

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Determinación de la diversidad y estructura genética  
de patos criollos (*Cairina moschata* L. 1758) de los  
departamentos de Lambayeque y San Martín mediante  
el uso de microsatélites**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**AUTOR**

Wendy Acuña Rodríguez

**ASESORES**

Mónica Arakaki Makishi

Eudosio Veli Rivera

Lima - Perú

2016

## DEDICATORIA

*A mis padres Catalina y Victorio  
y a mis hermanas Cindy y Jovanna;  
quienes siempre me alentaron  
a seguir adelante.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mis queridos padres Catalina Rodriguez y Victorio Acuña, mis hermanas Cindy y Jovanna, que a pesar de las dificultades, siempre me brindaron su apoyo y comprensión.
- Al Ing. Eudasio Veli por su orientación en el laboratorio y darme la oportunidad de realizar la presente tesis.
- A la Blga. Claudia Yalta por su constante apoyo en el laboratorio y sus consejos durante la redacción de tesis.
- A mi asesora, Dra. Mónica Arakaki, y al Laboratorio de Sistemática y Diversidad Vegetal del Museo de Historia Natural - UNMSM por el apoyo y guía en la redacción de la presente tesis.
- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) que me dio las facilidades y me abrió sus puertas para la realización de la presente tesis.
- A la Estación Experimental Agraria Vista Florida y a la Ing. Gladys Gastelo, por el apoyo brindado en la colecta de muestra en el departamento de Lambayeque.
- A la Estación Experimental Agraria El Porvenir y al Ing. Benjamin Depaz, por el entusiasmo depositado en el proyecto y su apoyo durante la colecta de muestra en el departamento de San Martín.
- Al Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas y especialmente al Blgo. Alberto López y la Blga. María Siles a quienes debo mi inicio en el difícil pero interesante camino de la investigación.
- A todos aquellos amigos que me brindaron consejos y ánimos para seguir adelante con la presente tesis, especialmente Lenin Chumbe.
- A la Escuela de Genética y Biotecnología que me enseñó más que nociones teóricas y prácticas, despertó mi interés por el estudio de la biodiversidad del Perú.
- Al Departamento de Ornitología del Museo de Historia Natural - UNMSM por el entrenamiento en el conocimiento de aves.

## ABREVIATURAS

AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Análisis de Varianza Molecular)
AR	Alelos Raros
AmR	Alelos muy Raros
°C	Grado Celsius
CENAGRO	Censo Nacional Agropecuario
dNTPs	deoxyribonucleotide triphosphates (desoxirribonucleótidos trifosfato)
d.f.	degrees of freedom (grados de libertad)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
SD	Standard Deviation (Desviación Estándar)
EC	Electroforesis Capilar
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetracético)
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EEA	Estación Experimental Agraria
EEA EP	Estación Experimental Agraria "El Porvenir"
EEA VF	Estación Experimental Agraria "Vista Florida"
FAO	United Nations Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
$F_{IS}$	Índice de Fijación individuo-subpoblación
$F_{ST}$	Índice de Fijación subpoblación-total
$H_e$	Heterocigosidad esperada
$H_o$	Heterocigosidad observada
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
kg	kilogramo
Lam	Patos criollos del departamento de Lambayeque
Lam alr	Puntos muestreados en los alrededores del departamento de Lambayeque
MCMC	Markov Chain Monte Carlo (Monte Carlo basado en Cadenas de Markov)

m.s.n.m	metros sobre el nivel del mar
mg	miligramos
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramos
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PIC	Polymorphic Information Content (Contenido de Información Polimórfica)
pmol	picomol
r.p.m.	revoluciones por minuto
RFU	Relative Fluorescence Unit (Unidad Relativa de Fluorescencia)
SSR	Simple Sequence Repeat (Secuencia Simple Repetida)
SM	Patos criollos del departamento de San Martín
SM alr	Puntos muestreados en los alrededores del departamento de San Martín
SMM	Stepwise Mutation Model (Modelo de Mutación Escalonada)
SSD	Sum of Squared Differences (Diferencias en la Suma de Cuadrados)
P-value	Nivel de significancia
TE	Tris: EDTA
T <sub>a</sub>	Temperatura de hibridación
U	Unidades
μL	microlitros
μM	micro Molar
UV	Ultravioleta
V	Voltios

## INDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Taxonomía y características de la especie .....	2
2.2. Domesticación del pato criollo.....	3
2.3. Distribución y situación actual del pato criollo .....	3
2.4. Marcadores moleculares.....	6
2.4.1. Microsatélites (SSRs) .....	6
2.4.2. Tipos de microsatélites.....	6
2.5. Genotipificación de SSRs por electroforesis capilar .....	7
2.5.1. Mejoramiento y eficiencia del genotipado de SSRs: PCR multiplex y cola M13 .....	8
2.6. Medición de la variabilidad genética .....	9
2.6.1. Número de alelos en un locus (A) .....	9
2.6.2. Número efectivo de alelos en un locus ( $A_e$ ) .....	10
2.6.3. Prueba para evaluar el Contenido de Información Polimórfica (PIC) .....	10
2.6.4. Prueba para evaluar la presencia de Alelos nulos.....	11
2.6.5. Heterocigosidad.....	11
2.6.6. Prueba de Equilibrio Hardy – Weinberg (EHW) .....	12
2.7. Análisis de la estructuración genética poblacional.....	13
2.7.1. AMOVA .....	13
2.7.2. Estadístico F .....	14
2.7.3. Estadístico R.....	15
2.7.4. Análisis de asignación a grupos por probabilidades bayesianas .....	16
3. HIPÓTESIS .....	17
4. OBJETIVOS .....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1. Área de estudio.....	18
5.2. Colecta de muestras .....	21

5.3.	Extracción de DNA genómico a partir de plumas.....	21
5.4.	Evaluación de la extracción del DNA .....	23
5.5.	Selección de microsatélites .....	23
5.6.	Amplificación de microsatélites .....	23
5.7.	Análisis de datos .....	25
5.8.	Análisis estadístico.....	25
6.	RESULTADOS.....	28
6.1.	Extracción de DNA a partir de plumas.....	28
6.2.	Parámetros indicativos de variabilidad genética .....	28
6.2.1.	Número de alelos .....	28
6.2.2.	Frecuencias alélicas y alelos raros .....	30
6.2.3.	Alelos nulos y PIC .....	39
6.2.4.	Heterocigosidad.....	41
6.2.5.	Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW).....	43
6.3.	Análisis de la estructura poblacional .....	44
6.3.1.	AMOVA y Estadísticos F y R.....	44
6.3.2.	Análisis de asignación a grupos por probabilidades bayesianas .....	46
7.	DISCUSIÓN .....	49
7.1.	Extracción de DNA a partir de plumas.....	50
7.2.	Transferibilidad de microsatélites .....	50
7.3.	Parámetros indicativos de variabilidad genética .....	52
7.4.	Análisis de estructura poblacional .....	57
8.	CONCLUSIONES.....	60
9.	RECOMENDACIONES .....	61
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
	ANEXOS.....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Clasificación de valores de PIC (Botstein et al. 1980)	11
<b>Tabla 2:</b>	Número y procedencia de los patos criollos muestreados en los departamentos de Lambayeque y San Martín (noviembre, 2014).	18
<b>Tabla 3:</b>	Secuencias de los 18 iniciadores seleccionados para la amplificación de microsatélites en <i>Cairina moschata</i> .	27
<b>Tabla 4:</b>	Número total de alelos por población de SM y Lam.	30
<b>Tabla 5:</b>	Frecuencias de AR y AmR en las poblaciones de SM y Lam.	39
<b>Tabla 6:</b>	Estimación de alelos nulos calculada en la población total.	40
<b>Tabla 7:</b>	Estimación de la heterocigosidad (Nei 1984), calculada para las poblaciones de SM y Lam, utilizando 18 loci.	41
<b>Tabla 8:</b>	Estimación de la heterocigosidad (Nei 1984), calculada para las poblaciones de SM y Lam, utilizando 11 loci.	42
<b>Tabla 9:</b>	Comparación de los valores de heterocigosidad (Nei 1984), entre la EEA EP y SM alr, y entre EEA VF y Lam alr, utilizando 18 y 11 loci.	42
<b>Tabla 10:</b>	EHW evaluado mediante la prueba exacta para cada locus en las poblaciones de SM y Lam, asumiendo la hipótesis nula de que existe equilibrio.	43
<b>Tabla 11:</b>	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y Estadísticos $F_{ST}$ y $R_{ST}$ .	45
<b>Tabla 12:</b>	Estimación del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) total, por departamento y por EEA.	46
<b>Tabla 13:</b>	Data de STRUCTURE HARVESTER resaltando el mejor valor para K.	47
<b>Anexo 1:</b>	Mapa de las evidencias arqueológicas, observaciones etnoentomológicas y probable área de domesticación y difusión de <i>C. moschata</i> (Angulo 1998)	74
<b>Anexo 2:</b>	Encuesta realizada a los criadores de patos criollos.	75
<b>Anexo 3:</b>	Ficha de campo utilizada en el presente proyecto.	76
<b>Anexo 4:</b>	Georeferencia de los puntos muestreados en los departamentos de San Martín y Lambayeque.	77

