obtuvo también la división entre los cuatro grupos de animales, además se mantuvo la distancia entre el grupo de los guanacos con respecto a los otros, al igual que lo que se observó mediante RAPD; También se encontró que las alpacas y las vicuñas, a pesar de encontrarse bastante cercanas entre si, se separaban en grupos distintos.

Figura 30. Gel de poliacrilamida tipo secuencia donde se muestra un típico patrón de AFLP obtenido para muestras de CSA.



Finalmente, estos datos fueron analizados en forma equivalente a lo que se hizo con los datos de RAPD, lo que se ilustra en el análisis de componentes principales siguiente, donde se puede apreciar la separación de los cuatro grupos genéticos o especies de CSA. La diferencia con RAPD es que en este caso fu más difícil apreciar la separación entre alpacas y vicuñas, lo que refuerza la idea sobre su similitud genética, mayor que con las otras dos especies que formarían un clado diferente.

Figura 31. Análisis de componentes principales (PCA) obtenidos con los polimorfismos de AFLP.



ANÁLISIS CITOGENÉTICO

DEFINICIÓN DE LA NOMENCLATURA DEL PATRÓN DE BANDAS GTG PARA LOS PARES CROMOSÓMICOS 1 Y 2.

Se utilizó la pauta de nomenclatura de bandas entregada por el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN 1995), el cual se ha hecho extensivo a la estandarización de cariotipos de animales domésticos (Reading Conference 1980).

Cada cromosoma en el complemento de células somáticas, se considera que consiste de una serie continua de bandas, con áreas no bandeadas. Inicialmente se definió banda como una parte de un cromosoma claramente distinguible desde partes adyacentes según su oscuridad o claridad en la intensidad de la tinción. Las bandas son asignadas a varias regiones a lo largo de los brazos de los cromosomas, y las regiones son delimitadas por marcas específicas (*Landmark*). Las marcas son definidas por características consistentes y diferencias morfológicas importantes para la identificación de cada cromosoma. Estas marcas incluyen: el final de los brazos cromosómicos, el centrómero y ciertas bandas. Las bandas y las regiones son numeradas desde el centrómero hacia afuera. Una región es definida como un área de un cromosoma ubicada entre dos marcas adyacentes.

Las bandas son designadas sobre la base de su punto medio y no por sus márgenes. La intensidad se considera, determinando las bandas que servirían como marcas en cada cromosoma con el fin de dividir el cromosoma dentro de regiones morfológicamente fácilmente reconocibles.

Las regiones y bandas son numeradas consecutivamente desde el centrómero hacia afuera a lo largo de cada brazo del cromosoma. Los símbolos p y q son usados para designar, respectivamente el tipo y largo del brazo de cada cromosoma. El centrómero (*cen*) es designado como 10; la parte adyacente al brazo corto se denomina *p10*, la parte adyacente al brazo largo es *q10*. Las dos regiones adyacentes al centrómero son llamadas 1 en cada brazo; la próxima región, más distal se denomina 2, y así sucesivamente. Una banda usada como marca se considera perteneciente a la región distal a la marca y se ajusta a la banda número 1 en esa región.

En la designación de una banda particular, se requiere considerar 4 puntos:

(1) número del cromosoma, (2) símbolo del brazo, (3) número de la región, y (4) número de la banda dentro de esa región.

Estos ítem se escriben siguiendo el mismo orden sin espacios ni puntuación. Por ej. 1p31 indica al cromosoma 1, al brazo corto, la región 3 y la banda 1.

Cuando una banda es subdividida, un punto decimal es colocado después de la designación de la banda original y seguido por el número asignado a cada sub-banda. La sub-bandas son numeradas secuencialmente desde el centrómero hacia afuera. Por ejemplo, si la banda original 1p31 es subdividida dentro de 3 bandas, las sub-bandas son designadas como 1p31.1, 1p31.2, y 1p31.3, siendo la sub-banda 1p31.1 proximal y 1p31.3 distal al centrómero. Si una sub-banda es subdividida, se le adicionan dígito, pero sin puntuación, así la sub-banda 1p31.1 puede ser

subdividida en 1p31.11, 1p31.12, etc. Aunque en principio una banda puede ser subdividida en cualquier número de bandas, usualmente una banda se subdivide dentro de tres sub-bandas.

RESULTADOS CITOGENÉTICOS

Durante el periodo se obtuvo cariotipos con bandeado CBG: 1 llama, 1 alpaca y 3 guanacos, y cariotipos con bandeado GTG: 2 de llama, 2 de alpaca y 4 de guanacos

En la figura 32 se muestra un cariotipo con bandeado CBG y en la figura 33 con bandeado GTG.

Al analizar el patrón de bandas y compararlo entre las especies se observó que no existían diferencias entre éstas, concordando con lo reportado por otros autores (Bianchi et. al., 1986). Al analizar el patrón de bandas GTG y compararlo entre las especies se observó diferencias finas, en los pares cromosómicos 1 y 2. A nivel del cromosoma 1, tanto en el guanaco como en la llama existe una banda G+ terminal en el brazo corto (p). En cambio en la vicuña y la alpaca hay una banda G- terminal y una G+ intersticial. Esto se muestra en la figura 34, donde se entregan cariotipos parciales incluyendo el par cromosómico 1 y 2 de las 4 especies.

A nivel del cromosoma 2 se observó heteromorfismo en el brazo corto en la vicuña, alpaca y llama, encontrándose una banda G+ terminal en uno de los cromosomas homólogos y en el otro 2 bandas G+, una terminal y otra intersticial. En el guanaco en cambio no se encontró este heteromorfismo, y en ambos homólogos existían bandas G+ terminales en los brazos cortos (ver figuras 32 y 34).

En los idiogramas parciales se describen y designan números a las bandas GTG en las cuatro especies (figuras 35, 36, 37 y 38). En el guanaco y la llama, la banda G+ en el brazo corto del cromosoma 1 se denominó 1p13 (figuras 35 y 36). En la vicuña y la alpaca, la banda G+ se designó como 1p12 (figura 37 y 38). En el guanaco, la banda G+ del brazo corto del cromosoma 2 se designó como 2p13. En la vicuña, alpaca y llama, en un homólogo se denominó 2p13 y en el otro, como son dos bandas, una es 2p13, y la otra es 2p12.2.

Las inversiones suceden cuando un segmento del cromosoma es invertido seguido por la ruptura de un cromosoma en dos posiciones produciendo un realineamiento de los genes en el cromosoma. Si el segmento incluye el centrómero, se dice que es pericéntrica; si el centrómero no está incluido, la inversión es paracéntrica. Las inversiones involucran un rearrreglo de genes existentes sin pérdida ni adición. De esta forma, las inversiones no son fáciles de detectar en cariotipos. Un cromosoma con inversión paracéntrica, por ejemplo, mantiene la misma forma y tamaño como un cromosoma normal (Nicholas 1995).

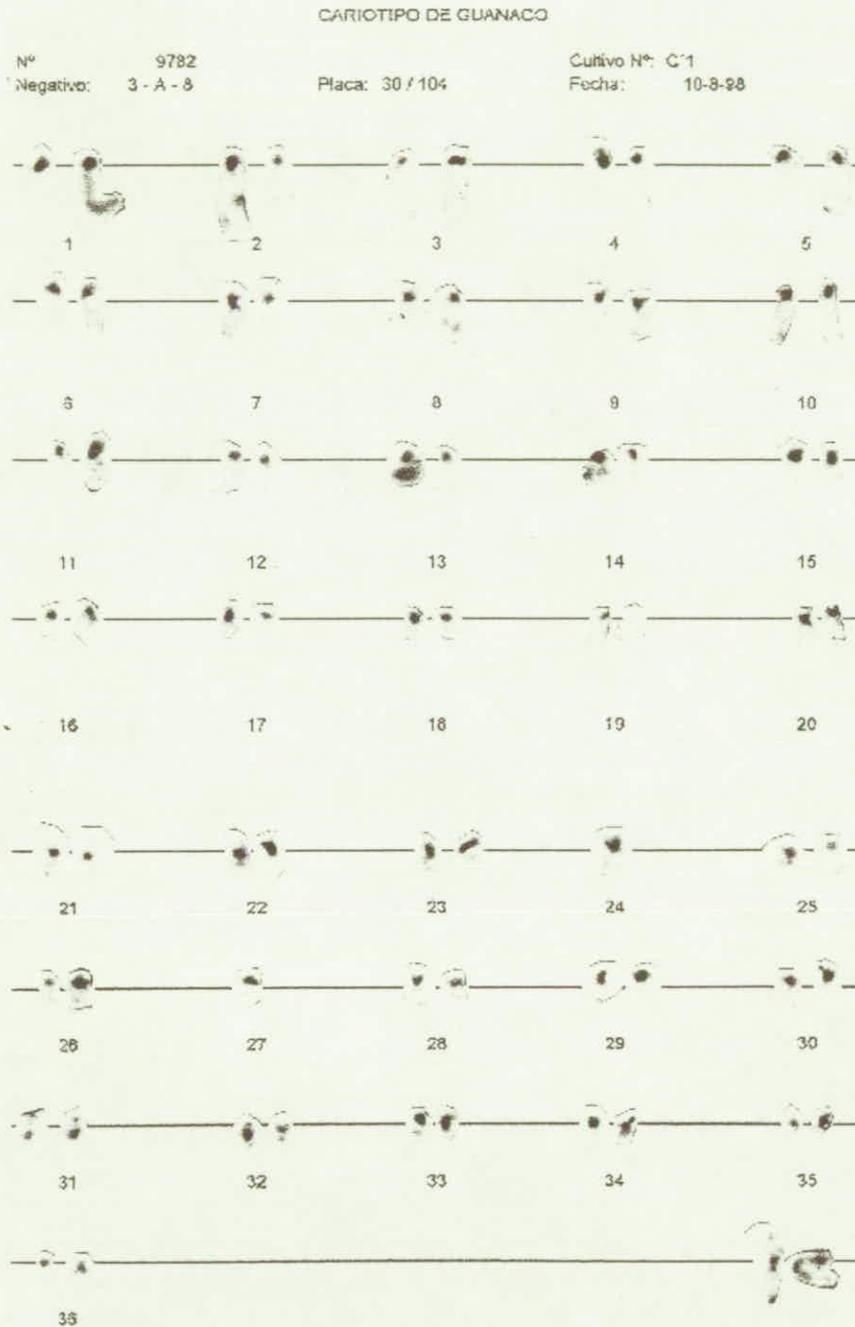
La evolución de cualquier especie es en el ámbito cromosómico y bioquímico. Toda especie es un taxón reproductivamente aislado de los demás y del cual los individuos cambian genes entre sí, por lo tanto el acervo genético es de carácter exclusivo para cada especie. De este modo, la fijación de mutaciones y el establecimiento de polimorfismos, a partir de que ocurre la divergencia filogenética, configuran un conjunto de alteraciones del genoma que son propias de cada especie.

En este sentido la evolución cromosómica es importante, sin embargo aun existe discrepancia sobre si tales cambios cromosómicos fueron los que crearon barreras reproductivas y fueron consecuencia del aislamiento reproductivo (Seunez 1985). Sin embargo, es posible que los reordenamientos cromosómicos puedan haber contribuido a crear grupos de ligamiento más eficientes o ventajosos, y contribuido a alterar, mediante cambios de posición en las regiones eucromáticas, los mecanismos de regulación génica (Seunez 1985).

Las técnicas de bandeado cromosómico han permitido mostrar semejanzas estructurales entre especies filogenéticamente relacionadas. Estas semejanzas, identificadas por comparaciones cariotípicas, evidencian homologías probables entre especies, cuya demostración definitiva dependerá principalmente de los datos de mapeamiento genético. Esta información permitirá corroborar si las semejanzas morfológicas coinciden con las semejanzas de contenido genético.

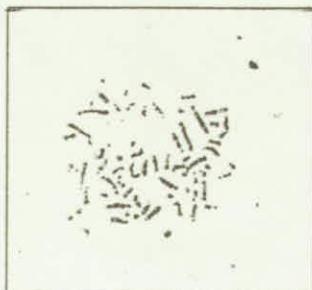
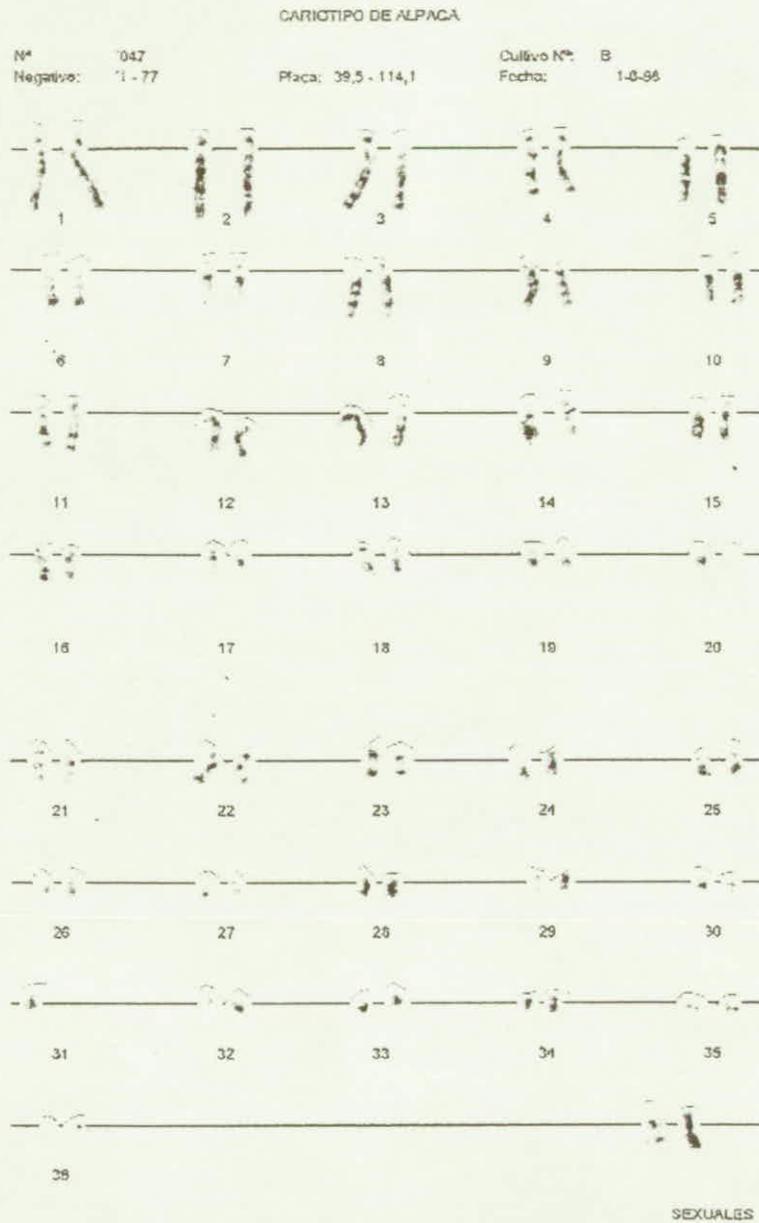
Durante la evolución de los cariotipos de los animales domésticos (vaca, oveja, cabra, etc.) han predominado las translocaciones robertsonianas, en las cuales dos cromosomas acrocéntricos se fusionan y forma uno metacéntrico (Gallagher y Womack, 1992). Las inversiones paracéntricas son raras, pero se han registrado en primates (Yunis y Prakash 1982) y en *Drosophila* (Brncic, 1985). En *Drosophila* particularmente, se ha estudiado que durante la evolución se han producido numerosos reordenamientos cromosómicos imputables a inversiones de segmentos de éstos y que se han fijado en cada especie. Sin embargo, sólo las inversiones paracéntricas y excepcionalmente las inversiones pericéntricas, constituyen situaciones de polimorfismos en las poblaciones naturales de las especies del género. En estos organismos, se han encontrado especies con polimorfismos en un solo cromosomas, además polimorfismos fijos y flexibles, siempre en relación con la adaptación a su ambiente (Seunez 1985).

Figura 32. Bando CBG de guanaco.



Metafase con bando CBG

Figura 33. Cariotipo de alpaca con bandeo GTG de alta resolución.



Metafase con bandeo GTG

Figura 34. Cariotipos parciales de las cuatro especies de CSA en gradiente de resolución de bandas GTG. Se indican los números de cada animal analizado.

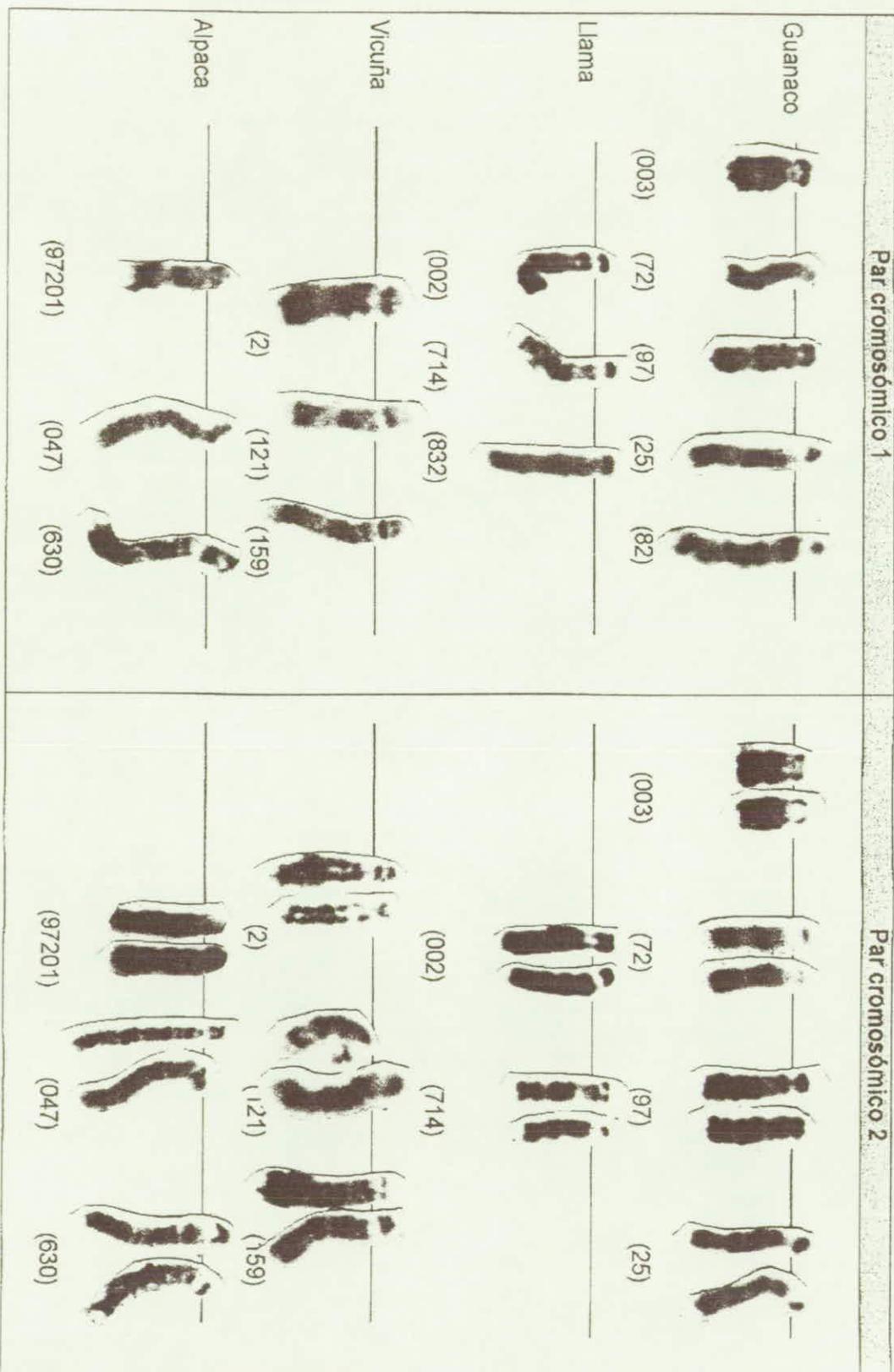


Figura 35. Idiograma parcial. Pares cromosómicos 1 y 2 de guanaco.

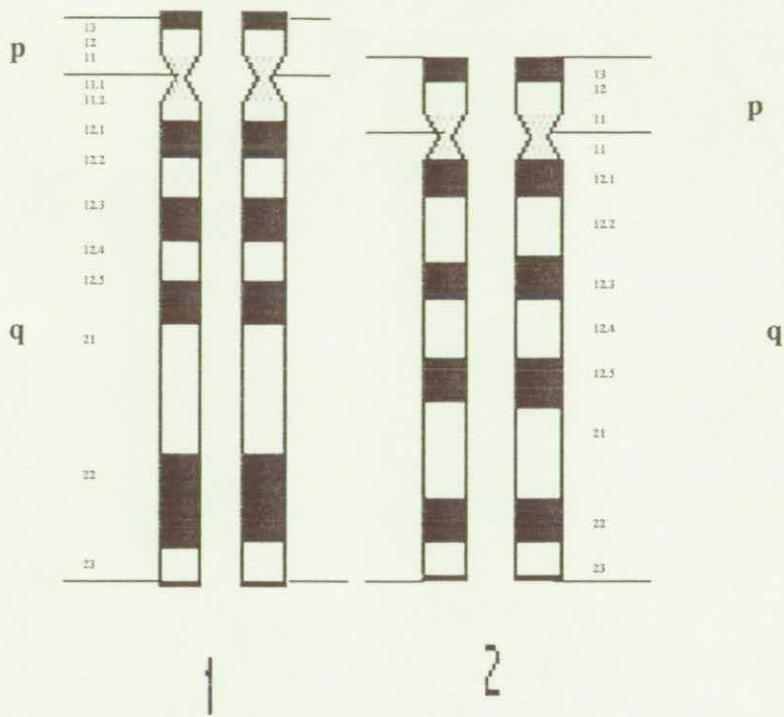


Figura 36. Idiograma parcial. Pares cromosómicos 1 y 2 de llama.

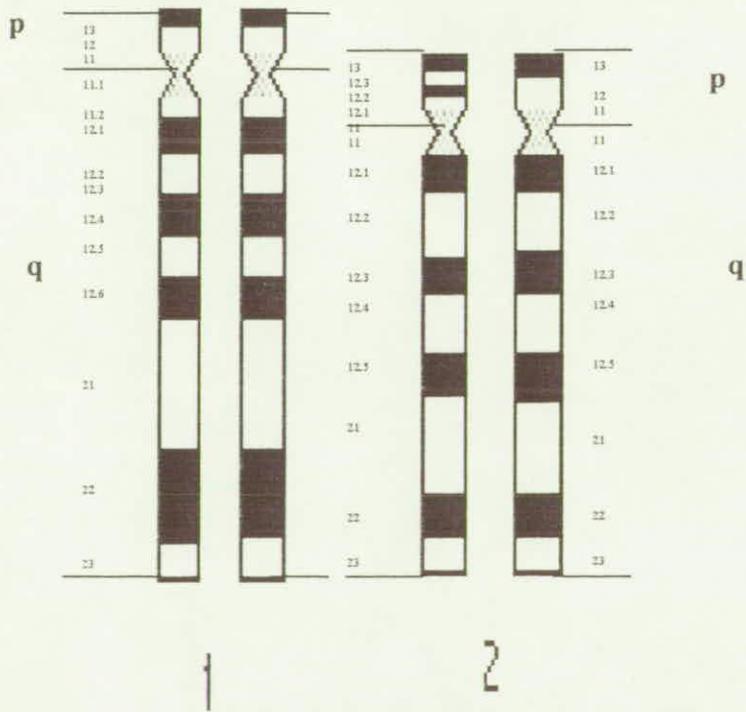


Figura 37. Idiograma parcial. Pares cromosómicos 1 y 2 de vicuña

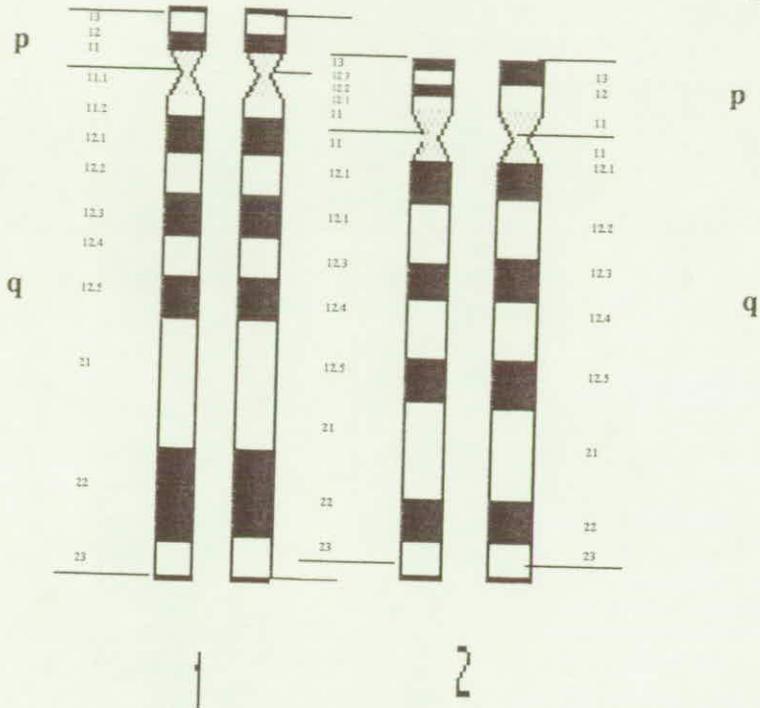
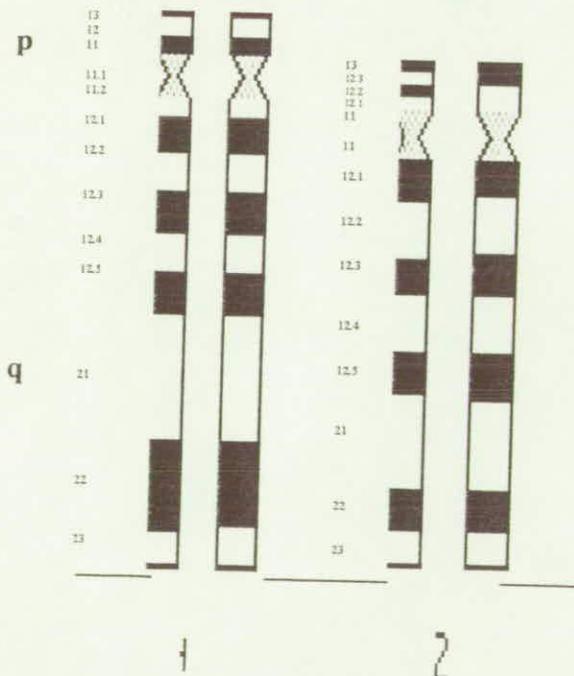


Figura 38. Idiograma parcial. Pares cromosómicos 1 y 2 de alpaca



PROPUESTA DE UN MODELO SOBRE LA PRESENTACIÓN DE POLIMORFISMOS CROMOSÓMICOS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

En el presente estudio se observaron claras diferencias en el patrón de bandeo GTG entre algunos de los camélidos sudamericanos. Estas diferencias no habían sido reportadas previamente y podrían corresponder a varios factores causales, entre ellos están:

Reordenamientos cromosómicos producidos durante la especiación.

Polimorfismos producidos por inversiones paracéntricas durante la evolución cariotípica.

De acuerdo a la información encontrada en la literatura sobre la presencia de polimorfismos cromosómicos en diferentes especies, especialmente al fenómeno que ocurre en el género *Drosophila*; junto con los antecedentes evolutivos de los camélidos sudamericanos, y como se relacionan los cambios cariotípicos con el proceso de especiación, nos permite postular que posiblemente los cambios cariotípicos observados correspondan a polimorfismos producidos por inversiones paracéntricas.

Sin embargo es posible que existan además rearrreglos cromosómicos aún no detectados, ya que una gran parte del cariotipo de los camélidos está constituido por cromosomas de tamaño pequeño y con patrones de bandas poco diferenciados.

El siguiente paso propuesto para estudiar estos polimorfismos y determinar si efectivamente estos corresponden a polimorfismos, a reordenamientos o a ambos es realizar otros estudios al nivel molecular como por ejemplo FISH con sondas teloméricas, dado que las principales diferencias hasta ahora se han encontrado al nivel de los extremos teloméricos de los cromosomas. Lo mismo se ha observado en otras especies como el caso del hamster (Ashley y Ward 1993).

REALIZACIÓN DE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE (FISH), REACTIVOS REQUERIDOS PARA LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA Y EQUIPOS ADICIONALES

Los resultados de los estudios citogenéticos, anteriormente presentados, indican que el camino a seguir para identificar las secuencias involucradas en los rearrreglos cromosómicos observados en los camélidos sudamericanos es la hibridación in situ fluorescente o FISH con sondas de secuencias teloméricas.

La Dra. Teri Lear, especialista en citogenética animal del M.H. Gluck Equine Research Center, del Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Kentucky (EE.UU.), quien cuenta con una amplia experiencia en Zoo-FISH o painting en equinos, recomendó la utilización de sondas teloméricas de caballos. Con estas sondas, en estudios realizados en la U. de Kentucky, ya se han obtenido resultados comparando distintas especies de équidos. La principal característica de estas secuencias teloméricas es su alto grado de conservación en las distintas especies.

Posteriormente, la Dra. Teri Lear envió la secuencia de los partidores, las cuales son:

5' AATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCC3' y
5' TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG3'.

Tales partidores fueron sintetizados y marcados con biotina en el laboratorio Integrated DNA Technologies, Inc., en Estados Unidos y llegaron a Chile en el mes de septiembre.

Otros reactivos encargados a EE.UU, al laboratorio ONCOR, a través de Bioschile, tales como: Propidium Iodine/Antifade, 10x PBD, FITC Avidin Antibody, llegaron a Chile a mediados del mes de diciembre.

Se compró además, pero dentro del país, un reactivo bloqueante y ácido maleico, tal como indicaba el protocolo de hibridación *in situ* con oligos sintéticos, en este caso secuencias teloméricas.

En cuanto a equipos, fue necesario adquirir una microcentrífuga y un termómetro digital de alta precisión. Ambos fueron comprados durante el mes de Enero de 1999.

Cultivo de linfocitos de caballo para ser utilizados como control en la aplicación de FISH.
Se obtuvo dos muestras de sangre de caballo para el cultivo de linfocitos. Se realizaron las mismas técnicas utilizadas en camélidos, ya descrita en informes previos.

Con el pellet obtenido se prepararon láminas para FISH y se mantuvieron almacenadas a -20°C antes de ser utilizadas en el FISH.

Realización de FISH en metafases de llamas, alpacas, guanacos, humanos, y de caballos (controles), utilizando como sonda secuencia teloméricas de caballos.

Para la realización de FISH con sondas teloméricas se utilizó como base el protocolo enviado por la Dra. Teri Lear de la Universidad de Kentucky, el cual se incluye como ANEXO 2. Consta de dos partes: preparación del DNA "carrier" esperma de salmón y de la sonda liofilizada, y en la segunda la preparación de la sonda y láminas para hibridación.

Durante el mes de Diciembre se prepararon las soluciones stock (ANEXO 2, parte II del protocolo de hibridación *in situ*) y se realizó FISH a fines de Diciembre y durante el mes de Enero.

Hasta el momento se han realizado sólo dos intentos de hibridación y FISH utilizando los protocolos del ANEXO 2. Estos ensayos preliminares se realizaron en 4 muestras de guanaco, 3 de llama y controles de caballo y humano.

Esta escasa experiencia, sin resultados positivos de hibridación aún, justifica la realización de nuevos experimentos que permitan ajustar la técnica y determinar el grado de hibridación logrado con las sondas propuestas por la Dra Lear. Las modificaciones a la técnica más evidentes, tienen relación con oscilaciones térmicas durante la denaturación, que podrán ser controladas más exactamente en la medida que se cuenta con algunos equipos de precisión como termómetro y microcentrífuga.

RESUMEN y CONCLUSIONES

Diversos estudios han descrito similitud cariotípica y una completa homología del patrón de bandas C y G entre los miembros de la familia *Camelidae*, por lo que se ha postulado que este es un caso extremo de conservantismo cromosómico en mamíferos. Técnicas citogenéticas actuales han mejorado la resolución de patrones de bandas cromosómicas, permitiendo una mayor exactitud en los análisis. Estos métodos no han sido aplicados en estudios cariotípicos de camélidos sudamericanos (CSA), por lo que el objetivo de este estudio fue diferenciar a los CSA mediante el análisis de su cariotipos utilizando técnicas de bandeado G de alta resolución.