<b>Anexo 5:</b>	Protocolo de extracción de DNA genómico a partir de plumas cobertoras alares de <i>C. moschata</i> .	78
<b>Anexo 6:</b>	Gel de agarosa al 1% del DNA total de <i>C. moschata</i> .	80
<b>Anexo 7:</b>	Gel de agarosa al 2% de las diluciones de DNA (30 ng/ $\mu$ L) de <i>C. moschata</i> .	80
<b>Anexo 8:</b>	Características de los 24 loci escogidos para el estudio de diversidad genética de <i>C. moschata</i> .	81
<b>Anexo 9:</b>	Protocolo de amplificación en sistemas multiplex para 18 marcadores SSRs.	84
<b>Anexo 10:</b>	Programa de amplificación para los PCR multiplex.	86
<b>Anexo 11:</b>	Tablas de frecuencias alélicas registradas para los 18 marcadores SSRs en las poblaciones de SM y Lam.	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Representación gráfica de individuos silvestres de <i>Cairina moschata</i> (Fuente: Schulenberg et al. 2006).	5
<b>Figura 2:</b>	Mapa de distribución de las poblaciones domésticas de <i>Cairina moschata</i> en Perú (Fuente: IV CENAGRO 2012)	5
<b>Figura 3:</b>	Ubicación de las localidades de muestreo en los departamentos de Lambayeque y San Martín (2014). Mapa generado por Google Earth, 2015.	19
<b>Figura 4:</b>	Situación de crianza de Lam y SM. A y B) Grupos reproductores de la EEA VF. (C) Corral para crianza en Lam arl. D y E) Patos criollos del departamento de San Martín. (F) Corral en SM arl. (Fuente propia)	20
<b>Figura 5:</b>	Procedimiento de colecta de la muestra biológica. A y B) Extracción de plumas cobertoras alares. C) Anillamiento de los patos criollos. D) Encuesta y recolección de data. (Fuente propia)	21
<b>Figura 6:</b>	Procedimiento para retirar el cálamo de las plumas. A) Cálamo de la pluma. B) Corte del cálamo. C) Cálamo cortado transversalmente en buffer de lisis. (Fuente propia)	22
<b>Figura 7:</b>	Electroferogramas de microsatélites obtenidos a partir del DNA total de <i>C. moschata</i> usando el programa GeneMapper. A) 6-FAM, B) VIC, C) PET y D) NED.	29
<b>Figura 8:</b>	Distribución de las frecuencias alélicas de los loci APH01, APH07, APH09 y APH13.	32
<b>Figura 9:</b>	Distribución de las frecuencias alélicas de los loci APH18, APL11, APT004 y APT21.	34
<b>Figura 10:</b>	Distribución de las frecuencias alélicas de los loci APT25, APT29 y AY295.	36
<b>Figura 11:</b>	Distribución de las frecuencias alélicas de los loci CAUD001, CAUD22, CAUD26 y CMO211.	38
<b>Figura 12:</b>	Estimación del PIC en la población total	40
<b>Figura 13:</b>	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para la población de SM y Lam.	44
<b>Figura 14:</b>	Análisis de estructuración: A) Prueba asumiendo K=2 y B) Prueba asumiendo K=3.	47
<b>Figura 15:</b>	Gráfico de la prueba STRUCTURE HARVESTER, donde el parámetro Delta K muestra el mejor valor para K.	48

## RESUMEN

En este estudio, se examinó la diversidad y estructura genética de dos poblaciones de patos criollos, *Cairina moschata*, empleando el polimorfismo genético de 18 marcadores microsatélites. Los parámetros utilizados incluyeron número de alelos (A), números efectivo de alelos ( $A_e$ ) y promedio de heterocigosidad ( $H_e$ ) de cada población. Los resultados mostraron que 11 de los 18 loci de microsatélites fueron altamente polimórficos: APH07, APH09, APH13, APT004, APT21, APT25, APT29, AY295, CAUD001, CAUD022 y CMO211 ( $PIC > 0.025$ ). El promedio de A (6.6),  $A_e$  (2.23) y  $H_e$  (0.3803) de las dos poblaciones de patos fue moderado a bajo, lo que indica que el polimorfismo genético y la diversidad genética fueron moderados. La prueba de Hardy-Weinberg demostró que las dos poblaciones en este estudio se encuentran en desequilibrio H-W. El resultado del análisis de estadísticos F y R mostró valores de 0.115 y 0.011, lo que indica la estructuración genética baja a moderada. La tasa de endogamia ( $F_{IS}$ ) dio resultados significativos, lo que demuestra la carencia de buenos programas de manejo de la especie. Los datos indican que el 60% de los loci microsatélites evaluados son eficaces para el análisis de la diversidad genética en poblaciones de patos criollos de la región norte del Perú.

*Palabras clave: SSRs, pato criollo, variabilidad genética, estructura genética, endogamia.*

## ABSTRACT

In this study, the genetic diversity and genetic structure of two populations of Muscovy duck *Cairina moschata* were examined using the genetic polymorphism of 18 microsatellite markers. The parameters used included number of alleles (A), effective number of alleles ( $A_e$ ) and average heterozygosity ( $H_e$ ) of each population. The results showed that 11 of the 18 microsatellite loci were highly polymorphic: APH07, APH09, APH13, APT004, APT21, APT25, APT29, AY295, CAUD001, CAUD022 and CMO211 ( $PIC > 0.025$ ). The average A (6.6),  $A_e$  (2.23), and  $H_e$  (0.3803) of the two duck populations were moderate to low, indicating that the genetic polymorphism and genetic diversity were moderate. The Hardy-Weinberg test showed that the two populations in the study were in H-W disequilibrium. The results of F and R statistical analyses showed values of 0.115 and 0.011 respectively, indicating low to moderate genetic structure. The rate of inbreeding ( $F_{IS}$ ) gave significant results, demonstrating the lack of good management and breeding programs. The data shows that 60% of microsatellite loci tested are effective markers for analysis of genetic diversity in populations of Muscovy ducks in the northern region of Peru.

*Keywords: SSRs, Muscovy duck, genetic variability, genetic structure, inbreeding.*

## 1. INTRODUCCIÓN

El “pato criollo” o “Muscovy duck” es la forma doméstica del pato amazónico, *Cairina moschata* L. 1758. Su domesticación, por parte de las culturas andinas, lo llevaron a convertirse en un importante recurso zoogenético nativo con amplia distribución geográfica en el Perú (Brack 2004, CENAGRO 2012). Esta especie, considerada en la ganadería como un animal menor, es el ave de corral con menos problemas de salud y mayor facilidad de adaptación a casi todos los ecosistemas de Sudamérica, por lo que su crianza es básicamente familiar, y por lo que a su vez se convierte en parte de la seguridad alimentaria (Angulo 1998, FAO 2007). Los recursos más aprovechados de esta ave son la carne y los huevos, para venta o consumo familiar. La selección artificial (domesticación) y más aún, los ineficientes programas de manejo de esta especie, pueden tener un elevado impacto en la diversidad genética y estructura genética de las poblaciones (Boettcher et al. 2010), por lo que factores como la adaptación, resistencia al estrés u otras características deseables se pueden ver alteradas (Toro et al. 2011).

Se sabe muy poco sobre la genética del pato criollo peruano; sin embargo, un pariente cercano, el pato Pekín *Anas platyrhynchos*, ha sido ampliamente estudiado a nivel genético molecular (Maak et al. 2000, Wang et al. 2004, El-Gendy et al. 2005, He et al. 2008, Hsiao et al. 2008, Fei et al. 2009, Shi-Yi et al. 2009, Su y Shen 2009), lo cual puede ser tomado como base para el estudio del pato criollo. Estudios de diversidad genética y conservación consideran a los marcadores moleculares, específicamente los microsatélites, como herramientas con un gran potencial (Aranguren et al. 2005).

La presente tesis buscó determinar la variabilidad genética y estructuración genética en las poblaciones de patos criollos del departamento de Lambayeque (Lam) y del departamento de San Martín (SM) usando 18 marcadores microsatélites generados para *A. platyrhynchos*. Se espera que los resultados sirvan como herramienta para desarrollar adecuados programas de mejoramiento y conservación de las poblaciones peruanas del pato criollo.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Taxonomía y características de la especie

El pato criollo *Cairina moschata* L. 1758 está clasificado dentro de las siguientes categorías:

Phylum Chordata

Clase Aves

Orden Anseriformes

Familia Anatidae

Género *Cairina* F. 1822

Las aves que se encuentran dentro de la familia Anatidae son llamadas colectivamente *waterfowl* en América del Norte y *wildfowl* en Gran Bretaña (Madge y Burn 1988, Schulenberg et al. 2010), siendo un grupo variado de aves acuáticas que incluye a los patos reales, gansos, cisnes y patos que silban.

En comparación con otras familias de aves, desde tiempos remotos, los anátides han conformado un recurso importante para la alimentación de los humanos y con la domesticación, varias especies adquirieron gran valor económico (Kear 2005), entre ellas *C. moschata*, cuya crianza y/o producción se incrementa progresivamente en el territorio peruano (CENAGRO 2012).

El pato criollo es una especie inconfundible; relativamente grande, caracterizada por su marcado dimorfismo sexual, donde los machos llegan a medir y pesar más (840 mm y 4 kg) que las hembras (630 mm y 1.5 kg). Presenta una carúncula carnosa alrededor de los ojos hasta la base del pico, así como una prominente cresta en la nuca, la cual es menos pronunciada en las hembras (Bundy y Diggins 1991, Stahl 2008, Avilez y Camiruaga 2011). El plumaje es negruzco y voluminoso. El plumaje del ala está compuesto principalmente por plumas remeras (primarias y secundarias) y también por plumas cobertoras. Las primeras son las más grandes, se encuentran fuertemente unidas al hueso y son esenciales para el vuelo; mientras que las cobertoras tienen una inserción más superficial y cubren a las plumas remeras. El tipo

silvestre posee plumas cobertoras alares blancas, mientras que el tipo doméstico presenta un plumaje que varía entre el negro, plomo, marrón y blanco, ya sea esta coloración uniforme o en mosaico. Los juveniles sin embargo poseen plumaje negruzco uniforme (Figura 1).

El pato criollo es sedentario y polígamo, el macho puede copular libremente con otras hembras y es capaz de reproducirse en su primer año. En el nido, un aproximado de 8 a 20 huevos son incubados y el macho no juega un papel importante en la defensa de estos (Madge y Burn 1988, Stahl 2008, Schulenberg et al. 2010).

## **2.2. Domesticación del pato criollo**

La domesticación del pato criollo se remonta a los tiempos de las culturas precolombinas como las de Virú y Vicus, Mochica, y posteriormente el Imperio Inca. Las evidencias de la domesticación del pato criollo incluyen fuentes históricas, arqueológicas, etnoculturales, geográficas y ecológicas (Angulo 1998, Stahl et al. 2006, Schulenberg et al. 2006). Restos óseos del pato criollo han sido encontrados en Panamá, México, Ecuador y Perú, en asociación a viviendas humanas. Aunque no se pueda determinar si fueron uno o más los centros de domesticación, la evidencia respalda que el Perú formó parte del proceso de domesticación de *C. moschata*. (Anexo 1). Otras fuentes de información, tales como representaciones en cerámica y piedra, y el uso de plumas en la fabricación de mantas confirman la presencia del pato criollo en el contexto arqueológico mencionado (Angulo 1998).