Se elaboró un idiograma parcial y completo en base a 510 cariotipos con patrón de bandas G y C a partir de 22 guanacos (*Lama guanicoe guanicoe*), 9 llamas (*Lama glama*), 10 vicuñas (*Vicugna vicugna mensalis*) y 10 alpacas (*Lama pacos*), procedentes de diferentes regiones de Chile. Los resultados mostraron que los CSA poseen igual $2n=74$; similar morfología al comparar el Índice Centromérico ($p>0,05$) y longitud relativa ($p>0,05$), e idéntico patrón de bandas C. Sin embargo, se observaron diferencias en el patrón de bandas G a nivel del brazo corto del par cromosómico 1 y 2. En el par 1 guanacos y llamas presentaron una banda G oscura terminal (1p13), mientras que vicuñas y alpacas presentaron una banda G clara terminal (1p13) y una oscura intersticial (1p12). En el brazo corto del par 2 se observó un patrón de bandas G heteromórfico en todas las vicuñas, alpacas y llamas estudiadas, encontrándose en uno de los cromosomas homólogos una banda G oscura terminal (2p13), y en el otro, dos bandas G oscuras (2p13 y 2p12.2) separadas por una G clara (2p12.3). El guanaco no presentó tal heteromorfismo, existiendo en ambos cromosomas homólogos una banda G oscura terminal (2p13).

Las diferencias en el patrón de bandas G del par 1 sugieren que ocurrió una inversión paracéntrica probablemente durante la diferenciación cariotípica de *Lama* y *Vicugna* a partir de *Hemiauchenia*. Las similitudes cariotípicas entre las especies de CSA sugieren mayor cercanía filogenética entre guanaco y llama y entre vicuña y alpaca. El polimorfismo aparentemente fijo observado en vicuñas, alpacas y llama indicaría una forma de adaptación cariotípica al ambiente en que evolucionaron. Tal polimorfismo no se encontró en guanacos, probablemente dado que la subespecie estudiada evolucionó bajo circunstancias diferentes en el extremo sur del Continente.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos en estudios moleculares recientes. En el futuro, se propone el uso de la citogenética básica de alta resolución complementada con métodos moleculares, para identificar polimorfismos o rearrreglos cromosómicos aun no detectados.

CONCLUSIONES

Los camélidos sudamericanos son un grupo que presenta $2n=74$, posee 20 pares cromosómicos subtelocéntricos y 16 metacéntricos -submetacéntricos. El cromosoma X es el metacéntrico más grande y el Y el único telocéntrico.

Presentan similar patrón de bandeo C, comprometiendo la región del centrómero y el brazo p, excepto los pares 21, 22, 23, 24 y 25, en los cuales sólo se bandea la región centromérica.

El patrón de bandeo G grueso es similar, no obstante, existen diferencias finas entre las especies domésticas y las formas silvestres.

La vicuña es indiferenciable cariotípicamente de la alpaca, y el guanaco es más parecido cromosómicamente a la llama que a los otros camélidos sudamericanos.

Las afinidades cromosómicas entre las especies de camélidos sudamericanos domésticos y silvestres son coincidentes con recientes estudios filogenéticos utilizando de secuencias del gen citocromo *b* y marcadores moleculares SSR y RAPD.

Se confirma el alto grado de conservantismo cromosómico, entre los CSA ya que se encuentran sólo diferencias finas, si se compara con grupos taxonómicos relacionados entre los artiodáctilos.

IMPLICANCIAS

Los resultados sugieren que los cambios cromosómicos detectados entre *Lama* y *Vicugna* ocurrieron a partir de la diferenciación del género *Hemiauchenia* en el Pleistoceno.

La vicuña es indiferenciable cariotípicamente de la alpaca, y el guanaco es más parecido cromosómicamente a la llama que a los otros camélidos sudamericanos, coincidiendo con las teorías de especiación que consideran que la alpaca derivaría de la vicuña y la llama del guanaco.

En estudios futuros sería de gran relevancia utilizar técnicas moleculares, como hibridación in situ con secuencias de DNA conocidas como el FISH o "painting" o ZOO-FISH, tendientes a pesquisar rearrreglos cromosomales aún no encontrados.

ASPECTOS METODOLOGICOS

CAPTURA DE ANIMALES SILVESTRES

PROCEDIMIENTO DE SUJECIÓN DE LOS ANIMALES

Inmovilización

Química (animales libres):

Los animales fueron inmovilizados mediante el uso del sedante Xilazina (Rompún^{MR}, Bayer) o del anestésico Tiletamina Zolazepam (Telazol^{MR} y Zelazol^{MR}) a través del disparo de dardos con el rifle hipodérmico, fueron seguidos hasta que el producto hiciese efecto. Una vez que el animal estuviese bajo el efecto sedante de la droga, se procedió a cubrir la cabeza con una caperuza y a amarrar las patas delanteras como medida de seguridad.

Directa (animales en cautiverio):

En terreno se procedió a la sujeción del animal por la cabeza y se colocó una capucha de género, que impide la visión, lo cual tranquiliza al animal, permitiendo su manipulación; posteriormente se procede a la inmovilización utilizando la técnica del enchacado (ver anexo 1), el cual consiste en un tipo de amarre con cuerdas de fibra de llama o *chaccu* que permite que el animal permanezca sobre su esternón en la misma postura de descanso.

TÉCNICA DE MUESTREO Y TOMA DE DATOS

Análisis sanguíneos:

Se obtuvo 20 ml de sangre por animal por venipuntura yugular. Este volumen de sangre fue distribuido en 2 tubos Venoject de 5 ml con EDTA como anticoagulante y otros 2 con Heparina. En terreno se midió la glicemia mediante Glucometer y tiras reactivas (Bayer^{MR}) y se realizaron frotis sanguíneo, para el posterior recuento diferencial de leucocitos. La sangre obtenida con heparina fue centrifugada a 3.5000 r.p.m., por 20 minutos, luego de lo cual se separó el plasma en tubos eppendorf y congeló a -20°C . Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un laboratorio veterinario comercial, el cual reportó los resultados del perfil bioquímico de cada animal. Las variables estudiadas fueron: nitrógeno ureico sanguíneo (mg/dl), creatinina (mg/dl), GPT (μl), GGT (μl), fosfatasa alcalina (μl), bilirrubina total y directa (mg/dl).

El frotis sanguíneo realizados en terreno se fijaron en metanol y luego fueron enviados a un laboratorio comercial donde se realizó el recuento diferencial de leucocitos.

Con las muestras obtenidas con EDTA se realizaron los siguientes procedimientos: 1 tubo de 5 ml se almacenó a 4°C para la posterior extracción del DNA en el Laboratorio de Biotecnología de La Platina (INIA). Del tubo restante se midió el Volumen Globular Aglomerado (VGA) con el método del macrohematocrito, centrifugando la muestra de sangre a 3.500 r.p.m por 20 minutos. Además se realizó el recuento total de glóbulos blancos utilizando el método del hemocitómetro.

Estos análisis se llevaron a cabo en las muestras provenientes de guanacos de la I, II y III región, y vicuñas de la II y III región.

Análisis de Fibra:

Se cortó 10 cm² de fibra a nivel medio de la última costilla lo más cercano a la piel, para no modificar la longitud de la muestra.

La longitud de fibra y pelo se obtuvo a través de un promedio de 10 mechas y 10 pelos, respectivamente, expresándose en cm (Bas *et al.*, 1995).

La finura se determinó en un lanómetro de proyección Reichter, del Laboratorio de Microscopía del Departamento de Zootecnia de la Pontificia Universidad Católica de Chile, mediante la medición de un mínimo de 150 fibras por muestra, y se expresó en micras (μm). Se registró presencia de medulación y tipo: *continua*, *discontinua* y *fragmentada*, y presencia de pelos ($>40 \mu\text{m}$ para el caso de guanacos y $>30 \mu\text{m}$ para vicuñas), expresados como porcentaje del total (Bas *et al.*, 1995).

Estos análisis se llevaron a cabo en las muestras provenientes de guanacos de la I, II y III región, y vicuñas de la II y III región.

Medidas Zoométricas:

Para identificar a los ejemplares, se procedió a sexar, estimar la edad mediante consulta con el encargado si el animal estaba en cautiverio, a clasificarlo de acuerdo a cronología dentaria (vicuñas) o a través del desarrollo corporal (cría, juvenil, o adulto). Posteriormente el animal fue pesado con una balanza de reloj (máximo $50 \pm 0,25$ kg) para el caso de las vicuñas y guanacos de baja edad. Paralelamente se tomó el perímetro torácico para realizar correlaciones con el peso o estimarlo.

Esta información se obtuvo a partir de todos los animales capturados.

VICUÑAS

Se obtuvo muestras para análisis de DNA de las dos subespecies existentes en Chile: *Vicugna vicugna mensalis* (I región) y *Vicugna vicugna vicugna* (II y III región).

I Región

Captura de vicuñas por persecución de grupos a corral manga:

Durante 1997 y 1998 se realizaron tres trabajos de terreno por un total de 14 semanas (4 semanas en marzo, 6 en noviembre y 4 en noviembre de 1998) en la Reserva Nacional Las Vicuñas, específicamente en un área de aproximadamente 35 km² (pampa Vicuña), ubicado a un costado del Salar de Surire. En dicho trabajo se identificó sectores de captura, construyó mangas y corrales de captura. Se montó un laboratorio de muestreo sanguíneo en las instalaciones del complejo minero Quiborax y se tomó muestras de sangre para los estudios genéticos.

Arreo y Acopio:

El método de arreo consistió en la persecución mediante vehículos motorizados (2 camionetas y 4 motos) de grupos familiares o de machos solteros guiándolos hacia un corral trampa ubicado en el lecho de un riachuelo seco (Figura 1).

Corral trampa:

El ingreso al corral se dispone a través de un cercado (Figura 2) de dos brazos fijos de 300 m (cercos) que se abren hacia el extremo opuesto en un ángulo de 30° a 40° que sirven como embudo. El corral trampa en sí está construido de postes de madera y malla ursus de 1,8 m, recubierta con malla raschel. El área de manejo (manipulación) se encuentra tapizada de madera terciada de una altura de 2 m, a la cual los animales acceden por medio de un pasillo, siendo presionados por un brazo móvil de malla ursus y raschel (Figura 3).

Figura 39. Modo de acceso de los grupos hacia el corral trampa.

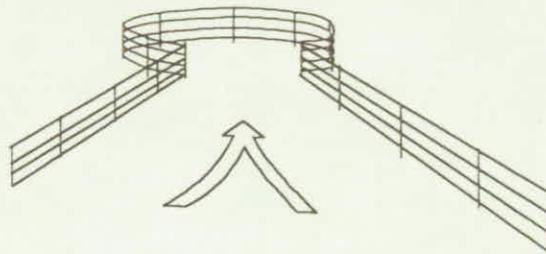


Figura 40. Esquema de la vista lateral del cerco que conduce al corral trampa (CONAF, 1999)

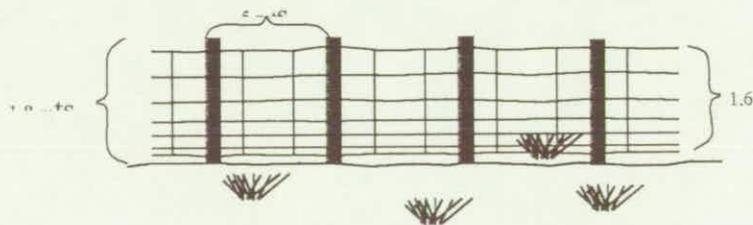
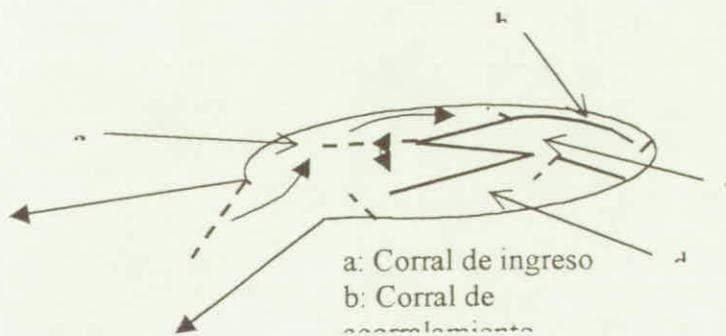


Figura 41. Esquema general de planta del corral trampa indicando sus partes.



Personal:

La persecución requirió de 6 conductores (2 camionetas y 4 motos), además del personal a pie, que consistió de 8 personas que apoyaban la entrada al corral. El muestreo utilizó a las mismas 8 personas más los choferes de los vehículos que colaboraron en la inmovilización individual de los animales.

Captura de vicuñas mediante inmovilización química:

En junio de 1999 se realizó una visita al altiplano de la I región, específicamente los sectores aledaños al Parque Nacional Lauca por el sector de Cauquena. Para la captura se utilizó un rifle hipodérmico Telinject^{MR} modelo VARIO 4V.310 (5 – 70 m), dardos Telinject^{MR} de 3 cc. Como sedante se usó Zilaxina (Rompún^{MR}, Bayer) en dosis de 7 mg/kg PV, la cual había sido efectiva en la inmovilización de guanacos en la misma región. La técnica de disparo fue desde la camioneta a grupos cercanos al camino.

II Región

Muestreo de vicuñas en cautiverio:

Se realizaron los contactos respectivos con el SAG a nivel Central y con la Oficina regional de Antofagasta y Sectorial de Calama. Gracias a lo anterior se visitó la región en marzo de 1999 y se muestreó un total de 4 vicuñas mantenidas en cautiverio en las siguientes localidades:

Talabre (cerca de Toconao), a 190 km. de Calama, una vicuña.

San Pedro de Atacama, a 120 km. de Calama, una vicuña.

Chunchuri bajo, a 4 km. de Calama, una vicuña.

Ollagüe, a 214 km. de Calama, una vicuña.

III Región

Muestreo de vicuñas del zoológico de Quilpue:

Se obtuvo información a partir del SAG Central sobre la existencia de ejemplares en el Zoológico de Quilpúe (V región) correspondientes a vicuñas de la región de Atacama, específicamente animales provenientes del altiplano de Copiapó y que eran mantenidas en cautiverio por particulares. Para obtener muestras de sangre para análisis de DNA se realizaron los contactos con el Administrador del establecimiento y se visitó el lugar en marzo de 1999. En dicha ocasión se muestreó a 2 vicuñas de la subespecie buscada (*V. v. vicugna*) y un híbrido entre esta subespecie y *V. v. mensalis*.

GUANACOS

Se logró obtener muestras para análisis de DNA de poblaciones de guanaco correspondientes a las tres subespecies descritas en Chile: *Lama guanicoe cacsilensis* (I región), *Lama guanicoe huanacus* (II y III región) y *Lama guanicoe guanicoe* (XII región).

I Región

Captura de guanacos mediante inmovilización química:

Se realizó una excursión en junio de 1999 a los alrededores de Putre, Región de Tarapacá. Se capturaron los animales (3 ejemplares machos) en colaboración con la Corporación Nacional Forestal.

Para la captura se utilizó un rifle hipodérmico Telinject^{MR} modelo VARIO 4V.310 (5 – 70 m), un rifle hipodérmico neozelandés y dardos Telinject^{MR} de 3 cc. Como sedante se usó Zilaxina (Rompún^{MR}, Bayer) en dosis de 7 mg/kg PV. Se usó además Tiletamina Zolazepam (Telazol^{MR} y Zelazol^{MR}) en dosis de 5 mg/Kg PV (Sarno *et al*, 1996).

La técnica de disparo del dardo fue mediante la persecución directa, ya que el acecho no tuvo buenos resultados. En terreno se identificaron grupos cercanos al camino, procediendo a la preparación inmediata del dardo. Posteriormente el personal preparado procedía al acercamiento directo a los animales hasta alcanzar una distancia de tiro adecuada para el rifle (20 – 40 m). El dardo era dirigido hacia las partes del cuerpo con mayor masa muscular (piernas).

II Región

Muestreo de guanacos en cautiverio:

Se realizaron los contactos respectivos con el SAG a nivel Central y con la Oficina regional de Antofagasta, lo cual permitió conocer la existencia de una ejemplar cría hembra en el Centro de rescate de Antofagasta, a cargo de la Universidad de Antofagasta, el SAG regional y la empresa minera La Escondida. La ejemplar se muestreó en marzo de 1999.

III Región

Muestreo de guanacos en cautiverio:

Se realizaron los contactos respectivos con el SAG a nivel Central y con la Oficina regional de Copiapó y Sectorial en Vallenar, lo cual permitió conocer la existencia de una gran masa de guanacos mantenidos en cautiverio (alrededor de 25 ejemplares). Para el muestreo se organizó una vista en conjunto con personal del SAG a tres sectores aledaños a Vallenar: las quebradas de Alto del Carmen y El Tránsito, ubicadas hacia la cordillera, y el sector de Ventana, hacia la costa de la misma ciudad.

Lo anterior permitió el muestreo de 14 ejemplares de guanaco, tres de los cuales pertenecían al ecotipo de la costa.