## **2.3. Distribución y situación actual del pato criollo**

Después de la llegada de los españoles, la crianza de los patos criollos fue rápidamente difundida alrededor del mundo. De acuerdo con Donkin (1989), fueron tres las rutas de difusión: de América a la costa oeste de África, de América a España y Francia, y de América al sureste de Asia. Al ser el pato criollo el ave de corral con

menos problemas de salud y con fácil adaptación a casi todos los ecosistemas, es que su introducción en nuevos hábitats fue exitosa (Crawford 1992).

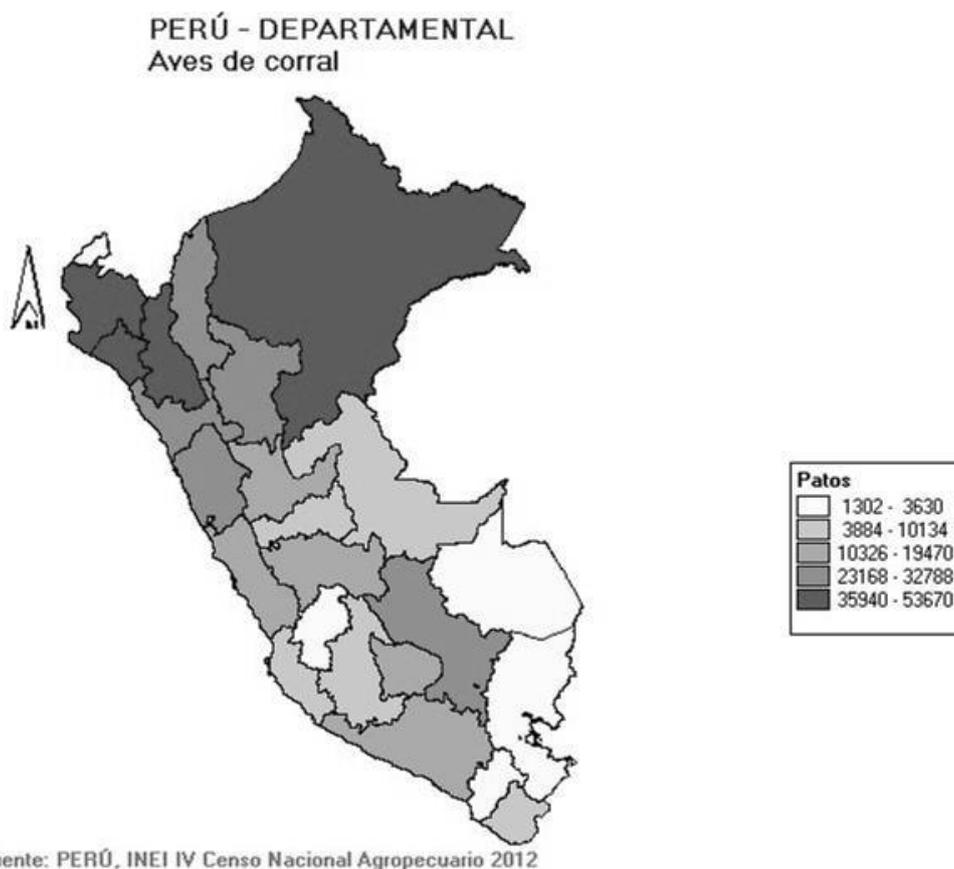
En la actualidad, el pato criollo parece imponerse en los sistemas de crianza de diferentes partes del mundo, llegando incluso a reemplazar al pato Pekín por su mayor productividad y exigencias en el mercado. Fue en Francia, donde se empezó a intensificar la crianza del pato criollo, llegando a considerarse, junto al pato mula (hibrido estéril entre un macho *C. moschata* y una hembra *A. platyhrynchos*), entre las mejores carnes de pato. Parte de este éxito se debe a los logros en investigación alcanzados en Europa y Asia, donde fueron aspectos claves: la preocupación por la adaptación al clima frío, la conservación de la diversidad, y el mejoramiento genético (Hernández 2007, Narvaiza 2008, Avilez y Camiruaga 2011).

Por otro lado, en nuestro país, por muchos años los animales nativos han sido históricamente considerados un recurso marginal y sustituible por especies y razas exóticas. No fue sino hasta hace un par de décadas que se integró una política de apoyo al desarrollo del sector agrario, que promovió la investigación en el pato criollo así como en otras especies nativas. En la actualidad es el INIA la institución a cargo de las investigaciones sobre animales domésticos nativos o introducidos, a través de sus EEAs y bancos de germoplasma. Como consecuencia de esto, entre los años 1995-2001 se observó un incremento del 51% en la producción de carnes de aves, incluyendo al pato criollo (Ravela 2004). En el año 2012, el IV CENAGRO reportó la presencia de patos criollos domésticos en la mayoría de departamentos del Perú, siendo el norte del país, el territorio que cuenta con las poblaciones más grandes (Figura 2), destacándose los departamentos de Lambayeque y San Martín, los cuales poseen poblaciones de 129 606 y 93 775 individuos respectivamente. En cuanto a investigación científica, aun son pocos los esfuerzos que se realizan por conocer más la diversidad genética del pato criollo, pero existe un antecedente al presente trabajo, se trata de Conto (2014) quién trabajó con muestras de músculo e hígado del pato

criollo que se comercializaban en los mercados del departamento de Lambayeque y Piura. Dichos resultados servirán como referencia al presente trabajo.



**Figura 1:** Representación gráfica de individuos silvestres de *Cairina moschata* (Fuente: Schulenberg et al. 2006).



**Figura 2:** Mapa de distribución de las poblaciones domésticas de *Cairina moschata* en Perú (Fuente: CENAGRO 2012)

## **2.4. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología, tales como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad (Avice 1994, Hillis y Wiens 2000). Estos nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, por ejemplo, a través de los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios del DNA. Los diferentes tipos de marcadores empleados en estudios poblacionales o estudios evolutivos se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson 1997). Algunos de los más usados, o más resolutivos son: restriction fragment length polymorphism (RFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) y microsatélites (SSRs) (Pérez 2010).

### **2.4.1. Microsatélites (SSRs)**

Los microsatélites son repeticiones en tándem de patrones muy cortos (1-6 pares de bases) que no se repiten muchas veces en un locus particular, pero son distribuidos de manera relativamente uniforme en muchos loci genómicos diferentes (Tautz y Renz 1984, Yan et al. 2008). Los microsatélites son marcadores ampliamente utilizados en una variedad de estudios de genética y biodiversidad debido a que son codominantes, poseen un alto nivel de polimorfismo, protocolos de detección rápida y facilidad para su interpretación (Wiessenbach y Dib 1992, Weber y Wong 1993, Golstein et al. 1996, Provan et al. 1999).

### **2.4.2. Tipos de microsatélites**

Los microsatélites se pueden clasificar según la longitud de las unidades de repetición o por el patrón que puedan presentar estas. En el primer caso, dentro de las secuencias repetitivas se pueden encontrar dinucleótidos (con dos nucleótidos en cada unidad de repetición), trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos y

hexanucleótidos. Para estos tipos de microsatélites existen hasta 4, 16, 64, 256, 1024, y 4096 motivos respectivamente, siendo las repeticiones penta y hexanucleótidos los menos comunes y los tetranucleótidos los más populares y recomendables por las siguientes razones (Jin et al. 1994, Walsh et al. 1996, Bacher et al. 1999):

- El rango de tamaño pequeño de los alelos permite realizar PCR multiplex, incluso cuando la muestra de DNA esta degradada.
- Se reduce la formación de productos “stutter” o de tartamudeo, en comparación con repeticiones de di- o trinucleótidos, lo cual beneficia la interpretación de los resultados.

Otra forma de clasificar los microsatélites puede ser basada en los patrones de repetición. Dentro de ellos están: 1) las repeticiones simples; que contienen unidades de la misma longitud, 2) las repeticiones compuestas, que contienen dos o más repeticiones simples de forma contigua, 3) las repeticiones complejas, que contienen muchos bloques de unidades repetidas pero que a su vez están interrumpidas por secuencias, 4) las repeticiones hipervariables complejas, que contienen numerosos alelos sin consenso, es decir, que los alelos difieren tanto en tamaño como en secuencia. Estos últimos resultan ser todo un reto para la genotipificación por lo que no es recomendable usarlos (Urquhart et al. 1994).

## **2.5. Genotipificación de SSRs por electroforesis capilar**

La genotipificación de SSRs involucra el uso de la técnica de EC, la cual separara moléculas grandes y pequeñas mediante el flujo electroforético de buffers e iones a lo largo de un capilar. Los equipos de EC, también llamados secuenciadores automáticos, poseen costos elevados; sin embargo, tienen un gran número de ventajas para el análisis de DNA, entre ellos: 1) requiere poca cantidad de muestra, ya que es muy sensible, 2) los instrumentos automatizados hacen posible que en los pasos de inyección, separación y detección las muestras puedan ser analizadas simultáneamente y sin la necesidad de supervisión haciendo el trabajo mucho más

preciso, fácil y rápido, 3) el consumo de reactivos es mínimo, 4) tiene la capacidad de analizar mayor variedad de muestras en comparación con técnicas tradicionales y 5) la información cuantitativa, es decir, los electroferogramas son obtenidos de manera electrónica al final de la corrida (Bower et al. 1998, Deyl et al. 1998, Whatley 2001, Butler 2005).

Así mismo, para realizar la genotipificación de SSRs, se debe trabajar con fluoróforos de colores y un marcador alélico. Los fluoróforos más utilizados son FAM (azul), PET (rojo), NED (amarillo), VIC (verde), entre otros, estos al ser excitados por un láser emiten una luz (400-600 nm) que es captada por un dispositivo fotosensible y separada por filtros ópticos para diferenciar la emisión de un fluoróforo de otro. Finalmente, esta emisión de luz, que es convertida a una señal electrónica por el computador, es expresada en Unidades Relativas de Fluorescencia (RFUs) y conforman los picos en los electroferogramas. Estos picos son la representación de los alelos expresados en el microsatélite y se le puede considerar homocigoto, cuando solo se visualiza un pico, o heterocigoto, cuando se visualizan dos picos.

Los marcadores alélicos, por su parte, también son marcados con un fluoróforo anaranjado (LIZ) y sirven como un estándar de medida para cada locus SSRs, lo cual resulta importante para la determinación exacta de genotipos y la identificación preliminar de alelos raros o nuevos (Diwan et al. 1997, Butler 2005, Londoño 2011).

### **2.5.1. Mejoramiento y eficiencia del genotipado de SSRs: PCR multiplex y cola M13**

La reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex es una técnica en la que se puede utilizar más de un set de cebadores simultáneamente (Oetting et al. 1995, Henegariu et al. 1997, Wilson 1997, Konomi et al. 2000), y debido a esto ofrece muchas ventajas, como por ejemplo: 1) cada amplicon sirven de control interno para los otros fragmentos amplificados, es decir, que la amplificación de al menos un fragmento

indica que el multiplex no ha fallado, 2) es un mejor indicador de la calidad de DNA molde ya que cuanto más débil sea la banda indicará cuanto más degradado está el DNA, 3) la eficiencia tal vez sea la ventaja más resaltante del PCR multiplex ya que se minimizan los costos por reactivos y el tiempo de preparación (Ballabio et al. 1990, Edwards y Gibbs 1994, Salem et al. 2010).

Por otro lado, el método de etiquetado con cola-M13 (TGTAACGACGGCCAGT) consiste en construir cebadores con una extensión de nucleótidos en su extremo 5', que será idéntica al cebador universal M13 el cual estará fluoromarcado. Su uso durante la PCR permitirá obtener amplificadores ya etiquetados, lo cual constituye una gran reducción de costos (Schwengel et al. 1994, Schuelke 2000, Coburn et al. 2002, Bandelj et al. 2004, Hayden et al. 2008a, Londoño 2011).

## **2.6. Medición de la variabilidad genética**

La diversidad genética representa las variaciones en la secuencia de DNA, lo que a su vez podría resultar en diferencias en las secuencias de proteínas, y esto a su vez reflejarse en diferencias en caracteres físicos. En el caso del pato criollo, la diversidad se reflejaría en los colores del plumaje, la cantidad de músculo que llega a desarrollar, diferencias en la tasa de reproducción, supervivencia o el comportamiento de los individuos (Frankham et al. 2002).

La diversidad genética puede ser evaluada por una serie de índices, tales como: número de alelos y número efectivo de alelos en un locus, y heterocigosidad observada y esperada.

### **2.6.1. Número de alelos en un locus (A)**

Se considera al número de alelos ( $a_j$ ) como la cantidad de alelos diferentes expresados en un locus  $j$ , variando en un intervalo de  $1 < k < a_j$ . Y el número total de alelos ( $A$ ) se expresa como la suma de los  $n$  loci estudiados en una población  $i$ .

$$A = \sum a_j$$

A este tipo de medición se le suele usar también como una estimación de la variación genética, es decir, equivalente a la heterocigosidad. Debe tomarse en consideración que el estadístico depende mucho del tamaño poblacional ya que cuando mayor sea éste, mayor será la probabilidad de detectar alelos raros (AR, frecuencia <0.05) o alelos muy raros (AmR, frecuencia <0.01). Por tal motivo, este estadístico es considerado útil para estudios de variabilidad en los loci (Aranguren et al. 2005).

### 2.6.2. Número efectivo de alelos en un locus ( $A_e$ )

Se considera una segunda medida del número de alelos y se define como la probabilidad de que dos alelos de un locus elegido al azar en la población sean idénticos por descendencia. Esta probabilidad es igual al inverso de la frecuencia esperada de individuos homocigotos en la población, donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelos en un locus y  $H_e$  es la heterocigosidad esperada en un locus (definida más adelante).

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}$$

Si todos los alelos tuvieran la misma frecuencia,  $A_e$  sería proporcional a la heterocigosidad.  $A_e$  es apoyada por  $H_e$ , ya que esta última está menos influenciada por alelos raros y es menos sensible a los tamaños muestrales (Frankham et al. 2002).

### 2.6.3. Prueba para evaluar el Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El PIC es un índice que evalúa la informatividad y calidad de un marcador en la población, basándose en las frecuencias alélicas. Su valor se obtiene multiplicando la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad de que sean informativos (Botstein et al. 1980).

$$PIC = 1 - \sum P_i^2 - \sum (2 P_i^2 P_j^2)$$

El valor promedio de este índice representa la diversidad genética total (H) y muestra un rango de valor que va de 0 al 1 (Tabla 1).

**Tabla 1:** Clasificación de valores de PIC (Botstein et al. 1980)

PIC > 0.5	Altamente informativo
0.5 > PIC > 0.25	Razonablemente informativo
PIC < 0.25	Ligeramente informativo

#### **2.6.4. Prueba para evaluar la presencia de Alelos nulos**

Alelos nulos en microsatélites son alelos que no generan un producto de amplificación (PCR) detectable como resultado de mutaciones puntuales, que dificultan la hibridación de los cebadores con el DNA. Un elevado número de alelos nulos se interpreta como un exceso de homocigotos en relación con proporciones de H-W (Allendorf y Luikart 2007). Por otro lado, la frecuencia de alelos nulos es un indicador de la garantía de los resultados del análisis de microsatélites, sobre todo en estudios genéticos poblacionales. Dicha frecuencia es calculada mediante algoritmos basados en las frecuencias esperadas y observadas de los genotipos analizados (Van Oosterhout et al. 2004, Chapuis y Estoup 2006). Para esta investigación se utilizó la herramienta para detección de alelos nulos incluida en el programa MicroChecker (Van Oosterhout et al. 2004).

#### **2.6.5. Heterocigosidad**

La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí (Nei y Li 1979). Este parámetro es distinguido por representar el grado de diversidad genética en un determinado locus ( $H_i$ ) y su promedio en N loci dentro de una población es la mejor medida general de la diversidad genética (Nei 1987).

$$H = \frac{1}{N} \left[ \sum_{i=1}^N H_i \right]$$

Por otro lado, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) es la suma de las frecuencias de todos los heterocigotos observados en una muestra de genotipos:

$$H_o = \sum_{i=1} H_i$$

#### **2.6.6. Prueba de Equilibrio Hardy – Weinberg (EHW)**

El EHW supone que una población es grande, con apareamiento al azar y libre de los efectos de mutación, migración y selección natural. Cuando estas condiciones se cumplen, las frecuencias alélicas no cambian y las frecuencias genotípicas se estabilizan después de una generación en las proporciones de equilibrio de Hardy – Weinberg  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias de los alelos (Allendorf y Luikart 2007, Pierce 2009). Dado que no existe población alguna que satisfaga estos supuestos (es decir no existe población en equilibrio), ya que todas las fuerzas evolutivas posibles causan el incumplimiento de al menos un supuesto, lo que debemos estimar es la magnitud de la desviación del EHW. Si el equilibrio de H-W presenta una desviación significativa ( $P\text{-value} > 0.05$ ) estará asociada a deficiencia de heterocigotos o a la presencia de los llamados “alelos nulos” (Guo y Thompson 1992, Edwards et al. 1992, Holsinger 2008).

Por otro lado, un procedimiento conocido como Corrección de Bonferroni (Allendorf y Luikart 2007) es utilizado cuando se llevan a cabo varias pruebas estadísticas simultáneamente, ya que mientras que un valor  $\alpha$  dado puede ser apropiado para cada comparación individual, no lo es para el conjunto de todas las comparaciones. La finalidad de este procedimiento es evitar una gran cantidad de falsos positivos. El valor  $\alpha$  (grado de confianza) necesita ser ajustado para tener en cuenta el número de comparaciones que se realiza. Supongamos que las pruebas de Hardy-Weinberg se

realizan en 20 loci. En lugar de utilizar el tradicional 0.05 a nivel de  $\alpha$ , probaríamos un nuevo valor de  $\alpha$  a partir de la fórmula de la Corrección de Bonferroni (CB):

$$CB = \frac{0.05}{N^{\circ}loci}$$

Esto asegura que la posibilidad general de cometer un error de tipo I (rechazar una hipótesis nula verdadera) es todavía inferior a 0.05.

## **2.7. Análisis de la estructuración genética poblacional**

Una población puede ser considerada como una unidad, pero ante determinadas circunstancias se puede subdividir o estructurar en varias de menor tamaño. En tal caso, la relación entre cada subpoblación puede variar según el grado de flujo génico que exista. Para que una población se considere estructurada se debe detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, debido a la ausencia de flujo génico. Por otro lado, una baja estructura genética indica poblaciones casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas, de esta forma, el flujo génico actúa como una fuerza evolutiva cohesiva que evita que cada una de las poblaciones sean demasiado diferentes (Slatkin 1994, Eguiarte 2010).

### **2.7.1. AMOVA**

El AMOVA (Analysis of Molecular Variance) es un procedimiento estadístico, cuyo modelo fue inspirado en el ANOVA. Permite la división jerárquica de la variación genética entre las poblaciones y regiones, así mismo, también permite estimar los estadísticos F y R. Se basa en una matriz de distancias genéticas entre las muestras para medir y comparar la estructura genética de las poblaciones y considera como hipótesis nula ( $H_0$ ) que las subpoblaciones pueden ser entendidas como parte de una única población genética. Por otro lado, si se realiza múltiples mezclas o permutaciones (100 o 1000) se puede obtener una buena estimación del valor que

esperaríamos si la hipótesis nula es verdadera. Por esta razón, AMOVA es una prueba estadística por permutación aleatoria.

### 2.7.2. Estadístico F

Las poblaciones subdivididas se estudian según tres niveles de diferenciación genética: dentro de cada subpoblación (I), entre subpoblaciones (S) y en la metapoblación o conjunto de las subpoblaciones (T) (Hartl 1981, Hartl y Clark 1989). La evaluación de esta subdivisión de poblaciones se estudia bajo los índices de fijación de Wright ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ ) (Wright 1951), los cuales se obtuvieron según el método descrito por Weir y Cockerham (1984).

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) es la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia respecto a la subpoblación, es decir, mide la desviación de las frecuencias genotípicas respecto a las frecuencias panmícticas, en términos de exceso o deficiencia de heterocigotos. Esto probablemente causado por cruzamientos entre individuos emparentados. El rango de su valor oscila entre -1 y 1, donde el exceso de heterocigotos (EHW) es representado por los valores negativos y la deficiencia de ellos por valores positivos.