IV Región

Captura de guanacos mediante inmovilización química:

En enero de 1999 se apoyó en la captura de guanacos en la cordillera de la IV región (interior de Illapel) debido al desarrollo de un estudio de evaluación de impacto ambiental solicitado por la Minera Los Pelambre y que es ejecutada por el Centro de Ecología Aplicada (CEA).

Los integrantes del CEA habían visitado el sector en varias ocasiones, determinando sectores para la construcción de escondites.

En la campaña de captura se utilizó 2 rifles hipodérmicos CAPCHURE^{MR} de un alcance aproximado de 20 m, y 3 rifles TELINJECT^{MR} modelo VARIO 4V.310 de alcance entre 5 y 70 m. El procedimiento inicial fue el acecho desde los escondites y posteriormente la persecución en vehículo motorizado (motos de 4 ruedas).

Como sedante se usó Xilazina (Rompún^{MR}) en dosis de 3 mg/kg de p.v. y dardos de 3 ml de capacidad.

XII Región

Muestreo de guanacos en cautiverio:

Se obtuvieron muestras de animales provenientes del proyecto PUC-FIA N° 056/94 "*Estudio de la adaptación y manejo en semicautiverio del guanaco en la zona central*", los cuales fueron capturados durante los años 1996 y 1997 en Tierra del Fuego, XII región, a la edad de aproximadamente 1 mes, y que posteriormente, fueron criados artificialmente y trasladados a la Estación Agro-UC de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, ubicada en Pirque, Región Metropolitana.

OBTENCIÓN DE DNA DE CSA

Obtención de sangre:

Se realizaron tomas de muestras tanto en el CRI de Kampenaike (Punta Arenas) como en el CRI de Hidango (Sexta región). Para estos efectos se realizaron extracciones de sangre desde la vena yugular. En aquellos casos en que el acceso a ésta vena fue dificultado por la abundancia de lana en la región, se obtuvo sangre desde la vena femoral, para lo cual se necesitó "sentar" al animal y presionar el extremo distal de la vena la que se hace notablemente visible y fácil de punzar.

Las muestras fueron colectadas en tubos Venojet de 8 ml que contenían EDTA como anticoagulante. La sangre fue mantenida a 4°C usando "coolers" portátiles, desde que era colectada en terreno hasta su procesamiento en el laboratorio.

Obtención de DNA:

Se preparó DNA a partir de leucocitos (células nucleadas) de sangre periférica, recurriendo al siguiente protocolo de extracción:

Aislamiento de Leucocitos:

Se utilizó un volumen aproximado de 5 ml de sangre total, la que fue mezclada con un volumen igual de cloruro de amonio 0,2 M. Esto permitió romper los glóbulos rojos en forma suave. Posteriormente se procedió a centrifugar a 2.000 rpm (centrífuga Kubota 1700, rotor RA 150AM) en condiciones refrigeradas para decantar los leucocitos.

Luego se descartó el lisado (fase superior) y los leucocitos fueron resuspendidos en 3 ml de cloruro de amonio 0,2 M. Se centrifugó nuevamente para decantar los leucocitos y se repitió el mismo procedimiento varias veces (4 a 5), hasta tener un "pellet" leucocitos limpio de glóbulos rojos. Finalmente el "pellet" de linfocitos fue resuspendido en 3 ml de buffer STE (NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5), agregándose 250 µl de una solución de proteinasa K (10 mg/ml) y 250 µl de SDS 20%. Se mezcló bien y se incubó a 37°C por toda la noche.

Extracción del DNA (en micro-tubos):

Se agregaron 500 µl de una solución saturada de cloruro de sodio, mezclándose bien y centrifugando inmediatamente a 7.000 rpm en centrífuga Kubota (1.700, rotor RA 150AM) por 10 a 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue rápidamente traspasado a un nuevo tubo, evitando arrastrar algo del "pellet". Se agregaron dos volúmenes de etanol frío, dejándose precipitar el DNA durante 15 minutos en hielo. El DNA fue colectado utilizando puntas de micropipeta estériles, dejando escurrir el etanol y secando el precipitado al aire o en una Speed-Vac. Finalmente, el DNA fue resuspendido en aproximadamente 500 µl de agua destilada estéril o buffer TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0), almacenándose a 4°C (períodos cortos) o a -20°C (períodos prolongados).

El estado de integridad de DNA extraído, así como una estimación de su concentración, se realizaron tomando alícuotas de las extracciones y observándolas en geles de agarosa al 0,8%, preparados en TBE 1X y corridos a 100 Volts. Se usó como estándar de peso molecular DNA el fago lambda sin digerir y digerido con la enzima HindIII (disponible comercialmente).

Purificación del DNA:

En aquellos casos en que la extracción de DNA produjo una muestra contaminada con restos de material orgánico, se procedió a realizar una purificación de dichas muestras como se menciona a continuación:

Se agregó un volumen igual de una mezcla de extracción para ácidos nucleicos denominada solución PCI, consistente en una razón 25:24:1 de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. Se agitó en forma energética por 1 minuto y se centrifugó por 2 minutos a 10.000 rpm en una micro-centrífuga Eppendorf. La fase superior (que contiene el DNA) fue transferida a un nuevo tubo, para lo cual se utilizaron puntas desechables que tenían un orificio grande, para evitar la ruptura mecánica del DNA. Se repitió esta extracción con PCI hasta obtener una fase superior cristalina. Posteriormente se realizó una extracción usando una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) en lugar de PCI.

Al igual que en las etapas previas, posterior a mezclar y centrifugar se recolectó la fase superior. Para precipitar el DNA, se agregaron 1/10 v/v de cloruro de sodio 2,5 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA fue colectado usando puntas de micro-pipetas limpias, dejando escurrir el etanol y secando el precipitado. Finalmente, el DNA fue resuspendido en 500 µl de agua destilada o en buffer TE y almacenada como se mencionó anteriormente.

DESARROLLO DE MICROSATÉLITES EN CSA

Preparación de genoteca de CSA:

En general, los protocolos relacionados con la manipulación de DNA, se realizaron de acuerdo a Sambrook y colaboradores (1989), pero siguiendo algunas recomendaciones realizadas por el Dr. Ernest Bailey, del Maxwell H. Gluck Equine Research Center, Universidad de Kentucky. El protocolo consistió en digerir DNA genómico de CSA y el vector de clonación con una enzima de restricción adecuada, para luego ligar ambos y transformar bacterias competentes. Las bacterias transformadas se seleccionaron de acuerdo a la resistencia a antibióticos, aportada por genes que llevan los vectores de clonamiento, como el gen de la lactamasa que otorga resistencia a ampicilina.

Para la digestión del DNA genómico, y con el fin de obtener una genoteca representativa, se hizo un "pool" con varias muestras de DNA de alpacas. Se tomaron 5 µl de cada una de las muestras de DNA de alpaca (52 muestras en total), completando aproximadamente 300 µl de DNA. Posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X, utilizando 5 µl de este "pool", para revisar el estado de calidad e integridad del DNA. Luego se hicieron diluciones apropiadas (5 µl de DNA en 1 ml y 15 µl de DNA en 1 ml) para medir la concentración del DNA. A continuación se procedió a digerir éste DNA genómico con BamHI. Como ésta enzima no cortaba eficientemente el DNA genómico, se utilizaron otras dos enzimas que originan extremos cohesivos con BamHI: Bgl-II y Bcl-I (Boehringer Mannheim). Se dejó en digestión durante la noche (15 horas) a 37°C. Enseguida, el DNA digerido fue separado en un gel de agarosa (de bajo punto de fusión) al 1%, TBE 1X, a 40 Volts por 2 horas. Este tiempo, suficiente para separar bien todos los fragmentos originados. Se procedió a cortar el sector de agarosa donde migran aquellos fragmentos de tamaño entre 500 a 700 pb, tamaño determinado por las facilidades de secuenciar ambas hebras sin necesidad de subclonamientos adicionales. Para extraer el DNA de la agarosa, se utilizó un sistema comercial de Promega, diseñado para estos efectos (Wizard PCR Preps). Una vez purificados los fragmentos desde la agarosa, se procedió a analizarlos de nuevo en un gel de agarosa, para verificar que se había cortado el fragmento correcto en el gel.

El vector usado para construir la genoteca parcial de alpaca fue pLITMUS 28, obtenido de New England Biolabs; éste fue digerido con la enzima BamHI (sitio único de corte en el vector), que genera un sitio compatible con Bgl-II y Bcl-I. En algunos experimentos, el vector fue tratado con la enzima CIAP (New England Biolabs), para eliminar el grupo fosfato del extremo 5' y prevenir de esta forma su auto-ligación.

La ligación se realizó incubando diferentes razones estequiométricas de DNA de alpaca (insertos) con DNA de vector (entre 1:1 y 1:5). La mejor razón se determinó de acuerdo al número de colonias transformantes totales, y a la proporción de colonias blancas respecto de las azules (recombinantes v/s no recombinantes, respectivamente). El protocolo utilizado para la ligación se basó en usar alternadamente temperaturas óptimas para la alineación de los sitios complementarios (4°C) y temperaturas óptimas para la actividad de la enzima T4 DNA ligasa (37°C) [Lund, A.H., Duch, M. y Peders, F.S. (1996). "Increased cloning efficiency by temperature-cycle", *Nucleic Acids Res.* 29(9):800-801]. La incubación de la mezcla de ligación se realizó en un aparato de PCR, utilizando un programa que consistió en varios ciclos (16 horas) entre incubaciones a 10 grados por 30 segundos y 30 grados por 30 segundos. La mezcla de ligación fue: vector digerido (tratado o no con CIAP, 1 µl); DNA genómico digerido, de tamaño aproximado entre 500-700 pb (1 µl); Buffer 10X (1 µl); T4 DNA ligasa (Boehringer, 1 µl), y finalmente agua destilada (csp 10 µl).

Diferentes alícuotas de estas mezclas de ligación se usaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5-α, preparadas especialmente para ser electroporadas. Para ello, se preparó un inóculo durante la noche, que fue crecido hasta una absorbancia de aproximadamente 0.4 unidades de densidad óptica a 600 nm. Estas células se lavaron repetidas veces en agua destilada estéril (centrifugando a 3.000 rpm en centrifuga Heareus Sepatech Suprafugue 22, rotor 22.3), y finalmente fueron resuspendidas en una solución fría de glicerol al 10%. La electroporación se realizó por una

descarga única de 2,5 kV, usando cubetas de 0,2 cm (12,5 kV/cm). Alternativamente se utilizaron para la transformación el protocolo convencional de "shock térmico", usando células (bacterias) comerciales para transformar (Epicurian Coli supercompetent Cells, de Stratagene).

La selección de las bacterias transformada para ambos casos fue igual, para lo cual las transformantes fueron crecidas en placas de cultivo, posterior a un período de aclimatación en caldo LB por 1 hora a 37°C. Finalmente las bacterias fueron incubadas durante toda la noche a 37°C, en placas de agar LB más ampicilina (50 µg/ml), IPTG y X-gal. Se seleccionaron las colonias blancas, que indican la presencia de un inserto en el vector.

Análisis de la genoteca de CSA preparada en pLITMUS 28:

Del total de las colonias blancas obtenidas, se seleccionaron un número de aproximadamente 30 colonias, para analizar en forma rápida el tamaño de los insertos de DNA de alpaca clonados. Para ello, se aislaron las colonias y se crecieron (en 1 ml de caldo LB) durante la noche. Las bacterias fueron centrifugadas y calentadas para romperlas y de esta forma liberar el DNA. Con una alícuota de estos extractos, se realizó una reacción de PCR, usando los partidores universales de M13, ya que pLITMUS tiene estas secuencias en los flancos del sitio de policlonamiento. La reacción de PCR se realizó en un termociclador MJ Research, conteniendo en cada tubo el DNA templado (2 µl), tampón 10X (2 µl), MgCl₂ (2 mM final), dNTPs 2,5 mM c/u (1,6 µl), partidores a una concentración de 1 µM, Taq polimerasa (0,5 unidades) y agua destilada estéril (csp 20 µl). El programa de amplificación fue como sigue: 5 minutos a 95°C seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minutos a 72°C, terminando con una etapa de 5 minutos a 72°C. Las reacciones fueron cubiertas con una gota de aceite mineral, para evitar la evaporación de la reacción. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2% en TBE 1X, y fotografiados bajo luz UV con película Polaroid 667.

Selección de clones portadores de secuencias de microsatélites (SSR):

La selección de aquellos clones que contenían secuencias de microsatélite se realizó mediante hibridación, para lo cual se utilizó como sonda un oligonucleótido sintético de poly(dA-dC)(dT-dG), de un tamaño de 24-mer, y cuya secuencia corresponde a:
5'-TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG-3'. Este óligo es de Pharmacia Biotech, y corresponde a la misma sonda que ha sido utilizada para detectar secuencias de SSR en equinos. Para la marcación de la sonda, se utilizó un método no radiactivo, basado en la incorporación de digoxigenina. El sistema comercial utilizado se denomina Genius System (Boehringer Mannheim, Cat.N° 1362 372 DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit). La marcación, se realiza con la enzima transferasa terminal, la que incorpora digoxigenina-11-ddUTP en el extremo 3' de la sonda. Para ello, se mezclan 4 µl de tampón de transferasa, 4 µl de solución de cloruro de cobalto, 100 pmoles de oligonucleótido, 1 µl de la solución de DIG-ddUTP y 50 unidades (1 µl) de transferasa terminal, completando a 20 µl con agua destilada estéril. Esta mezcla se incubó a 37°C por 15 minutos y después se deja en hielo. Paralelamente, se mezcla 1 µl de glicógeno con 200 µl de una solución de EDTA 0,2 mM pH 8,0, agregando 2 µl a la reacción anterior para detenerla. El óligo marcado se precipita con 2,5 µl de LiCl 4 M más 75 µl de etanol frío. Se deja reposar a -20°C durante unas dos horas (o 30 minutos a -70°C), y se centrifuga. Luego de lavar el precipitado con etanol 70%, éste fue secado y resuspendido en 20 µl de agua destilada estéril. El óligo marcado se guardó a -20°C hasta el momento de ser usado.

La etapa de análisis de aquellos clones que presentaban secuencias de microsatélites se realizó por duplicado, y todos aquellos clones que presentaron una reacción positiva fueron nuevamente analizados con el fin de minimizar al máximo la selección de falsos positivos. El protocolo utilizado correspondió a aquel recomendado por los distribuidores y que brevemente se describe a continuación:

Las bacterias transformadas fueron crecidas casi a confluencia en placas de LB. Luego que las colonias crecieron a tamaños cercanos a 1-2 mm de diámetro, estas fueron puestas a 4°C por una hora. Membranas de nitrocelulosa fueron puestas sobre las placas por 5 minutos, para transferir las colonias a dichas membranas. Las placas originales (placas maestras) se incubaron a 37°C por 4 horas para recuperar las colonias, y finalmente fueron almacenadas a 4°C. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron puestas sobre placas de agar LB y también fueron incubadas a 37°C por 4 horas. Las colonias presentes en las membranas de nitrocelulosa fueron lisadas colocando las membranas de nitrocelulosa sobre denaturante (NaOH 0.5 N, NaCl 1.5 M) durante 15 minutos, teniendo cuidado de dejar el lado de las donde se encuentran las colonias mirando hacia arriba. Posteriormente las membranas fueron traspasadas a un papel filtro saturado con una solución neutralizante (Tris-HCl 1.0 M, pH 8.0, NaCl 1.5 M) por un lapso de 15 minutos. Finalmente el DNA fue fijado a la membrana por medio de un "crosslinking" con UV o mediante el calentamiento de las membranas a 80°C por dos horas.

Las membranas fueron prehibridizadas por 1 hora a 60°C con una solución que contenía SSC 5X (la solución stock de SSC 20X contiene: NaCl 3 M, Citrato de sodio 300 mM, pH 7.0) más 1% agente bloqueante para DNA, 0.1% de N-lauroylsarcocina y 0.02% de SDS. Luego las membranas fueron hibridadas agregando la sonda poli(TG) en la misma solución de prehibridizado e incubándolas a 60°C por toda la noche. Posterior a lavar las membranas con buffer SSC 2X y 0.5X (dos lavados de 15 minutos cada uno), se procedió al revelado de las membranas.

Para poder visualizar las colonias que presentaban clones positivos para microsatélites, se incubaron las placas con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa. Enseguida se reveló la membrana agregando una solución de NBT (nitroazul de tetrazolio) y una solución de X-fosfatasa (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfatasa) e incubando por varias horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

Aquellas colonias que se colorearon con un precipitado oscuro fueron consideradas positivas y fueron tomadas desde la placa maestra almacenada previamente a 4°C, utilizando mondadientes previamente esterilizados, para luego proceder a cultivar dichas colonias en un medio de agar conteniendo ampicilina (50 µg/µl). La idea era el obtener clones "puros", en condiciones de ser guardados en glicerol 20% según métodos estándares (Sambrook y col., 1989).

Cada uno de los clones seleccionados fue crecido durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio de cultivo líquido (LB) bajo agitación (225 rpm). Tres ml de dicho cultivo fueron utilizados para realizar las extracciones de los plasmidios ("miniprep"), lo anterior se realizó considerando la necesidad de obtener DNA plasmidial (con el inserto de interés), libre de contaminantes que

podieran inhibir la posterior etapa de secuenciación, para ello se utilizó el sistema WizardTM Plus, de Promega (Minipreps DNA Purification System).

El paso siguiente consistió en la realización de las reacciones de secuenciación a cada uno de los clones cuyo DNA fue purificado. Dado que las secuenciaciones se realizaron utilizando el aparato ABI 377 de Perkin Elmer, los reactivos y protocolos usados fueron aquellos recomendados por los fabricantes. El sistema de secuenciación utiliza dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente y la reacción se realiza como una reacción de PCR convencional, consistente en 25 ciclos de denaturación a 96°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 15 segundos y elongación a 60°C por 4 minutos. El sistema utilizado correspondió a ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, que utiliza AmpliTaq R DNA Polymerase (Perkin Elmer). Los partidores utilizados fueron aquellos distribuidos por BioLabs, M13/PUC Sequencing Primer (-47) (24 meros) 5'd(CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC)3'.

Una vez terminadas las reacciones, las muestras fueron protegidas de la luz y purificadas de los dideoxinucleótidos marcados que no fueron incorporados usando columnas Centri-Sep de Princeton Separations (Cat. No. CS-901). Finalmente las muestras fueron secadas en una Speed-Vac por 45 minutos, y finalmente guardadas en oscuridad a -20°C.

Para analizar las muestras en el secuenciador automático, éstas fueron resuspendidas en 6 µl de una mezcla de buffer de carga (20%) y formaldehído (80%), y denaturadas por 3 minutos a 95°C. Los geles de poliacrilamida utilizados fueron aquellos geles denaturantes convencionales con urea, conteniendo una concentración de acrilamida:bis-acrilamida (19:1) de 5%. Se cargaron 2 µl de cada muestra y se corrieron por un lapso de 3 horas y 30 minutos a 51°C.

Todas aquellas muestras que presentaban repeticiones (TG)_n, fueron secuenciadas en ambas direcciones, y dichas secuencias fueron introducidas al programa Oligo (versión 5.0), con el fin de diseñar los partidores adecuados para amplificar el inserto contenido en cada clon. Las características de cada secuencia de microsatélite, así como el tamaño de los insertos clonados se almacenaron en bases de datos.

Amplificación por PCR de secuencias de SSR polimórficos:

La etapa siguiente consistió en la determinación de las condiciones óptimas de amplificación para los partidores diseñados. La determinación de la temperatura de alineación es entregada por el programa Oligo, pero las condiciones de Mg⁺⁺ y pH del buffer a utilizar generalmente difiere para algunos pares de partidores en particular. En este caso se utilizó el sistema de Stratagene, Opti-Prime PCR Optimization Kit (Cat.No.200422), para determinar cual era el pH, concentración de magnesio, potasio o de algún otro aditivo apropiado para facilitar la amplificación de nuestras muestras (DMSO, glicerol o formaldehído).

Sin perjuicio de lo anterior las condiciones estándares de PCR utilizadas para amplificar DNA templado de camélidos consistieron en: una primera etapa de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de una etapa de denaturación por 1 minuto, otra etapa de alineamiento a 55°C (variable entre 45 a 60°C según el partididor) por 1 minuto y una etapa de extensión a 75°C

por un minuto. Como último paso las muestras se mantienen a 75°C por 15 minutos, para finalmente quedar a 4°C hasta su análisis.

Para estudiar el nivel de polimorfismo que es capaz de generar cada uno de estos partidores, se realizó una separación electroforética de los productos de amplificación en geles de mayor resolución (geles denaturantes de poliacrilamida tipo secuenciación). Cuando fue posible la utilización de un secuenciador automático, se realizó un "Genescan", usando uno de los partidores (generalmente el "forward") marcado con un compuesto fluorescente. Con cada par de partidores diseñados se procedió a amplificar un grupo de 36 muestras de DNA de alpaca, para determinar los genotipos de cada uno de los individuos analizados, y también la determinación del polimorfismo presentado por cada uno de los pares de partidores.

En los casos en que no fue posible la utilización del GeneScan, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida denaturante al 6% en cámaras convencionales (para 50 ml de gel, se mezclaron 7,5 ml de acrilamida:bis-acrilamida (19:1) 40%, 10 ml de TBE 10X, 21 gramos de urea, 250 µl de persulfato de amonio 10%, y 90 µl de TEMED, ajustando a volumen final de aproximadamente 65 ml con agua destilada), en TBE 1X. Una fracción de las reacciones de PCR (entre 2 y 5 µl) fue corrida bajo las siguientes condiciones: 65 Watts constantes durante 3 horas 30 minutos. Cabe destacar que para poder visualizar los productos de PCR en estos geles se procedió a usar un protocolo de tinción con plata según lo siguiente:

Dado que los vidrios fueron pretratados con una solución que permite que la matriz de poliacrilamida adhiera a uno de los vidrios, éste fue tratado en una primera etapa de fijación con ácido acético al 10% durante 30 minutos y enseguida, opcionalmente se trató con ácido nítrico al 1% durante 3 minutos. Luego se lavó con agua destilada/desionizada brevemente, y se incubó con una solución de nitrato de plata (1 gramo por litro) durante 30 minutos con agitación suave. Para revelar se utilizó una solución de carbonato de sodio (30 gramos por litro) que contenía 540 µl de formaldehído al 37%. Se agregó una porción del revelador, que se descarta luego de oscurecerse, y luego se agregó el resto del revelador hasta observar la aparición de las bandas de los productos amplificados. La reacción fue detenida con ácido acético al 10% (5 o más minutos).

APLICACIÓN DE RAPD Y AFLP PARA ESTUDIOS GENÉTICOS EN CSA

Amplificación de DNA utilizando partidores de secuencia aleatoria (RAPD):

Esta técnica es una variación del protocolo original de PCR ya que utiliza un partidador único de secuencia aleatoria que puede ser usado para el análisis de cualquier tipo de genoma aunque no se tenga información sobre secuencias de DNA de la misma, (Williams, J. y col. 1990; J. Rafalski Cap.5 1997; S. Milach, 1998; E. Ferreira and D. Grattapaglia, 1996), teniendo como principal ventaja su bajo costo. Estos partidores suelen ser de 10 pares de bases y presentan una temperatura de alineación muy baja, entre 35° y 40°C.

Una de las grandes ventajas de esta técnica es su fácil implementación y ejecución con pocas etapas y una rápida visualización de los resultados mediante geles de agarosa; además se obtiene un buen número de polimorfismos en las distintas especies, de manera que es posible generar una

buena cantidad de "potenciales marcadores". Las limitaciones del RAPD se encuentran principalmente referidas a su baja reproducibilidad entre ensayos, por lo que es necesario que las condiciones de trabajo se mantengan constantes en cada amplificación.

Reacción de RAPD:

Para cada reacción de 15 µl totales se mezclaron en un micro-tubo: 1,5 µl de buffer de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM); 0,9 µl de MgCl₂ 50 mM; 1,2 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM total; 1,0 µl de partidor 10 µM; 0,5 U de Taq polimerasa; 1,0 µl de DNA 10 ng/µl y agua destilada para completar a volumen.

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador MJ Research PTC-100, utilizando un programa que consistió en: una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de tres ciclos a 95°C por 1 minuto, 37°C por 1 minuto y 72°C por 80 segundos. Posteriormente el programa continuaba con cuarenta ciclos a 94°C por 35 segundos, 40°C por 40 segundos y 72°C por 80 segundos. Para terminar con una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos. Los productos de la reacción de RAPD se separaron en geles de agarosa al 1,5% en buffer TBE 1X, corridos a 120 V por 2 a 3 horas. Las bandas de DNA se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron con película Polaroid tipo 667.

Amplificación de fragmentos polimórficos de largo variable (AFLP):

Esta técnica envuelve básicamente tres pasos: el primero consiste en una digestión del DNA genómico y ligamiento de adaptadores, el segundo implica una amplificación selectiva de un "set" de fragmentos de restricción y el tercer paso consiste en un análisis de los fragmentos amplificados en un gel de poliacrilamida tipo secuenciación. La ligación de los adaptadores se hace para facilitar la reacción pre-selectiva, ya que al DNA digerido se le unen secuencias conocidas de oligonucleótidos por ambos extremos de corte que son los que después se utilizan para permitir la unión de los partidores y la selección de las bandas que se busca amplificar para encontrar polimorfismos entre las especies. La amplificación selectiva se realiza utilizando partidores que contienen nucleótidos extras hacia el extremo 3', de manera de restringir el número de bandas que se amplifican a aquellas que los contengan. Normalmente, con estas selecciones se amplifican entre 50-100 fragmentos de restricción que se analizan por geles denaturantes de poliacrilamida.

Para la reacción de AFLP, se siguieron las indicaciones de los proveedores, pero la visualización de las bandas de DNA producto de la amplificación se hizo mediante dos protocolos alternativos: marcación de un partidor de PCR con ³²P-ATP o tinción de plata. Ambos protocolos se describen mas adelante.

Digestión de DNA genómico:

Para cada reacción se agregaron 2,5 µl de buffer de reacción 5X (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; acetato de magnesio 50 mM; acetato de potasio 250 mM); 250 ng de DNA en un volumen menor o igual a 9 µl; 1 µl de una mezcla de enzimas EcoRI/MseI (1,25 U de cada enzima en Tris-HCl 10 mM pH7,4; NaCl 50 mM; EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM; BSA 10 mg/ml; Glicerol 50% v/v; Triton X-100 0,1%) y agua para alcanzar un volumen final de 12,5 µl. Luego de mezclar bien, las reacciones fueron centrifugadas por 1 minuto a 10.000 rpm en una micro-centrífuga y se

incubaron por 2 horas a 37°C. Para inactivar las endonucleasas se incubó la mezcla a 70°C por 15 minutos.

Ligación de adaptadores:

A la mezcla anterior se le adicionan 12 µl de solución de ligación (adaptadores EcoRI, 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' y 5'-AATTGGTACGCAGTC-3' y adaptadores MseI 5'-GACGATGAGT CCTGAG-3' y 5'-TACTCAGGACTCAT-3'); ATP 0,4 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; acetato de magnesio 10 mM; acetato de potasio 50 mM) y 1 µl de T4 DNA ligasa (1 U/µl en Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM). Se mezclaron bien y se centrifugaron por 1 minuto a 10.000 rpm en una micro-centrífuga. Las reacciones se incubaron por 2 horas a 20°C. Posteriormente se realizó una dilución 1/10 de la mezcla anterior agregando buffer TE pH 8,0, el volumen que no se utilizó fue guardado a -20°C, ya que puede ser usado en futuras reacciones de ligación.

Reacción de preamplificación o reacción de PCR+1:

Para esta reacción se mezclaron en un micro-tubo 2,5 µl de dilución 1/10 de DNA; 20 µl de mezcla de partidores (partidor EcoRI: 5'-GACTGCGTACCAATTCN-3'; partidor MseI: 5'-GATGAGTC CTGAGTAAAN-3'); 2,5 µl de buffer PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3; MgCl₂ 15 mM; KCl 500 mM); 0,5 µl de enzima *Taq* DNA polimerasa (1 U/µl) y agua destilada para un volumen final de 25 µl. Se mezcló bien y se centrifugó por 1 minuto a 10.000 rpm en una micro-centrífuga.

La reacción se realizó en un termociclador MJ Research PTC-100, en un programa que consiste en una denaturación del DNA a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, para finalizar con una etapa de extensión a 72°C por 7 minutos. A partir de esta reacción se realizó una dilución 1/50 con buffer TE pH 8,0 y con ésta se prosiguió trabajando.

Marcación del partidor con ³³P-ATP:

Para preparar partidores marcados suficientes para 100 reacciones, se mezclaron 18 µl de partidor EcoRI (27,8 ng/µl), 10 µl de buffer kinasa 5X (Tris-HCl 350 mM pH 7,6; MgCl₂ 50 mM; KCl 500 mM; 2-mercaptoetanol 5 mM), 10 µl de ATP marcado con ³³P (2000 Ci/mmol), 10 µl de agua destilada y 1 µl de enzima T4 polinucleótido kinasa (10 U/µl en Tris-HCl 50 mM pH 7,6; KCl 25 mM; β-mercaptoetanol 1 mM, ATP 0,1 µM; glicerol 50% v/v). La reacción se mezcló bien, y posteriormente fue centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm en una micro-centrífuga, para dejar la reacción incubando a 37°C por al menos una hora. La enzima fue inactivada calentando la mezcla de reacción a 70°C por 10 minutos.

Amplificación Selectiva o reacción de PCR+3:

En esta etapa, los volúmenes que se preparan fueron los suficientes para realizar 10 reacciones. Para lo anterior, se prepararon dos mezclas en paralelo; la mezcla 1 contenía 5 µl de partidor EcoRI marcado y 45 µl de partidor MseI. Para la mezcla 2 se agregaron 79 µl de agua destilada, 20 µl de buffer de AFLP 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,3; MgCl₂ 15 mM; KCl 500 mM) y 0,2 µl de *Taq* DNA polimerasa (1U). Para la mezcla total se agregaron 10 µl de la mezcla 2, 5 µl de la mezcla 1 y 5 µl de la dilución 1/50 de DNA preamplificado.

La reacción de amplificación consistió en una etapa de denaturación del DNA a 94°C por 4 minutos, un ciclo de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 1 minutos; posteriormente el programa proseguía con doce ciclos con disminución de la temperatura de alineamiento en 0,7°C cada vez hasta llegar a los 56°C; seguidos de veinticuatro ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto. Finalmente se realizó una etapa de extensión por 5 minutos a 72°C. Las reacciones fueron visualizadas en geles de poliacrilamida tipo secuenciación al 6%. Los geles fueron precorridos por una hora o hasta que alcanzaran los 50°C. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras fueron denaturadas calentando a 95°C por 5 minutos, utilizando un volumen 1:1 de buffer de carga (Xilen cianol FF 0,025%, Azul de bromo fenol 0,025%, Formamida 98%, EDTA 10mM pH8,0) con muestra de PCR. Los geles fueron corridos a 70 Watts constantes (1800 Volts aproximadamente) por 4 horas y finalmente fueron secados al vacío por 1 hora a 60°C, para ser expuestos sobre una película auto-radiográfica Kodak X-OMAT AR, por al menos un día.

El protocolo alternativo a la marcación con isótopo (tinción de plata) se realizó de acuerdo a Chalhoub y col. (1997). Para ello fue necesario hacer ciertas modificaciones en las concentraciones y volúmenes de partidores que se utilizaron en la reacción de amplificación selectiva; en este caso se mezclaron 30 ng de partidor EcoRI, 30 ng de partidor MseI, 2 µl de buffer PCR 10X, 1 U de *Taq* polimerasa, 5 µl de una dilución 1/10 de DNA de la amplificación preselectiva y agua destilada para alcanzar un volumen final de 20 µl. La metodología para el proceso de tinción con plata fue el mismo utilizado para la visualización de los microsátélites descritos anteriormente. El perfil de bandas obtenidas fue registrado mediante un escáner.

Análisis estadístico para RAPD y AFLP:

Los análisis de los resultados obtenidos por RAPD y AFLP fueron realizados construyendo matrices binarias donde los datos se introducen como diferencias en los bandeos de las cuatro especies de CSA a través de los valores cero y uno. El valor cero indica la ausencia de la banda y el valor uno indica la presencia de dicha banda en la especie en estudio. Una vez que se tiene la matriz, esta se introduce en el programa estadístico NTSYS-pc, que analiza los datos y los entrega ya sea mediante un dendrograma o a través de un análisis de componentes principales (PCA).

Amplificación de una región de secuencia conocida (SCAR):

Para la obtención de este tipo de marcadores fue necesario realizar una serie de etapas previas como son la identificación de un fragmento polimórfico de interés (básicamente, que presente diferencias entre las distintas especies), su purificación, reamplificación, clonamiento, secuenciación del fragmento clonado y diseño de partidores específicos.