El Coeficiente de coancestro o coeficiente de fijación ( $F_{ST}$ ) se define como la correlación de alelos de diferentes individuos en una misma población. Este estadístico evalúa el efecto de la subdivisión genética, es decir, mide la reducción de la heterocigosidad en una población. El rango de su valor oscila entre 0 y 1, donde los valores que se encuentren entre 0 y 0.05 indican muy poca diferenciación (panmixia); valores entre 0.05 y 0.15 moderada diferenciación; entre 0.15 y 0.25 alta diferenciación y por encima de 0.25 muy alta diferenciación. Los valores muy cercanos a 1 indican aislamiento completo o la subdivisión extrema de la metapoblación.

$$F_{ST} = \frac{\sum(A_I)}{\sum(A_I + B_I)}$$

El Coeficiente general de consanguinidad o índice de fijación en la metapoblación ( $F_{IT}$ ) mide la probabilidad de que dos alelos pertenecientes al mismo locus sean idénticos por descendencia respecto a la metapoblación. El rango de su valor oscila entre -1 y 1, indicando exceso o deficiencia de heterocigotos. Así mismo, la reducción total de H se atribuye a los fenómenos de endogamia en las subpoblaciones ( $F_{IS}$ ) así como a los efectos de la propia subdivisión ( $F_{ST}$ ).

Cabe resaltar que entre los estadísticos mencionados, el más usado es el  $F_{ST}$  que evalúa la variación de H entre subpoblaciones con respecto a una población total.

### 2.7.3. Estadístico R

Al ocurrir una mutación en un locus microsatélite se gana o pierde una repetición, lo que hace que ambos alelos se diferencien en un solo motivo, es decir, están más relacionados y comparten un ancestro común más reciente. Por tal motivo Slatkin (1995) propuso una medida de diferenciación genética ( $R_{ST}$ ), análoga al  $F_{ST}$  de Wright (1951) y  $G_{ST}$  de Nei (1973). Así mismo,  $R_{ST}$  está basado en el SMS (Stepwise Mutation Model), el cual permite estimar las relaciones entre individuos y su estructura poblacional en ausencia de homoplasia (cuando dos alelos son idénticos por el estado, pero no por descendencia) (Slatkin 1995). El modelo se basa en rasgos con distribución continua, número de pares o el número de repeticiones de base, y grupos de individuos de acuerdo con el número de repeticiones. Su fórmula se expresa como:

$$R_{ST} = \frac{(S - S_W)}{S}$$

Donde S y  $S_W$  son los promedios al cuadrado de la diferencia de los tamaños de alelos entre los pares de alelos dentro de las poblaciones y entre los pares de poblaciones (Michalakis y Excoffier 1996, Balloux y Lugon 2002).

#### **2.7.4. Análisis de asignación a grupos por probabilidades bayesianas**

Uno de los programas más utilizados para el análisis de agrupamientos es STRUCTURE v.2.3 (Pritchard et al. 2010), el cual emplea un método de agrupación bayesiana que ayuda a inferir la estructuración poblacional. Este método asigna los individuos (probabilísticamente) a K grupos (agrupamientos-K), sin la necesidad de conocer *a priori* los límites poblacionales y reduciendo al mínimo las desviaciones del EHW. El enfoque utiliza las frecuencias alélicas en cada locus para estimar los grupos genéticamente distintos (K) y es por eso que se puede asumir cierto grado de flujo génico entre los grupos. El programa también utiliza MCMC con la finalidad de que suficientes iteraciones se ejecuten para obtener muestras aproximadas de una distribución de probabilidad cuando esta no puede ser simulada directamente. La primera etapa de iteraciones recibe el nombre de burn-in, calentamiento o pre-corrída. Este enfoque no siempre suele brindar una respuesta definitiva ya que muchas veces las diferencias en los cocientes de probabilidad son sutiles; sin embargo, una alternativa complementaria es la identificación del valor más probable de K mediante una prueba de tasa de varianzas utilizando las probabilidades generadas por el programa STRUCTURE. Esta prueba, que es realizada con el programa STRUCTURE HARVESTER WEB v0.6.94 (Earl y VonHoldt 2012), proporciona valores más robustos generando una gráfica para identificar el mejor valor para K. Esto se conoce como el método Delta K de Evanno et al. (2005).

### **3. HIPÓTESIS**

#### *Hipótesis nula*

Existe una reducida diversidad genética así como estructura genética en las poblaciones de patos criollos de los departamentos de Lambayeque y San Martín.

#### *Hipótesis alternativa*

Existe una moderada diversidad genética y ausencia de estructura genética en las poblaciones de patos criollos de los departamentos de Lambayeque y San Martín.

### **4. OBJETIVOS**

#### *Objetivo General*

Determinar la diversidad genética y estructura genética de *Cairina moschata* de los departamentos de Lambayeque y San Martín usando marcadores microsatélites.

#### *Objetivos Específicos*

- Evaluar la transferibilidad de 24 marcadores microsatélites en el pato criollo.
- Determinar la diversidad genética intra e inter poblacional de patos criollos de los departamentos de Lambayeque y San Martín.
- Determinar la representatividad a nivel de diversidad genética, de las EEAs (INIA) sobre los departamentos evaluados.
- Determinar la estructuración genética de las poblaciones.
- Determinar el grado de endogamia en la población total y EEAs.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

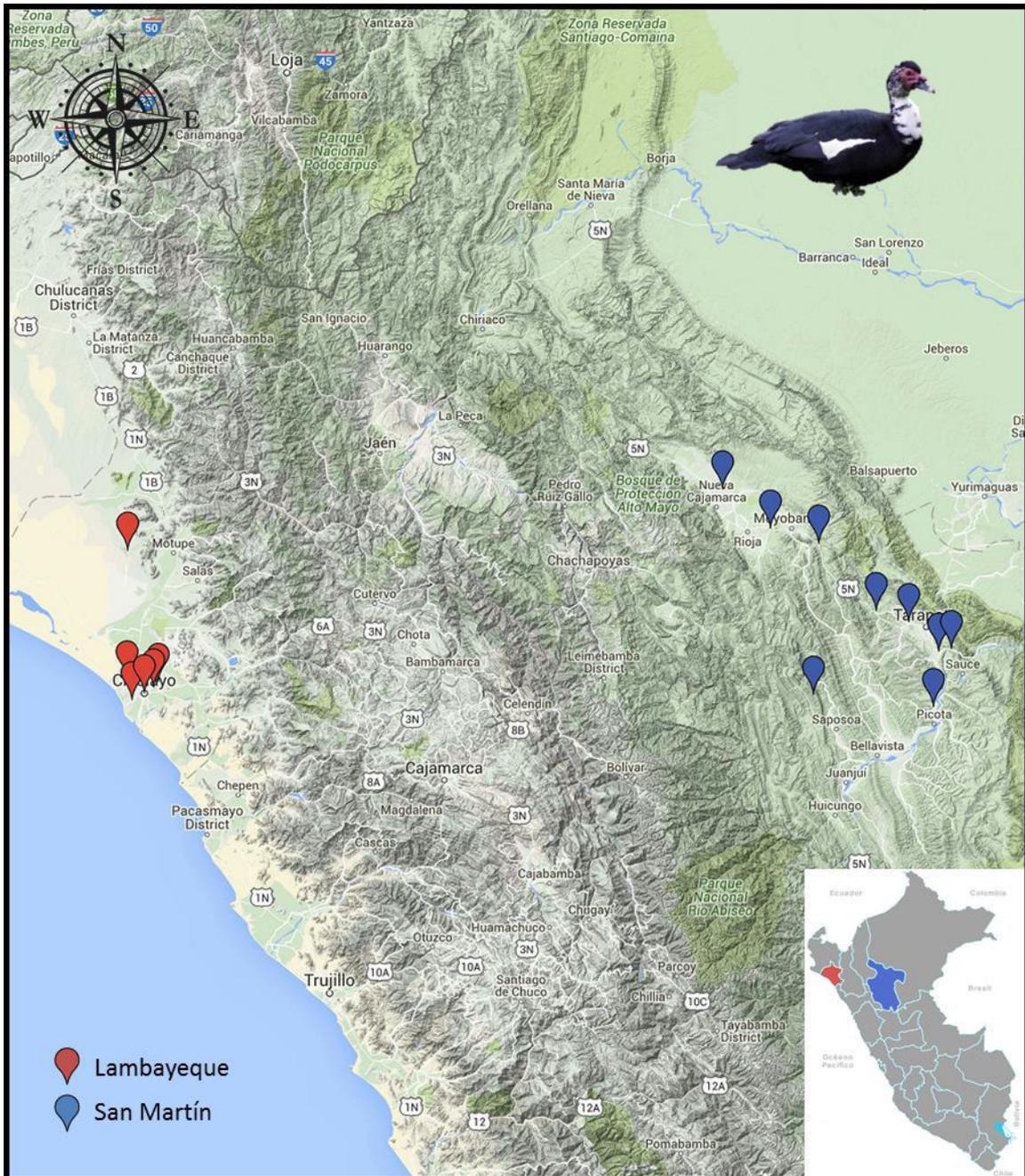
### 5.1. Área de estudio

Las muestras biológicas fueron colectadas en el año 2014 durante el mes de noviembre y estuvo conformada por un total de 352 patos criollos *C. moschata* pertenecientes a las estaciones experimentales agrarias (EEA) del INIA de los departamentos de Lambayeque (EEA Vista Florida) y San Martín (EEA El Porvenir), además se realizaron colectas en los distritos aledaños (Tabla 2).

En el departamento de Lambayeque, 70 individuos fueron colectados en la EEA Vista Florida (06°35'25.0" S, 76°19'04.6" W) y 59 en los alrededores (Lam arl  $\text{radio promedio} = 22.4$  km); mientras que en el departamento de San Martín, 102 individuos fueron colectados en la EEA El Porvenir (06°35'25.0" S, 76°19'04.6" W) y 121 en los alrededores (SM arl  $\text{radio promedio} = 59.2$  km) (Figura 3). Ambas EEAs participantes pertenecen al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) (Figura 4).

**Tabla 2:** Número y procedencia de los patos criollos muestreados en los departamentos de Lambayeque y San Martín (noviembre, 2014).