Obtención del fragmento de interés a partir de la reacción de RAPD:

Los fragmentos polimórficos seleccionados fueron aislados directamente a partir de un gel de agarosa al 1,5%, luego las bandas obtenidas fueron reamplificaron mediante reacciones PCR convencional utilizando el mismo partidor original. Para verificar la calidad de la reamplificación, las reacciones fueron corridas en geles de agarosa al 1,5%. Aquellas reacciones

que presentaban una única banda amplificada, fueron ligadas en un vector de clonamiento e introducidas en bacterias.

Reacción de ligación:

Las reacciones de ligación fueron realizadas con un "kit" comercial (Promega), para lo cual se necesitó 1 µl de buffer 10X T4 DNA ligasa (Tris-HCl 300 mM pH 7,8; MgCl₂ 100 mM; DTT 100 mM; ATP 10mM); 1 µl de T4 DNA ligasa (3 Weiss U/µl), 1 µl del vector pGEM-T easy (50 ng/µl), agua destilada para volumen final de 10 µl y la cantidad de inserto que se quiera ligar dependiendo del tamaño y considerando la relación 1:1 entre vector e inserto.

Cuando se utilizó el vector pMOSBlue blunt end, en la reacción de ligación fue necesario considerar una primera etapa en la que se debieron rellenar los extremos del inserto a clonar; en esta etapa se mezclaron 1 µl de buffer pk 10X, 0,5 µl DTT 100 mM, 1 µl de mezcla de enzima pk, el inserto dependiendo del número de bases que posea y agua destilada para obtener un volumen final de 10 µl. La mezcla fue incubada a 22°C por 40 minutos y la enzima fue inactivada calentando la solución a 75°C por 10 minutos. La mezcla de reacción para la ligación contenía 10 µl de la solución anterior, 1 µl de vector (50 ng/µl) y 1 µl de T4 DNA ligasa (4 Weiss U/µl). En ambos casos, las ligaciones se dejaron durante la noche a 4°C para asegurar buenos resultados.

Preparación de células competentes DH5α:

Para preparar células competentes se seleccionó una colonia de la cepa DH5α y se dejó creciendo en medio líquido Luria-Broth (LB) (peptona 140 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%) sin antibiótico a 37°C durante toda la noche con agitación. Posteriormente se inocularon 50 ml de medio líquido LB sin antibiótico con 1 ml del cultivo crecido y se incubó a 37°C con agitación por alrededor de 4 horas hasta una O.D. a 600 nm de entre 0,5-0,6 unidades de densidad óptica. El cultivo fue centrifugado en tubos estériles a 400 rpm por 10 minutos (Sorvall rotor 5154). Las bacterias fueron lavadas con agua estéril por tres veces, para finalmente resuspender el "pellet" en una solución de glicerol estéril al 10%. Por último las células fueron alicuotadas en micro-tubos, considerando que se utilizan 40 µl para cada transformación. Las bacterias así tratadas fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

Electrotransformación:

A una cubeta de electroporación se le agrega 1,0 µl de mezcla de ligación y 40 µl de bacterias competentes. La transformación se realizó en un electroporador Gene Pulser™ de Bio-Rad con un shock eléctrico a 2,5 V y 200 ohms por 4,4 mseg. Luego de colocar las cubetas en hielo por un tiempo breve, se les agregó 800 µl de medio SOC (triptona al 2%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM), la mezcla se traspasó a un tubo plástico estéril Blue Max™ marca Falcon y se incubó a 37°C con agitación suave por al menos una hora. Transcurrido ese tiempo, las bacterias fueron esparcidas en placas de LB (medio LB más agar al 1,5%) con carbenicilina 250 mg/ml, X-gal 20 mg/ml e IPTG 0,84 M, incubándolas a 37°C durante toda la noche.

Análisis de las colonias transformantes:

Las colonias transformadas blancas fueron seleccionadas y crecidas en 5 ml de medio LB estéril con carbenicilina 250 mg/ml a 37°C. Aquellos cultivos bacterianos que crecieron, fueron tratados

para la purificación de los plasmidios que contenían el inserto clonado. Para lo anterior se aisló 1 ml en ambiente estéril y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 segundos en una micro-centrífuga, eliminándose el sobrenadante. La obtención del plasmidio se hizo mediante dos protocolos, uno de ellos se basa en una lisis alcalina y el otro utiliza columnas "Wizard® Minipreps Purification System".

Lisis Alcalina:

El "pellet" bacteriano se resuspendió con 100 µl de solución I fría (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0), posteriormente se agregaron 200 µl de solución II recién preparada (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Se procedió a mezclar mediante inversión de los tubos y se dejaron en hielo. Luego se agregaron 150 µl de solución III fría (acetato de potasio 3 M más ácido acético 5 M), se mezcló bien y se dejaron en hielo por 3 a 5 minutos. Después se procedió a centrifugar los tubos a 12.000 g por 5 minutos a 4°C, para finalmente transferir el sobrenadante a un tubo limpio, donde se procedió a realizar una extracción con solución de PCI (25:24:1).

Purificación de plasmidios por columnas "Wizard Plus Minipreps DNA Purification System":

Se utilizó 1 ml de cultivo bacteriano crecido durante la noche y se centrifugó por 1 a 2 minutos a 10.000 rpm en una micro-centrífuga, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando el "pellet" a temperatura ambiente. Posteriormente este "pellet" fue resuspendido con 200 µl de solución de resuspensión (Tris 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, RNAsa A 100 µg/ml), se mezcló y se le agregaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Luego se agregaron 200 µl de solución de neutralización (acetato de potasio 1,32 M), se mezcló por inversión unas cuatro veces y se dejó en hielo. El lisado se centrifugó a 10.000 rpm en una micro-centrífuga por 5 minutos.

El lisado obtenido en el paso anterior fue mezclado con 1 ml de resina Wizard, lo cual fue agregado a una columna Wizard. Luego, se pasaron 2 ml de la solución de lavado (acetato de potasio 80 mM, Tris-HCl 8,3 mM, pH 7,5, EDTA 40 µM, Etanol 55%), se centrifugó la columna por 2 minutos a 10.000 rpm en una micro-centrífuga para eliminar el exceso de solución de lavado. Una vez seca la columna, se le agregaron directamente 50 µl de agua destilada o de buffer TE pH 8,0, se dejó por al menos un minuto y se centrifugó por 20 segundos a 10.000 rpm recuperándose el plasmidio en un micro-tubo. Los clones positivos fueron analizados digiriendo el plasmidio purificado con enzimas de restricción o por PCR con partidores universales tipo M13; para ambos casos, la reacción se visualizó usando geles de agarosa al 1,5%.

Digestión con enzimas de restricción:

Para hacer las digestiones con endonucleasas, se deben buscar aquellas enzimas que sólo presenten un sitio de corte en el plasmidio o que liberen el fragmento insertado y su selección depende del vector que contiene el inserto. Con el vector pMOSBlueT ó "blunt end", para la reacción de digestión de 20 µl totales, se utilizaron 2 µl de Buffer NEB2 Biolabs (Tris-HCl 10 mM pH 7,9; MgCl₂ 10 mM; NaCl 50 mM; DTT 1 mM), 1 µl de Hind III (20 µg/µl), 1 µl de EcoRI (10 U/µl), 3 µl de DNA plasmidial y 13 µl de agua. Con el vector pGEMT easy vector, para la digestión se usó 1 µl de Buffer NEB2, 1 µl de EcoRI (10 U/µl), 3 µl de DNA plasmidial y 5 µl de agua.

Amplificación por PCR de los fragmentos clonados:

La verificación de los fragmentos clonados se realizó amplificando vector con partidores universales M13. Para la reacción de PCR se usaron de 2,5 µl de Buffer PCR 10X, 1 µl de MgCl₂, 0,5 µl de M13 Forward (5'-CAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'), 0,5 µl de M13 Reverse (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGA-3'), 0,5 µl de mezcla de dNTP's 10 mM, 2 µl de DNA plasmidial, 0,2 µl de *Taq* polimerasa (1U) y 18 µl de agua destilada. Esta reacción se hizo en un termociclador MJ Research y el programa consistió en la denaturación del DNA por 2 minutos a 94°C, seguida de treinta y cinco ciclos de 94°C por 1 minutos, 55°C por 1 minutos y 72°C por 1 minutos, y una extensión por 5 minutos a 72°C.

Southern Blot:

La técnica de "Southern blot" consiste en la identificación de un fragmento determinado de DNA mediante la utilización de una sonda marcada específica para ese fragmento; para esto se debe realizar varias etapas como la transferencia de los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa, el marcaje de la sonda y la hibridación con la membrana, la unión del conjugado a la sonda y su detección. En este caso, se utilizó el sistema de Amersham Gene Image™, siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. En resumen El gel de agarosa donde fueron separados los fragmentos de DNA amplificado por RAPD fue tratado con una solución denaturante de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M por 25 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente el gel fue lavado con agua destilada y neutralizado utilizando una solución de NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación. Para la transferencia de los fragmentos de DNA desde el gel de agarosa a la membrana, se utilizó un buffer SSC 10X de un stock 20X (citrato trisódico 0,3M y NaCl 3M), y para fijar el DNA en la membrana, este fue calentado por 2 horas a 80°C.

Marcación de la sonda:

En esta etapa, la sonda fue reamplificada a partir de los fragmentos clonados usando partidores universales M13, según el siguiente protocolo: se mezclaron 2,5 µl de buffer PCR 10X, 1 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5 µl dNTP's 10 mM, 0,5 µl de cada partidore M13 0,96 µM, 1U de *Taq* polimerasa, 2 µl de "miniprep" y agua destilada estéril hasta completar un volumen de 25 µl totales. El programa de amplificación consistió en una denaturación a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minutos, 55°C por 1 minutos y 72°C por 1 minutos, y una extensión a 72°C por 5 min. Los fragmentos se purificaron usando el "kit" Wizard® PCR Preps Purification System siguiendo los protocolos recomendados por los distribuidores.

Purificación de fragmentos de PCR utilizando el kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System:

La purificación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó para un volumen de 50 µl de reacción. En un micro-tubo de 1,5 ml se mezcló la reacción de PCR con 100 µl de Buffer de purificación (Tris-HCl 10 mM pH 8,8, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, tritón X-100 0,1%). A la mezcla anterior se le agregó 1 ml de resina, esta mezcla se pasó lentamente por una jeringa que tenía unida una columna Wizard, se lavó la columna con 2 ml de isopropanol 80% y se centrifugó a 12.000 g por 20 segundos en una micro-centrífuga, para secarla. El DNA se recuperó de la columna agregaron directamente 50 µl de agua destilada estéril y se esperó unos minutos para posteriormente centrifugar la columna a 12.000 g por 20 segundos recogiendo la solución en un

micto-tubo de 1,5 ml. Para marcar la sonda se usaron 10 μ l de la purificación anterior diluidos en 25 μ l finales. El DNA fue denaturado calentándolo a 95°C por 5 minutos y se dejó en hielo hasta que se agregó a la mezcla de reacción. En un tubo aparte se mezclaron 10 μ l de la mezcla de dNTP's marcados, 5 μ l de la mezcla de partidores, agua destilada estéril para completar 50 μ l y 1 μ l de la enzima Klenow (5 U/ μ l); a este tubo se le agregó el DNA ya denaturado. La solución final se mezcló bien y se incubó a 37°C por al menos 1 hora, dependiendo de la calidad del DNA utilizado. Para almacenar la sonda se le adicionaron 2 μ l de EDTA 0,5 M y se guardó a -20°C en oscuridad.

Hibridación de la membrana:

Para la hibridación de la membrana se preparó un buffer que contenía SSC 5X; SDS 0,1%, 5% p/v de dextran sulfato y dilución 1/20 del líquido de bloqueo, la cantidad se calculó considerando el tamaño de la membrana (0,125 ml/cm²), este se precalentó y se le agregó a la membrana dejándola en estufa con agitación constante a 60°C por al menos una hora. Transcurrido ese tiempo, la sonda marcada fue previamente denaturada por 5 minutos a 95°C considerando una concentración de 10 ng/ml de buffer y fue agregada a la solución anterior, dejando en hibridación durante la noche a 60°C. El exceso de sonda marcada fue eliminada de la membrana lavando dos veces por 15 minutos con una solución previamente calentada de SSC 1X y SDS 0,1% considerando 2 ml/cm² de la membrana.

Detección de la sonda:

Para eliminar el exceso de detergente de la solución anterior, la membrana se lavó con un pequeño volumen de buffer A (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 300 mM). Después la membrana fue dejada incubando con 0,75 ml/cm² de solución de bloqueo 1/10 en buffer A por al menos 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se cambió la solución de bloqueo por la solución que contenía el conjugado diluido 5000 veces en buffer A con 0,5% p/v de BSA, previo lavado con buffer A solo, por al menos una hora a temperatura ambiente y agitación. Después se lavó la membrana con 2 ml/cm² de solución al 0,3% de tween 20 v/v preparada en buffer A con agitación constante y a temperatura ambiente por 10 minutos. El paso anterior se repitió 2 veces y el exceso de solución se eliminó con un lavado breve con buffer A. La detección del conjugado de la membrana se realizó en oscuridad, agregándose 500 μ l del reactivo de detección repartiéndolo en forma pareja, incubando por 1 hora con película autoradiográfica Hyperfilm ECL; transcurrido ese tiempo, la película se reveló por unos 5 a 10 minutos, se enjuagó y se colocó en el líquido fijador por unos 10 minutos.

ANÁLISIS CITOGENÉTICO

PROTOCOLO DETALLADO DE LA TECNICA DE HIBRIDACIÓN *in situ* Y FLUORESCENCIA (FISH). (Dra. Teri Lear, M.H. Gluck Equine Research Center, del Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Kentucky, USA, 1999)

Parte I. Preparación del DNA esperma de salmón y de la sonda liofilizada.

Preparación de esperma de salmón

Disolver DNA esperma de salmón (Sigma type III sodium salt) en agua a una concentración de 10 mg/ml, agitando por 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

La concentración de NaCl es ajustada a 0,1 M.

La solución es extraída una vez con fenol y con fenol:cloroformo.

La fase acuosa es recuperada, y el DNA se rompe pasándola 12 veces rápidamente a través de una aguja hipodérmica de 17 G.

El DNA es precipitado agregando 2 volúmenes de etanol frío en hielo.

Luego el DNA es recuperado por centrifugación y disuelto a una concentración de 10 mg/ml en agua.

Se determina la DO_{260} de la solución y se calcula la concentración exacta de DNA.

La solución se hierva por 10 minutos y se guarda a -20°C en pequeñas alícuotas.

Justo antes de usar, la solución es calentada por 5 minutos en un baño de agua hirviendo y luego se enfría rápidamente en agua con hielo.

El DNA esperma de salmón denaturado, fragmentado debería ser usado en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una solución de prehibridación.

Preparación de la sonda:

La sonda se encuentra liofilizada, luego para ser utilizada se debe suspender.

Primer 1: 5' AATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCCAATCCC3', 0,19 mg.

Se suspendió con TE (buffer) hasta alcanzar a una concentración de 10 ng/ μl . Luego de preparada la solución se alícuotó en tubos eppendorf de 1,5 ml y se almaceno a -20°C .

Primer 2: 5' TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG3', 0,64 mg.

Se suspendió con TE (buffer) hasta alcanzar a una concentración de 10ng/ μl .. Luego de preparada la solución se alícuotó en tubos eppendorf de 1,5 ml y se almaceno a -20°C .

Parte II: Preparación de la Sonda y Láminas para Hibridación

Soluciones :

Solución Ácido Maleico: 0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl, pH 7,5 (20°C), ajustado pH con NaOH sólido o concentrado autoclavar y almacenar a 4°C .

Solución Bloqueante stock: disolver 10 g reactivo bloqueante o caseína (B-M) en 100 ml de solución de ácido maleico estéril y almacenar a -20°C .

Solución bloqueante de trabajo para sondas marcadas con biotina: diluir solución bloqueante stock 1 : 2 con solución ácido maleico (concentración final = 5% reactivo bloqueante).

Solución bloqueante de trabajo para sondas marcadas con DIG o FITC: diluir solución bloqueante stock 1:10 con solución ácido maleico (concentración final =1% reactivo bloqueante).

Solución stock de sulfato de dextrano 40%: en agua, autoclave, almacenar a temperatura ambiente.

Solución stock 20 X SSC: pH 5,3, almacenar a 4 °C.

Solución Stock 20 X SSC: pH 7,0 almacenar a 4 °C; filtrar en pequeñas alícuotas estériles para usar dextran sulfato y almacenar a temperatura ambiente.

Solución de trabajo 0,1X SSC , almacenar a 4 °C.

Solución de trabajo 2XSSC, pH 7,0 almacenar a 4°C.