DEPARTAMENTO	ESTACIÓN Y ALREDEDORES	Nº INDIVIDUOS
LAMBAYEQUE	EEA VF	70
	Lam arl	59
SAN MARTÍN	EEA EP	102
	SM arl	121



**Figura 3:** Ubicación de las localidades de muestreo en los departamentos de Lambayeque y San Martín (2014). Mapa generado por Google Earth, 2015.



**Figura 4:** Situación de crianza de Lam y SM. A y B) Grupos reproductores de la EEA VF. (C) Corral para crianza en Lam arl. D y E) Patos criollos del departamento de San Martín. (F) Corral en SM arl. (Fuente propia)



**Figura 5:** Procedimiento de colecta de la muestra biológica. A y B) Extracción de plumas cobertoras alares. C) Anillamiento de los patos criollos. D) Encuesta y recolección de data. (Fuente propia)

## 5.2. Colecta de muestras

Para la colecta, los patos seleccionados fueron sujetados por una persona mientras que una segunda retiró al menos cinco plumas por ala. Específicamente se colectaron las plumas cobertoras primarias y/o secundarias. Una vez obtenidas las plumas, estas fueron guardadas en bolsas herméticas. Cada muestra fue etiquetada debidamente con los números de accesoión, realizándose al mismo tiempo el aretado de los patos muestreados. Además, se informó a los propietarios del motivo de la colecta adjuntando sus datos en una encuesta (Figura 5, Anexo 2).

## 5.3. Extracción de DNA genómico a partir de plumas

El DNA fue extraído a partir de la región del cálamo o región terminal de las plumas mediante el método Fenol-Cloroformo de Kocher et al. (1989), Vigilant et al. (1989) y

Thomas et al. (1990); con algunas modificaciones menores (Taberlet 1991, Bello et al. 2001).

Porciones de entre 1 y 2 cm del cálamo de las plumas fueron cortados transversalmente e introducidos en un tubo de microcentrifuga (2.0 mL) junto con 750  $\mu$ L buffer TE<sub>20:5</sub> (Tris EDTA proporción 20:5, pH 8), 75  $\mu$ L de SDS 10% y 1  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/ $\mu$ L). La digestión fue llevada a cabo en un volumen final de 825  $\mu$ L e incubada en agitación constante a 58 °C por 3 horas. Luego se separaron las impurezas agregando 500  $\mu$ L de acetato de potasio 3M. El DNA se precipitó con una solución de isopropanol y etanol absoluto y luego se resuspendió con TE<sub>20:5</sub>. Se realizó dos lavados con soluciones de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1 para facilitar la separación de la fase acuosa de la orgánica (Bello et al. 2001); luego se lavó con acetato de potasio 3M y cloruro de sodio 5M para precipitar las impurezas presentes en el DNA. Así mismo, se agregó etanol absoluto para precipitar el DNA, de esta manera se aprovechó eficientemente el DNA de las pequeñas cantidades de tejido, como piel y sangre, que quedaron en las plumas (Sambrook y Russell 1989). El precipitado se resuspendió en 30-300  $\mu$ L de TE<sub>10:1</sub> (Tris EDTA proporción 10:1, pH: 8) dependiendo del tamaño de este. Finalmente, el DNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su análisis (Figura 6).



**Figura 6:** Procedimiento para retirar el cálamo de las plumas. A) Cálamo de la pluma. B) Corte del cálamo. C) Cálamo cortado transversalmente en buffer de lisis. (Fuente propia)

#### **5.4. Evaluación de la extracción del DNA**

Para verificar la presencia y calidad del DNA, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, preparados con buffer TBE 1X (Tris-HCl, ácido bórico, EDTA; pH 8) y 1  $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL). Se cargó 2  $\mu$ L de DNA stock mezclado con 6  $\mu$ L de Sal B 2X (azul de bromofenol, xilencianol, naranja G y sucrosa), el cual funciona como indicador de la migración del DNA. La electroforesis se corrió a un voltaje de 120 V por 20 minutos. Los geles fueron fotografiados en un Transiluminador UV Chemi XR y su edición se realizó con el programa Quantity One v. 4.6.3 (Biorad, Hercules, CA, USA). Así mismo, la cuantificación del DNA se llevó a cabo mediante lecturas en un Espectrofotómetro Epoch (Biotek, Winooski, VT, USA). Se consideró una razón de absorbancia (260/280) mayor a 1.8 para continuar con el proceso de amplificación de microsatélites. Así mismo, el DNA stock se llevó a una concentración final aproximada de 30 ng/ $\mu$ L, ya que a esa concentración se observaron mejores amplificadas. Las diluciones finales de DNA se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento mientras que los DNA stock fueron almacenados a -70 °C.

#### **5.5. Selección de microsatélites**

Para el análisis de microsatélites se escogieron 24 cebadores SSRs en función a su alto contenido polimórfico (PIC) a partir de estudios previos en el pato Pekín *A. platyrhynchos*. Los cebadores originalmente diseñados para *A. platyrhynchos* han sido exitosamente probados en poblaciones de *C. moschata* del continente asiático (Maak et al. 2003, Huang et al. 2005).

#### **5.6. Amplificación de microsatélites**

Las reacciones de amplificación por PCR multiplex se llevaron a cabo utilizando aquellos 18 marcadores microsatélites que resultaron tener una transferibilidad exitosa, mientras que el resto de marcadores se excluyeron por no presentar amplificadas para la especie objetivo. Los cebadores directos fueron construidos con

una extensión de 19 pb que es complementaria a la cola M13, la que a su vez fue marcada con fluoróforos, como: 6- FAM (azul), VIC (verde), NED (negro) y PET (rojo) (Tabla 3).

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10  $\mu$ L, considerando las siguientes concentraciones finales (Mullis 1990): 1X buffer de PCR, dNTPs 0.2 mM,  $MgCl_2$  2.0, 2.5 y 3.0 mM, cebador 0.03-0.4  $\mu$ M (dependiendo del protocolo de amplificación), 0.1 U de Taq Polimerasa y 2  $\mu$ L de DNA (30 ng/ $\mu$ L).

Se elaboraron dos programas de amplificación. El primero consistió de una fase de desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de fase de desnaturalización a 95 °C por 45 seg, luego una etapa de hibridación del cebador a 59 °C (fluoróforo FAM) y 53 °C (fluoróforo NED) por 1 min; la fase de extensión del DNA a 72 °C por 60 seg. Después una fase de extensión final a 72 °C por 10 min y se detiene a 4 °C por tiempo indefinido (Innis y Gelfand 1990, Kainz 2000). El segundo programa de amplificación es una modificación respecto al primero. El número de ciclos es 25 y la etapa de hibridación del cebador es de 57 °C (fluoróforos VIC y PET) por 1 min. Además previo a la extensión final se adiciona 10 ciclos con fase de desnaturalización de 95 °C por 45 seg, una etapa de hibridación para la cola M13 a 53 °C por 45 seg, una fase de extensión a 72 °C por 60 seg (Schwengel et al. 1994, Schuelke 2000, Coburn et al. 2002, Bandelj et al. 2004, Hayden et al. 2008b, Rodrigues et al. 2009, Londoño 2011).

Los productos de los PCR multiplex fueron separados en un analizador genético ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) mediante electroforesis capilar, utilizando un gel polímero POP 7 (Performance Optimised Polymer). Cada 0.5-1.0  $\mu$ L de producto amplificado fue mezclado con un total de 10  $\mu$ L de formamida Hi-Di y marcador alélico interno de 600 pb GeneScan LIZ™ en proporción (9.7 : 0.3). Luego las muestras se sometieron a 94 °C durante 3 min para desnaturalización, e

inmediatamente se induce un choque térmico colocando las muestras en hielo (-20 °C) por 3 minutos antes de realizar la corrida en el analizador genético.

### **5.7. Análisis de datos**

Los electroferogramas obtenidos después del análisis genético fueron analizados con el programa GeneMapper v. 4.1 Applied Biosystems (Foster City, CA) con la finalidad de asignar los pesos moleculares (pb) correspondientes a los alelos obtenidos. Los alelos, que son representados como picos en los electroferogramas, se miden en URF (unidades de fluorescencia) y para considerarse un verdadero alelo, y no ruido, debe superar los 100 URF. Finalmente, la base de datos con los genotipos de cada muestra fue exportada en una hoja de cálculo (programa EXCEL) para los correspondientes análisis estadísticos.

### **5.8. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico consistió en la medición de la variabilidad genética y el análisis de la estructura genética poblacional. En el primer caso, a través de un análisis de frecuencias alélicas, con el programa Cervus v.1.0 (Kalinowski et al. 2007), se obtuvo el número de alelos y las frecuencias alélicas por locus, mientras que el número efectivo de alelos fue calculado a partir de la fórmula de Frankham et al. (2002). Con el mismo programa, se obtuvo la heterocigosidad ( $H_o$  y  $H_e$ ) por locus y heterocigosidad promedio, las cuales estuvieron asociadas al valor de PIC, y a la presencia de alelos nulos, valor que fue obtenido con el programa MicroChecker (Van Oosterhout et al. 2004). Para la obtención de alelos nulos se utilizó el método de simulación MCMC y cuatro algoritmos para la identificación de las frecuencias alélicas (Oosterhout, Chakraborty, Brookfield1 y Brookfield2).

La evaluación del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se realizó con el programa GENEPOP v. 4.1 (Rousset 2008) y fue corroborado con el programa GenAIEx6 (Peakall y Smouse 2012). El rango de confianza considerado fue de  $P\text{-valor} > 0.05$  y

realizando la prueba de Corrección de Bonferroni para 18 loci, el rango de confianza se extendió a  $P\text{-valor} > 0.003$ . Así mismo, para la prueba de H-W se consideró como hipótesis nula el EHW.

En el segundo caso, con el programa GenAIEX6, se hizo una prueba de AMOVA (Meirmans 2012) utilizando las distancias genéticas y también se calculó los estadísticos F ( $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ ) y R ( $R_{IS}$  y  $R_{ST}$ ) indicando en ambos casos el agrupamiento-K, el cual consiste en la asignación del tamaño regional y tamaño poblacional. Así mismo, se estableció un número de permutaciones de 9 999, recomendada para muestras grandes.