20% Dextran sulfato/ 2X SSC solución de trabajo para hibridación: ver preparación abajo), preparar fresca cada vez que se necesita.

ETOH Series (2) I) 70%, 90% (o 85%), 100% a temperatura ambiente para deshidratar las láminas del frío. II) 2-70%, 1 - 90% (o 85%), 1 - 100% a -20 °C y en hielo para deshidratar las preparaciones después de denaturación.

100% Formamida alícuotada y almacenada a -70 °C (Oncor).

DNA carrier esperma de salmón (ver parte I para el protocolo de preparación)

Sonda (ver parte 1 el protocolo de preparación)

1 X PBD, pH 8,0 a temperatura ambiente. Detergente fosfato buffer, ver reactivas preparados (Oncor). Almacenas a 4°C.

Tinción Propidium Iodide (Oncor/Vysis) solución de trabajo:

Diluir PI en una solución de antifade a una concentración final de 200 ng/ml. Las concentraciones de PI varían dependiendo del fabricante, y usualmente vienen con la solución antifade para la dilución.

Solución de Denaturación: 28 ml Formamida
4 ml 20 X SSC, pH 5,3
8 ml agua destilada
40ml

La concentración final es 50% formamida/2X SSC. Preparar fresco y precalentar a 70 °C en un baño de agua. El pH debe estar alrededor de 7,3, entre 7,0 - 8,0.

Solución de Lavado:

20 ml formamida

4 ml 20 X SSC pH 5,3

16 ml agua destilada

40 ml concentración final es 50% formamida/2XSSC.

Preparar fresco y precalentar a °C en 42 un baño de agua. El pH debe estar alrededor de 6,9 - 7,0.

Procedimiento.

DIA 1

Preparación de la lámina:

Deshidratar las láminas del freezer a -70 °C en series ETOH I. Chequear las láminas que tengan buenas metafases usando microscopio de contraste. Premarcar las mejores áreas observadas con lápiz diamante y envejecer las preparaciones a 55 - 65 °C por 45 minutos. Se puede usar preparaciones frescas, pero es recomendable realizar el paso de envejecer para preservar la morfología.

Preparación de la mezcla de la sonda para un área de 24 x 50 mm

DNA primer 1	20 µl	total 200 ng
DNA primer 2	20 µl	total 200 ng
<u>DNA carrier (esperma de salmón)</u>	<u>2,2 µl</u>	<u>total 20µg</u>
Total volúmenes	42,2 µl	

Mezclar los componentes de la mezcla de la sonda, cfg brevemente, poner en vortex agitar 30 minutos o más. Nuevamente cfg.

Preparar la solución de trabajo Dextran sulfato/solución 2x SSC desde la solución stock previamente autoclavado o filtrado (reducir background).

Precalentar stock Dex sulfato a 42 °C, en 100µl:

50 µl 40% dextran sulfato stock *

10 µl 20 X SSC

40 µl agua estéril filtrada.

100 µl

Colocar en baño de agua a 42 °C en suspensión, luego agitar en un agitador y volver a poner en baño de agua. *Estar seguro que se mida el dextran sulfato cuidadosamente debido a su dificultad de pipetearlo.

Después que la mezcla de la sonda esté completamente homogénea, precipitar la sonda con volumen 1/10 3M NaAcetato y 2 volúmenes de etanol 100%frío. Colocar en -20 °C por 3 horas.

Centrifugar por 30 minutos a 12,000 x g a 4°C (10,000 rpm en cfg), remover el sobrenadante cuidadosamente, lavar el pellet en etanol al 70%, cfg por 10 minutos en 12,000xG, remover el sobrenadante cuidadosamente y secar en secadora al vacío 15 minutos.

Denaturación de las láminas:

Denaturar las láminas por 2 minutos a 70°C, en la solución de denaturación (ver soluciones necesitadas). Denaturar no más de 3 láminas al mismo tiempo. Considerar 1 grado menos de temperatura por cada lámina colocada en el vaso de coplin. Si se denatura 3 láminas a la vez, se debe asegurar una temperatura de 73°C. Usar termómetros calibrados especialmente para FISH dentro del vaso de coplin para testear la temperatura de la solución de denaturación.

Deshidratar las láminas inmediatamente después de denaturar pasando a través de la serie II de etanol frío almacenados a -20°C, por 2 minutos en cada uno. Dejar secar las láminas a temperatura ambiente.

Hibridación:

Precalentar los cubreobjetos en una lámina calentada a 42°C, mientras se secan las láminas y se prepara la mezcla de la sonda con la solución de hibridación. Colocar la formamida alicuotada en el mezclador.

Preparación de la sonda para la hibridación:

Agregar a la mezcla de sonda 11 µl de Formamida 100%, mezclando en vortex por 30 minutos, luego agregar 11 µl de la solución dextran sulfato 20%/ 2X SSC, la cual ha estado a 42°C (desde los 100 µl hechos en el paso 3) y colocar en el mezclador por 20 minutos. Cfg brevemente (concentración final=50% Formamida, 10% dextran sulfato, 1X SSC).

Denaturación de la sonda:

Colocar la mezcla de la sonda con la solución de hibridación en baño de agua a 70°C durante 5 para denaturar la sonda, y enfriar en hielo rápidamente. Cfg brevemente aplicar a las láminas.

Precalentar las laminas a 42°C por unos pocos minutos antes de aplicar la sonda. Colocar 22 µl en cada lamina y cubrir con cubre objeto. Sellar con parafina y colocar en una cámara húmeda a 37°C por 1 a 3 días.

DÍA 2

No permitir que las láminas se sequen durante estos pasos (al menos usando el protocolo de los fabricantes los cuales especifican secar la sonda con aire seco en oscuridad, usualmente sondas painting Vysis). Remover cuidadosamente el sellante y lavar las láminas en 50% Formamida/2XSSC, pH debería estar alrededor de 6,9 - 7,0. Lavar 3 veces por 5 minutos cada vez a 37°C. Se puede colocar el vaso de coplin en un agitador o dejar en baño de agua con agitación periódica de las láminas. Es importante asegurar que la temperatura de la solución dentro del vaso de coplin sea exacta, midiendo con termómetro calibrado para FISH.

Lavar 3 veces a 37°C en 2X SSC, pH 7,0, 3 minutos cada uno. Colocar las láminas en 1 X PBD a temperatura ambiente y proceder a los pasos de bloqueo/ detección/amplificación. Las láminas pueden ser guardadas en 1X PBD a 4°C por más de 2 semanas si fuera necesario.

Detección:

NOTA: Trabajar con luz reducida en los siguientes pasos

Después de los pasos de lavado, colocar 200 µl de la solución bloqueante de trabajo en cada lámina, cubrir con cubre objeto plástico e incubar por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C.

Después de la incubación en la solución bloqueante, eliminar el exceso de líquido de la lámina, y proceder con los pasos regulares de detección con reactivos Biotina Oncor. No es necesario bloquear en los siguientes pasos de amplificación.

Cuando la detección está terminada, aplicar 18 µl de Propidium Iodine (200ng/ml de PI) a las láminas y cubrir con cubreobjetos de 24 x 50 mm. Remover las burbujas de aire. Dejar tiñendo en la oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente.

Pasos de detección de la señal (el mismo protocolo Oncor):

Aplicar 60µl de FITC - Avidina o Texas Red-Avidin, aplicar cubreobjetos plásticos e incubar las láminas en cámara húmeda como es usual por 30 minutos. Lavar en 3 cambios de 1XPBD a temperatura ambiente. Proceder con la contratinción o amplificación de la señal en el paso 16 abajo. Aplicar 60µl de Anti-Avidin Antibody, aplicar cubreobjetos plásticos e incubar como se indica arriba por 15 minutos. Lavar en 3 cambios de 1X PBD a temperatura ambiente. Repetir el paso 15 y proceder con el paso 14 de contratinción.

Modificaciones al protocolo original

Tiempo de incubación: se probó con 1 y 3 días.

Volumen de la sonda: 10 µl, 20µl y 40µl.

GASTOS PROGRAMADOS y GASTOS EJECUTADOS

A continuación se indican el presupuesto solicitado y se compara con el presupuesto gastado efectivamente.

Comparación Presupuesto Solicitado/Real Gastado			
Item	Detalle	Presupuesto Solicitado	Gasto real Total
	PERSONAL	56.796.000	40.430.651
100	SUELDOS	14.880.000	14.700.964
101	HONORARIOS	28.200.000	18.595.847
102	CAPACITACION	13.200.000	6.012.185
104	JORNALES	516.000	934.886
2	OPERACIÓN	44.472.000	67.338.925
105	VIATICOS	5.000.000	5.566.758
110	CASINO	900.000	2.249.328
112	COMB.Y LUBRICANTES	650.000	312.868
113	MAT. USO CORRIENTE	17.700.000	12.463.078
114	MANT. Y REPARACIONES	1.300.000	1.675.992
115	TEXTILES Y VESTUARIO	-	-
116	CONSUMOS BASICOS	672.000	338.498
117	SERVICIOS GENERALES	6.050.000	17.300.260
118	CONTRATOS Y ESTUDIOS	1.700.000	24.604.000
150	ADQUISICIÓN D EEQUIPOS	2.000.000	2.828.143
154	EQUIPOSDECAMPO	8.500.000	-
155	ADQUISICIONGANADO	-	-
200	GASTOSINFRAESTRUCTURA	-	-
	Subtotal	101.268.000	107.769.576
		-	-
	IMPREVISTOS	5.063.400	-
	ADMINISTRACION	7.261.440	10.357.061
	REMANENTE INVESTIGACION	4.050.720	-
	TOTAL	117.643.560	118.126.637
	Termociclador (FIA)		1.669.700
	Total		119.796.337
	Diferencia Presupuestado/real		(2.152.777)
	Porcentaje		-1,83%

Los antecedentes que se presentan indican que el gasto solicitado se excedió en un 1.83 % lo que se explica por no haber considerado los aumentos debido al IPC en la propuesta original.

LITERATURA CITADA

- Alliende, M.A. y Curotto, B. 1997. Curso de Especialización de Citogenética Clínica. Unidad de genética y enfermedades metabólica INTA, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Arnason, U. 1972. The Role of Chromosomal Rearrangement in Mammalian Speciation with Special Reference to Cetacea and Pinnipedia. *Hereditas*, 70: 113-118.
- Baker, R.J. and Bickham, J. W. 1986. Speciation by Monobrachial Centric Fusion. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 83, 8245-8.
- Bianchi, N. 1983. Estudios Genéticos y Reproductivos en Camélidos Sudamericanos. *Revista Ciencia Americana* 23: 28-32.
- Bianchi, N; Larramendy, M.; Bianchi, M. Y Cortés, L. 1986. Karyological Conservatism in South American Camelids. *Experientia* 42: 622-624.
- Birkhäuser, B. 1969. Das Chromosomenkomplement des Wildschweins (*Sus scrofa*). *Separatum Experientia* 25, 778.
- Bisby, F.A. 1995. Characterisation of Biodiversity. In: Global Biodiversity Assessment. Heywood & Watson, R.T. (Eds.) Cambridge University Press.
- Borisy, G.G. and Taylor, E.W., 1967. The mechanism of action of colchicine. *J. Cell Biol.* 34, 525 - 533.
- Brncic, D. 1978. The Ecological Genetics of Endemic Species of *Drosophilas* living in Chile. *Actas 3er Congr. Lat. Genética (ALAG) Montevideo, Uruguay*, 71 - 82.
- Brncic, D. 1985. Polimorfismo Cromosómico, Coadaptación Genética y Especiación en el Género *Drosophila*. In: El Núcleo, los Cromosomas y la Evolución. Fernandez-Donoso (Ed). UNESCO. 196 pp.
- Bukland, R.A.; Fletcher, J.M. and Chandley, A.C., 1976. Characterization of the Domestic Horse (*Equus caballus*) Karyotype using G and C banding techniques. *Experientia* 32, 1146 - 1149.
- Bush, G.L., Case, S.M., Wilson, A.C. and Patton, J. L. 1977. Rapid Speciation and Chromosomal Evolution in Mammals. *Proc. Natn. Sci. USA*, 74, 3942-6.
- Bustanza, J. Y Malaspina, L. 1970. Recuento de Cromosomas en Alpaca, Llama, y Vicuña, mediante el cultivo de Leucocitos. *Anales de la I Convención Internacional de Camelidos Sudamericanos. Puno, Perú.* (abstr)
- Bunch, T.D.; Foote, W.C. Y Maciulis, A. 1985. Chromosome Banding Pattern Homologies and NORs for the Bactrian camel, Guanaco and Llama. *J. Heredity* 76:115-118.

Cabrera, A. 1932. Sobre los Camélidos Fósiles y Actuales de la América Austral. Rev. Museo La Plata, Argentina 33: 89-117. Citado por Wheeler, J.C. 1995. Evolution and present situation of South American Camelidae. Biological Journal of the Linnean Society. 54: 3, 271-295; 5pp.

Cabrera, A, Yepes, J. 1960. Mamíferos Sudamericanos. Buenos Aires , Ediar.

Capurro, L.F. y Silva, F. 1960. Estudios Cromatográficos y Electroforéticos en Camélidos Sudamericanos. Inv. Zool. Chilenas 6: 49-64.

Cardozo, A. 1954. Los Auquénidos. La Paz, Editorial Centenario.

Chiarelli, B. 1962. Comparative Morphometric Analysis of Primate Chromosomes: I The Chromosomes of Anthropoid Apes and Man. Caryologia 15: 99-121. Citado por Seuanez, H.N. 1985. Los Cromosomas Humanos: un Enfoque Evolutivo. En: El Núcleo, los Cromosomas y la Evolución. Fernández-Donoso, R. (Ed.) Unesco.

Clutton - Brock, J. 1989. A Natural History of Domesticated Mammals. Cambridge University Press. British Museum (Natural History). 208pp.

Conferencia de Denver. 1966. En Chicago Conference: Standardization in Human Cytogenetics, Birth Defects, Original Article Series 2:12 – 16. Citada por Spotorno, A. E. 1985. Conceptos y Métodos en Cariología Descriptiva y Comparada. En: El núcleo, los cromosomas y la evolución. Fernández-Donoso, R. (Ed.) Unesco.

Cracraft, J. 1983. Species Concepts and Speciation Analysis, in Current Ornithology (ed. R.F. Johnson), Plenum Press, New York, pp. 150-87.

Darwin, C. 1868. The Variation of Animals and Plants Under Domestication.

Davis, P.H., Heywood, V.H. 1963. Principles of Angiosperm Taxonomy. Oliver and Boyd, Edinburgh.

Díaz O.H. y Díaz, S.V. 1996. Vocabulario Elemental de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Santiago-Chile. 89pp.

Fernandez-Baca, S. 1995. Genetics erosion of Camelidae. Animal Genetics Resources Information. N 14,97-105.

Ford, E., Pollock, D.L., and Gustavsso. 1980 (eds.) Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. University of Reading, 2nd-6th August 1976. Hereditas 92: 145-162.

- Franklin, W.L. 1982. Biology, ecology, and relationship to man of the South American Camelids. Pp. 457-489 In: M.A. Mares and H.H. Genoways, eds. Mammalian biology in South America. Pymatuning Lab. Of Ecology, Univ. Pittsburth, Pennsylvania Spec. Publ. Ser. Vol. 6. 539 pp.
- Franklin, W.L. 1983. Contrasting Socioecologies of South America's Wild Camelids: the Vicuna and Guanaco. Pages 573-629 In: J.F. Eisenberg and Kleiman, eds. Advances in the study of mammalian behaviour. Am. Soc. Of Mammal., Spec. Publ. N°7, Shippensburg, Pa.
- Frisch, J. L. 1775. Das Natur-System der vierfüssigen Thiere
- Gallagher, D.S. Jr. And Womack, J. E. 1992. Chromosome Conservation in the Bovidae. Journal of Heredity, 83: 287 - 298; 0022-1503.
- George, W. 1962. Animal Geography. Heinemann, London, 142 pp. Citado por Franklin, W.L. 1982. Biology, ecology, and relationship to man of the South American Camelids. Pp. 457-489 In: M.A. Mares and H.H. Genoways, eds. Mammalian biology in South America. Pymatuning Lab. Of Ecology, Univ. Pittsburth, Pennsylvania Spec. Publ. Ser. Vol. 6. 539 pp.
- Gilmore, 1950. Fauna and Ethnozoology of South America. Pages 345-464, in Handbook of South Indians: vol 6 Physical Anthropology, Linguistics and Cultural Geography of South American Indians (J. H. Steward, ed.), Bulletin of Bureau of American Ethnology, Smithsonian Institution, 143 (6): xiii + 1-715. Citado por Franklin, W.L. 1982. Biology, ecology, and relationship to man of the South American Camelids. Pp. 457-489 In: M.A. Mares and H.H. Genoways, eds. Mammalian biology in South America. Pymatuning Lab. Of Ecology, Univ. Pittsburth, Pennsylvania Spec. Publ. Ser. Vol. 6. 539 pp.
- Harrison, J.A. 1985. Revisión of the Camelinae (Artiodactyla, Tylopoda) and Description of the New Genus Alforjas. Paleontological Contributions, University of Kansas. Citado por Wheeler, J.C. 1995. Evolution and present situation of South American Camelidae. Biological Journal of the Linnean Society. 54: 3, 271-295; 5pp.
- Hartl, D. and Clark, A. 1989. Principles of population genetics. 2nd Edition. Sinauer Associates, INC. 682 pp.
- Hedberg, O. 1958. Taxonomic treatment of vicarious taxa. Uppsala University Arsskr. 6:186-195.
- Herre, W. 1952. Studien über die wilden domestizierten Tylopoden Sudamerikas. Zool Gart. 19, 70 - 98.
- Herre, W. 1953. Die Herkunft des Alpakkas. Säugetierkundliche Mitteilungen 1: 176-177.
- Herre, W. and Thiede, U. 1965. Studien an Gehirnen Südamerikanischer Tylopoden. Zoologische Jahrbucher für Anatomie, 82:155-176.

- Hemmer, H. 1990. Domestication: the decline of environmental appreciation. Cambridge University Press.
- Hinrichsen, P., Obreque, V., Merabachvili, G., Mancilla, R., García-Huidobro, J., Zapata, B., Bonacic, C. y Bas, F. 1998. Uso de marcadores moleculares para estudios de filiación y de diversidad genética de camélidos sudamericanos. Libro de resúmenes del Seminario Internacional "Manejo Sustentable de la Vicuña y el Guanaco". Santiago, 18 y 19 de noviembre.
- Hofmann, R., Otte, K., Ponce, C., Rios, M. 1983. Manejo de la Vicuña Silvestre. Soc. Alemana de Coop. Técnica. Rep. Fed. Alemana.
- ISCN, 1995. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mintelman, E (ed). S. Karyer, Basel.
- Jürgens, K.D., Pietschmann, M., Yamaguchi, Y. y Kleinschmidt, T. 1988. Oxygen Binding Properties, Capillary Densities and Heart Weight in High Altitude Camelids. Journal of Comparative Physiology B 158: 469-477.
- Krumbiegel, I. 1944. Die Neuweltlichen Tylopoden. Zoologischer Anzeiger, 145: 45-70.
- King, R. 1974. Dictionary of Genetics. Oxford University Press.
- Koford, C. B. 1957. The Vicuña and the Puna. Ecol. Mon 27: 153-219.
- Koulischer, I.; Tijssen, J. y Mortelmans, J. 1971. Mammalian Cytogenetics. IV. The Chromosomes of Two Male Camelidae: *Camelus bactrianus* and *Lama vicugna*. Acta Zoológica et Pathológica Antverpiensia 52: 89-92.
- Kyle, R. 1987. A Feast in the Wild. Kudu publishing. 203 pp.
- Larramendy, M.; Vidal-Rioja, L.; Bianchi, M.; Bianchi, N. 1983. Camélidos Sudamericanos: Estudios Genéticos. En Informe Final IX CLAZ pp. 159-163. Arequipa, Perú.
- Levan, A.K. Fredga, and Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. Hereditas (Lund) 52: 201- 220.
- Lin, Z. H., Nomura, O., Wada, Y. and Yasue, H. 1998. Phylogenetic Analysis of Species in the family Camelidae based on repetitive DNA sequence. In XXVIth International Conference on Animal Genetics. 9-14 August, Auckland NZ.
- Lönnerberg, E. 1913. Notes on Guanacos. Arkiv för Zoologi 8(19): 1- 8.
- López Aranguren, D.J. 1930. Camélidos Fósiles Argentinos. Anales de la Sociedad Científica Argentina 59:15-35, 97-126.

- Marchetti, B. Oltremari Arrengui, Y Peters. 1992. Estrategias para el Manejo y Aprovechamiento Racional del Guanaco (*Lama guanicoe*). Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago. 162 pp.
- Massoia, E.; Chebez, J.C.; Chiappe, A.; Lezcano, M. 1993. Mamíferos Silvestres del Archipiélago Fueguino. Literature of Latin America L.O.L.A. (de)
- Mayr, B.; Auer, H.; Schleger, W.; Czaker, R. Y Burger, H. 1985. Nucleolus Organiser Regions in the chromosomes of Llama. The Journal of Heredity 76: 222-223.
- Mayr, E. 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Mayr, E. 1982. The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Mayr, E. y Ashlock, P.D. 1991. Principles of Systematics Zoology. McGraw-Hill, New York.
- Maynard Smith 1989. Evolutionary Genetic. Oxford University Press.
- McKittrick, M.C. y Zink, R.M. 1988. Species Concepts in Ornithology. The Condor, 90, 1-14.
- Merabachvili, G., Obreque, V., Mancilla, R., Garcia-Huidobro, J. y Hinrichsen, P. 1988. Diversidad Genética de Camélidos Sudamericanos Determinada Mediante Marcadores Moleculares. En: XXXI Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile. Libro de Resúmenes.
- Miller, G. S., Jr. 1924. A Second Instance of the development of Rodent-like Incisor in an Artiodactyl. Proceeding of the U.S. National Museum, 656 (8): 1-4.
- Moore, K.M. 1988. Hunting and Herding Economies on the Junín Puna. En: E.S. Wing y J.C. Wheeler, Compiladoras, Economic Prehistory of the Central Andes, pp. 154-166. Oxford, B.A.R. International Series 427.
- Moore, K.M. 1989. Hunting and the Origins of Herding in Perú. Ann Arbor, University Microfilms International.
- Nicholas, F. W. 1996. Introduction to Veterinary Genetics. Oxford University Press. Pp 317.
- O'Brien, S.J. and Mayr, E. 1991. Bureaucratic Mischief: Recognizing Endangered Species and Subspecies. Science, 251, 1187-8.
- Pakes, S. P. and Griesemer, R.A., 1965. Current status of chromosomes analysis in veterinary medicine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 146, 138 - 145.
- Palma, E., Marín, J.C., Spotorno, A. and Galaz, J.L. 1999. Phylogenetic Relationships among South American Camelid Taxa (Artiodactyla, Camelidae) Based on Sequences of the

- Cytochrome b Mitochondrial Gene. In: 3rd European Symposium on South American Camelids and Supreme European Seminar. Gottingen, Germany. May 27 – 29. Abs.
- Paris Conference 1971. Standardisation in Human Cytogenetics. The National Foundation, New York.
- Paucar, A., Téllez, J. Neyra, L. y Rdriguez, J. 1984. Estudio Tecnológico del Beneficio de Vicuñas. En: F. Villiger, Compilador, La Vicuña, pp. 33-48. Lima, Editorial Los Pinos.
- Penedo, C. 1998. Microsatellite Markers for South American Camelids. *Animal Genetics* 29 (5): 411-2.
- Pires-Ferreira, J. W., Pires-Ferreira, E., and Kaulicke, P. 1976. Preceramic animal utilisation in the Central Peruvian Andes. *Science*. 194, 483- 490.
- Richer, C.L., Power, M.M., Klunder, L.R., McFeely, R.A. and Kent, M.G. 1990. Standard Karyotype of the Domestic Horse (*Equus caballus*).
- Robinson, T.J. and Elber, F.F.B. 1993. Cytogenetics: Its Role in Wildlife Management and the Genetic Conservation of Mammals. *Biological Conservation*, 63, 47-51.
- Ryder, O.A. 1986. Species Conservation and Systematics: the Dilemma for Subspecie. *Trends in Ecology*, 1, 9-10.
- Sarno, R., Johnson, W. E., and O'Brien, S. J. 1998. Reconstituyendo la Historia Reciente de una Población Isleña y Continental de Guanacos en el Sur de Chile Utilizando Marcadores Microsatelitales. Abstract Manejo Sustentable de la Vicuña y el Guanaco, Nov. 1998, Santiago, Chile.
- Serrano, C.; Taboada, G.; López, F. Y De Claire, M. 1982. Estudio Cromosómico de Lama glama, Lama pacos y Huarizo. Seminario de Reproducción de Camélidos. Ministerio de Asuntos Campesinos y Agricultura. 1-4. La Paz, Bolivia.
- Seuanez, H.N. 1985. Los cromosomas humanos: un enfoque evolutivo. En: El núcleo, los cromosomas y la evolución. Fernández-Donoso, R. (Ed.) Unesco.
- Shaw, A.B. 1964. Time in Stratigraphy. McGraw-Hill, New York.
- Simpson, G.G. 1961. Principles of Animal Taxonomy. Columbia Univ. Press, N.Y. 247 pp.
- Spotorno, A; Nadir Brum And Mariela Di Tomasio. 1980. Comparative Cytogenetics of South American Deer.
- Spotorno, A. 1985. Conceptos y Métodos en Cariología Descriptiva y Comparada. En: El núcleo, los cromosomas y la evolución. Fernández-Donoso, R. (Ed.) Unesco.

- Stanley, H. F., Kadwell, M., and Wheeler, J.C. 1994. Molecular Evolution of the Family Camelidae: a Mitochondrial Study. Proc. Royal Soc. London, B 256: 1-6.
- Stock, A.D. 1981. Chromosomal Variation and Constitutive Heterochromatin in Three Porpoise Species (genus *Stenella*). Cytogenet Cell Genet. 31: 91-100 (1981).
- Taylor, K. M., Hungerford, D.A., Snyder, R. L., and Ulmer Jr., F.A. 1968. Uniformity of Karyotypes in Camelidae Cytogenetics 7:8-15.
- Torres, H. 1985. Distribución y Conservación del Guanaco. UICN Grupo Especialista en Camélidos Silvestres Sudamericanos. Informe Especial N 2 Noviembre. 37 pp.
- Torres, H. 1992. Ed. South American Camelids: an Action Plan for their Conservation. Gland, UICN.
- Valenzuela, C. 1985. Análisis y Ensayos Conducentes a la Definición de una Citogenética Poblacional. En: El Núcleo, los Cromosomas y la Evolución. Fernández-Donoso, R. (Ed.) Unesco.
- Verma, R.S. and Babu, A. 1995. Human Chromosomes Principles and Techniques. Second Edition. International Edition.
- Vidal-Rioja, L.; Larramendy, M.L.; Semorile, L. 1989. Ag-NOR Staining and in situ Hybridization of rDNA in the Chromosomes of the South American Camelids. Genética. 1989, 79: 3, 215 - 222.
- Vidal-Rioja, L.; Zambelli, A.; Semorile, L. 1994. An assessment of the relationships among species of Camelidae by Satellite DNA comparisons. Hereditas, 121: 3, 283-90.
- Walker, L. 1993. Citogenética General: Cromosomas y Cariotipo. In: Elementos de Biología Celular y Genética. Spotorno, A.E. y Hoecker, G. Eds.
- Wayne, R.K.; Bruford, M.W.; Girman, D.; Rebholz, W.E.R.; Sunnucks, P.; and Taylor, A.C. 1994. Molecular Genetics of Endangered Species. In: Olney, P.J.S.; Mace, G.M. and Feistner, A.T.C. (Eds.) Creative Conservation: Interactive Management of Wild and Captive Animals. Chapman & Hall, London (Ed).285pp.
- Webb, S.D.1965. The Osteology of Camelops. Bulletin of the Los Angeles Country Museum,1. Citado por Jane C. Wheeler, 1991. Cap. 1. Origen, Evolución y Status Actual. En: Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Fernández-Baca, S. (Ed.) Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- Webb, S.D. 1972. Locomotor Evolution in Camels. Forma et Function, 5:99-112.

- Webb, S.D. 1974. Pleistocene Llamas of Florida, with a Brief Review of Lamini. Pages 170-213, in Pleistocene Mammals (S.D. Webb ed.), University Presses of Florida, Gainesville, 270 pp.
- Wheeler, J.C. 1982. Aging Llamas and Alpacas by their Teeth. *Llama World* 1 (2): 12 - 17.
- Wheeler, J. C. 1984. La Domesticación de la Alpaca (*Lama pacos L.*) y la Llama (*Lama glama L.*) y el Desarrollo Temprano de la Ganadería Autóctona de los Andes Centrales. *Boletín de Lima* 36: 74-84.
- Wheeler, J.C. 1986. De la Chasse a l'Élevage. En: D.Lavalleee, M, Julien, J.C. Wheeler y C. Karlin, *Telamarchay Chasseurs et Pasteurs Préhistoriques des Andes I*, pp. 21-59. Paris, Editions Recherches sur les Civilisations, ADPF.
- Wheeler, J.C. 1995. Evolution and present situation of South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 54: 3, 271-295; 5pp.
- Wheeler, J.C., Pires-Ferreira, E., y Kaulicke, P. 1976. Pre-ceramic Animal Utilization in the Central Peruvian Andes. *Science* 194 (4264): 483-490.
- Wheeler, J.C., y Reitz, E.J. 1987. Allometric Prediction of Live Weight in the Alpaca (*Lama pacos*). *Archaeozoologia* 1(1):31-46.
- White, M.J.D. 1978. Modes of Speciation. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 455 pp.
- Wilkinson, D.G. 1996. In Situ Hybridisation. A Practical Approach. Oxford University Press.
- Wilson, A.C., Bush, G.I., Case, S.M. and King, M. C. 1975. Social Structuring of Mammalian Population and Rate of Chromosomal Evolution. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 72, 5061-5.
- Wing, E.S. 1977. Animal Domestication in the Andes. Pages 837-859, in *Origins of Agriculture* (C.A.Reed, ed.), Moun-ton Publications, The Ha gue, 1013 pp.
- Wing, E.S. 1986. Domestication of Andean Mammals. En: F. Vuilleumier y M. Monasterio, *Compiladores, High Altitude Biogeography*, pp. 246-264. Oxford, Oxford University Press.
- Yunis, J. and Prakash, O. 1982. The origin of Man: A chromosomal pictorial legacy. *Science*, 215: 1525 - 1530.
- Bas, F., C. Bonacic y J. Gimpel. 1995. Tipificación de la fibra de los camélidos del país. Informe Final FIA N° 008/92.
- Bas, F., B. Zapata, B. González y C. Bonacic. 1999. Estudio de la adaptación y manejo en semicautiverio del guanaco (*Lama guanicoe*) en la zona central. Informe Final FIA N° 056/94.

- Bonacic, C. 1998. Manejo sustentable de la vicuña: ¿Es posible conciliar la explotación de la especie y el bienestar animal?. Manejo Sustentable de la Vicuña y el Guanaco. Santiago, Región Metropolitana. 18 y 19 de noviembre. Abs.
- Bustinza, V., Rebuffi, G. y J. Bertoni. S/f. Crecimiento de la vicuña en semicautividad (*Vicugna vicugna*).
- Fowler, 1989, Medicine and Surgery of South American Camelids.
- Fraser y Moorby, 1998. Plasma bioquímical values in the guanaco (*Lama guanicoe*) and comparison with the sheep.
- González, B., Zapata, B. Bonacic, C. y F. Bas. 1998. Técnicas para el manejo del guanaco en cautiverio. Manejo Sustentable de la Vicuña y el Guanaco. Santiago, Región Metropolitana. 18 y 19 de noviembre. Abs.
- Hasting, B. E. y S. C. Gasgoyne, 1992. Trace mineral levels in the guanaco (*Lama guanicoe*). Veterinary Record 131: 14 – 15.
- Hawkey, C. M. y F. M. D. Gulland. 1988. Haematology of clinically normal and abnormal captive llamas and guanaco. Veterinary Record 122: 232 – 234.
- Norambuena, M. C. 1992. Variación genética interpoblacional en *Vicugna vicugna* (Camelidae). Tesis para optar al título de Licenciado en Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Palma, E., Marín, J. C., Spotorno, A. y Galaz, J. L. 1999. Phylogenetic relationships among South American Camelid Taxa (Artiodactyla, Camelidae) based on sequences of the cytochrome b mitochondrial gene. In: 3° European Symposium on South American Camelids and Supreme European Seminar. Gottingen, Germany. May 27 – 29. Abs.
- Russel, A. 1990. Fibre productin. In: Camelid conference. Macaulay Land Use Researc Institute y Rowett Research Institute, Aberdeen, UK. May 12 – 13.
- Sarno, R., Hunter, R. L. y W. L. Franklin. 1996. Immobilization og guanacos by use of tiletamine/zolazepam. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208: 408 – 409.
- Torres, H. 1992. Ed. South american camelids: an action plan for their conservation. Gland, UICN.