Complementariamente, la estructuración genética poblacional fue evaluada con el programa STRUCTURE v.2.3 (Pritchard et al. 2010) y el programa en línea STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl y VonHoldt 2012). Con el programa STRUCTURE v.2.3 se asignó un set de parámetros, tales como, longitud del periodo de burn-in (10 000), número de MCMC (100 000) y modelo de ancestralidad2q (Modelo de Mezcla). Se trabajó con un rango de agrupamiento de  $K=1$  a  $K=7$  y el número de iteraciones fue de tres. Finalmente, con el programa STRUCTURE HARVESTER, utilizamos los archivos de las probabilidades likelihood generadas y con el método Delta K (Evanno et al. 2005) se obtuvo un valor para graficar el mejor valor para K.

**Tabla 3:** Secuencias de los 18 iniciadores seleccionados para la amplificación de microsatélites en *Cairina moschata*.

LOCUS	Secuencias 5'-3' Directa (F) e Inversa (R)	FLUORÓFORO	REFERENCIA
APH01	F: *CACTTGCTCTTCACTTTCTTT R: GTATGACAGCAGACACGGTAA	NED	Maak et al, 2000; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008.
APH07	F: *ACATCTTTGGCATTGAA R: CATCCACTAGAACACAGACATT	PET	Maak et al, 2000; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008; Khan Ahmadi et al, 2007.
APH09	F: *GGATGTTGCCCCACATATTT R: TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA	PET	Maak et al, 2000; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008; Khan Ahmadi et al, 2007.
APH13	F: *CAACGAGTGACAATGATAAA R: CAATGATCTCACTCCCAATAG	HEX	Maak et al, 2003; Wu et al, 2008.
APH15	F: *TGAATATGCGTGGCTGAA R: CAGTGAGGAATGTGTTTGAGTT	6-FAM	Maak et al, 2003; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008.
APH18	F: *TTCTGGCCTGATAGGTATGAG R: GAATTGGGTGGTTCATACTGT	HEX	Maak et al, 2003; Wu et al, 2008.
APL02	F: *GATTCAACCTTAGCTATCAGTCTCC R: CGCTCTTGGCAAATGTCC	6-FAM	Denk et al, 2004
APL11	F: *AACTACAGGGCACCTTATTTCC R: TTGCATCAGGGTCTGTATTTTC	NED	Denk et al, 2005
APT004	F: *GGGCAGGAAAATCTCCTGAAT R: TCTCAGTGGCTGAGCGGTC	NED	Hsiao et al, 2008
APT021	F: *GCACTCCCTAACTAGTAGCGCTCT R: GAAGCATTGTCATACTTGCCCTGA	PET	Hsiao et al, 2008
APT025	F: *TCCTAAGAAACGTTGCTTCATAGACC R: GAGTTAAGCTTCATCACTCTGTGACTG	HEX	Hsiao et al, 2008
APT029	F: *TCTGCAAGGTATTCTCATTCTTATTCTT R: GATACGTAGAGTGGATGCTGGAGAT	PET	Hsiao et al, 2008
AY295	F: *GGCTTCTGTGCTCCTCAGAT R: GCACAAGTGGCATGTGTCAT	6-FAM	Ying Su et al, 2007.
CAUD001	F: *ACAGCTTCAGCAGACTTAGA R: GCAGAAAGTGTATTAAGGAAG	PET	Huang et al, 2005.
CAUD004	F: *TCCACTTGGTAGACCTTGAG R: TGGGATTCAAGTGAAGCCT	6-FAM	Huang et al, 2005.
CAUD022	F: *CATGCTGAGTGCCTATCCT R: CCAGGTCAGGCGTGTGCT	NED	Huang et al, 2005 .
CAUD026	F: *ACGTCACATCACCCACAG R: CTTTGCCTCTGGTGAGGTTT	6-FAM	Huang et al, 20056.
CMO211	F: *GGATGTTGCCCCACATATTT R: TTGCCTTGTTTATGAGCCATT	HEX	Ying Su et al, 2007.

\* = *cola M13* (CACGACGTTGTAACGAC)

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Extracción de DNA a partir de plumas**

Utilizando el protocolo modificado de Kocher et al. (1989) se obtuvo DNA total de buena calidad y concentración (Max= 1 000 ng/ $\mu$ L, Min=30 ng/ $\mu$ L) a partir de muestras de plumas cobertoras alares. Se observó que la mayor cantidad de DNA y de mejor calidad fue obtenida de las muestras de plumas más jóvenes (en formación) así como de las plumas con restos de sangre, por la presencia de eritrocitos nucleados.

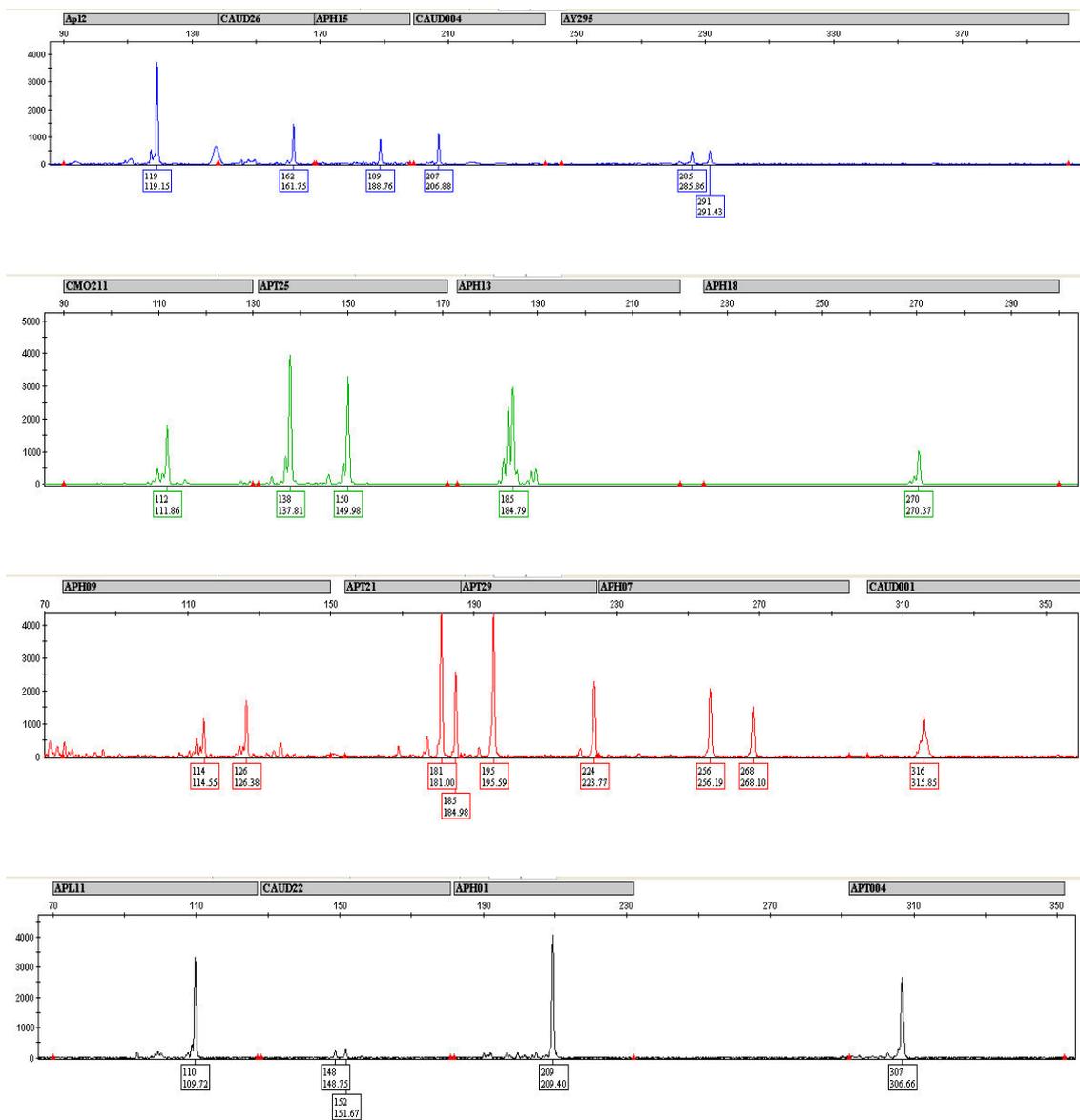
### **6.2. Parámetros indicativos de variabilidad genética**

#### **6.2.1. Número de alelos**

Los alelos expresados en la población total a través de los 18 marcadores microsatélites fueron identificados en electroferogramas mediante el programa GeneMapper (Figura 7).

En 352 individuos de *C. moschata* analizados, el número total de alelos (A) fue de 118, con una media de 6.611 por locus. La mayor diversidad alélica la presentó el locus AY295 con 31 alelos y las más bajas las presentaron APH15, APL02 y CAUD004 con solo 1 alelo (Tabla 4). De las dos poblaciones analizadas, la población de SM mostró mayor diversidad alélica, con una media de 6.1 (92.4%), contrario a la población de Lam, con 3.9 (59.6%).

Los alelos comunes para ambas poblaciones fueron 63, mientras que los exclusivos fueron 47 en la población de SM y 8 en Lam (Tabla 4).



**Figura 7:** Electroferogramas de microsatélites obtenidos a partir del DNA total de *C. moschata* usando el programa GeneMapper. A) 6-FAM, B) VIC, C) PET y D) NED.

**Tabla 4:** Número total de alelos por población de SM y Lam.

Locus	Población		A	A <sub>e</sub>
	SM	Lam		
APH01	5	3	6	1.06
APH07	7	3	7	2.96
APH09	4	3	6	1.9
APH13	6	4	6	3
APH15	1	1	1	1
APH18	2	1	2	1.01
APL02	1	1	1	1
APL11	3	1	3	1.01
APT004	5	4	5	1.56
APT21	7	5	8	3.03
APT25	8	6	9	5.1
APT29	7	7	8	2.85
AY295	31	18	34	5.95
CAUD001	3	3	3	1.43
CAUD004	1	1	1	1
CAUD22	10	6	10	3.02
CAUD26	4	3	4	1.18
CMO211	4	1	4	2.12
<b>Total</b>	109	71	118	40.19
<b>Promedio</b>	6.1	3.9	6.6	2.23
<b>S.D.</b>	6.73	4.01	7.40	1.46
<b>Alelos exclusivos</b>	47	8	-	-

*A=número de alelos, A<sub>e</sub>= número de alelos efectivos*

### 6.2.2. Frecuencias alélicas y alelos raros

Los marcadores APH15, APL02 y CAUD004 solo mostraron un alelo de 119 pb, 189 pb y 207 pb respectivamente y sus frecuencias fueron iguales tanto en la población de SM y Lam (100%).

**a) APH01**

En ambas poblaciones el alelo más común fue el de 209 pb (0.96) y el menos frecuente el de 211 pb (0.02). La población de SM presentó tres alelos exclusivos de 187 pb, 189 pb y 195 pb, con frecuencia baja (0.004), mientras que la población de Lam presentó solo un alelo exclusivo de 191 pb (0.007%) (Figura 8).

**b) APH07**

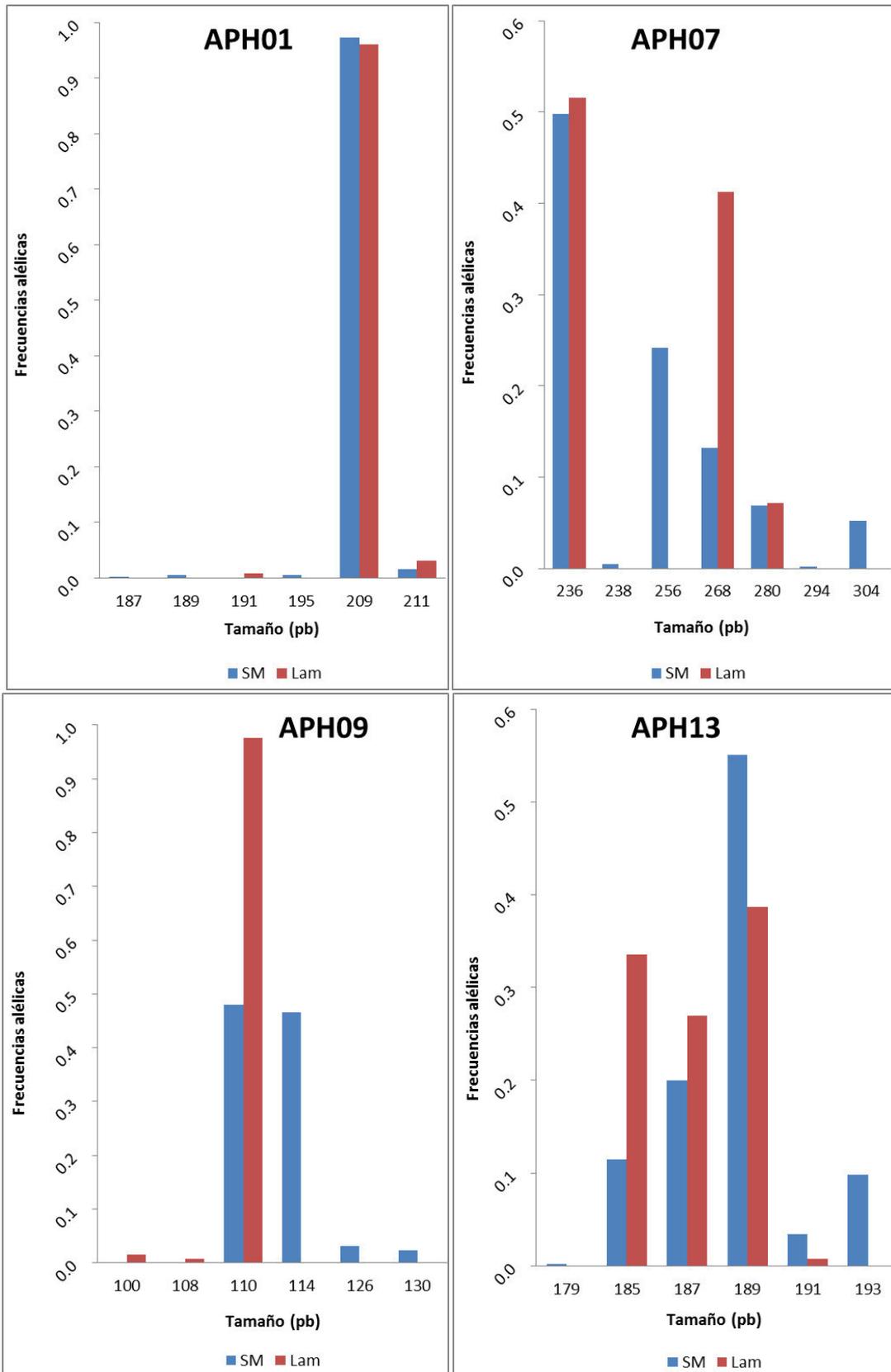
En ambas poblaciones los alelos más frecuentes fueron los de 268 pb y 236 pb (0.5) mientras que el menos frecuente fue el alelo de 280 pb (0.06). La población de SM presentó cuatro alelos exclusivos de 238 pb, 256 pb, 294 pb y 304 pb de baja frecuencia (0.004 –0.24) (Figura 8).

**c) APH09**

El alelo de 110 pb es más frecuente en la población de SM (0.5) y Lam (0.9). En cuanto a alelos exclusivos, la población de SM presentó tres de 114 pb, 126 pb y 130 pb mientras la población de Lam presentó dos de 100 pb y 108 pb (Figura 8).

**d) APH13**

En ambas poblaciones, los alelos más comunes fueron los de 187 pb y 189 pb, con un rango de frecuencia de 0.20 a 0.55; mientras que los alelos menos comunes fueron los de 185 pb y 191pb, con un rango de frecuencia de 0.007 a 0.386. La población de SM presentó dos alelos exclusivos de 179 pb y 193 pb de baja frecuencia (rango de 0.002 a 0.098) (Figura 8).



**Figura 8:** Distribución de las frecuencias alélicas de los loci APH01, APH07, APH09 y APH13.

**e) APH18**

La población de SM presentó un alelo de alta frecuencia de 270 pb (0.99) y otro de baja frecuencia de 272 pb (0.004), mientras que la población de Lam solo presentó un alelo de 270 pb. (Figura 9).

**f) APL11**

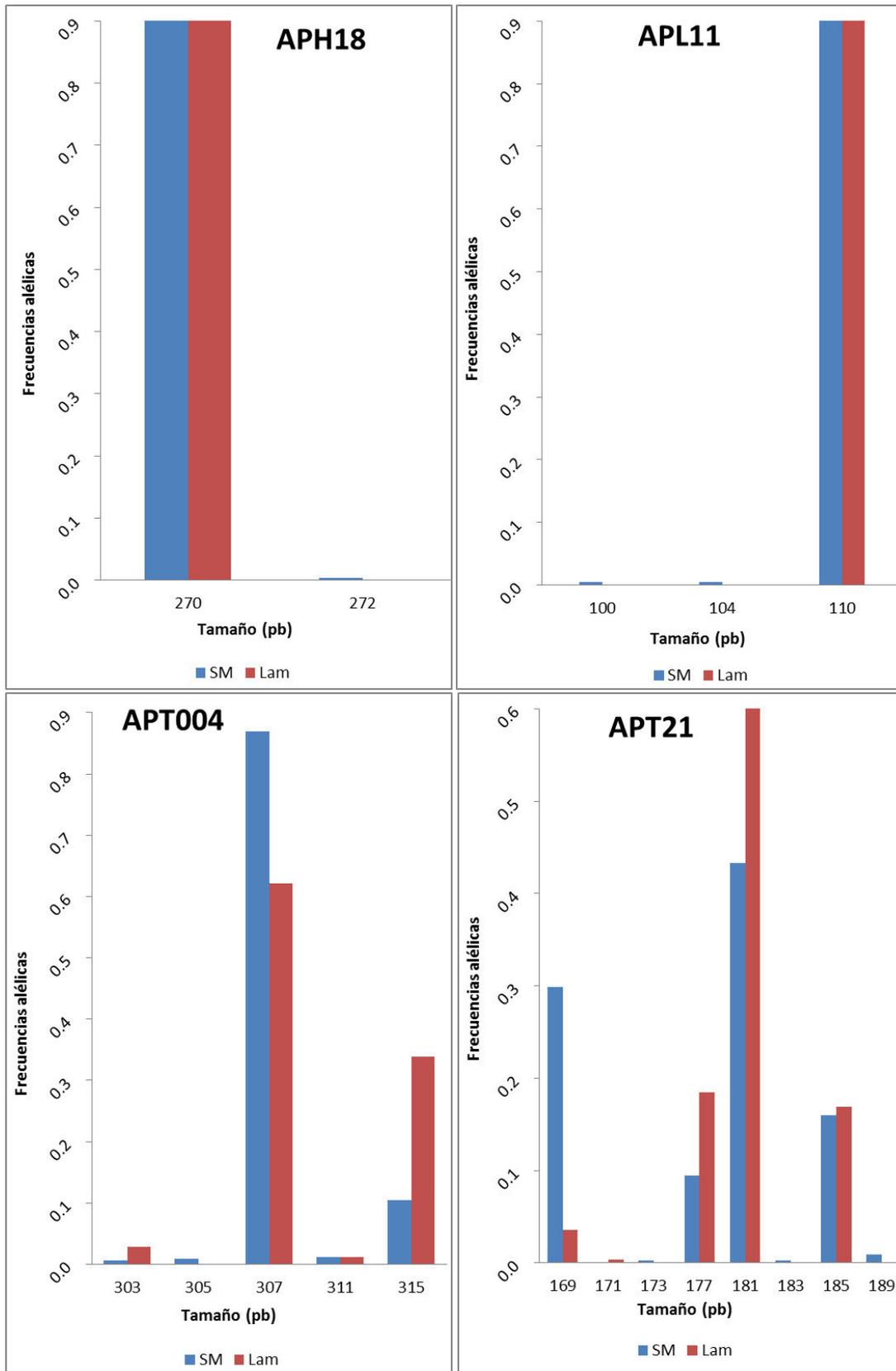
El alelo de 110 pb fue el más común en la población de SM (0.99) y el único registrado para la población de Lam. Los alelos exclusivos para la población de SM fueron los de 100 pb y 104 pb con una frecuencia de 0.004 (Figura 9).

**g) APT004**

En ambas poblaciones, los alelos con mayor frecuencia fueron los de 307 pb (0.8 y 0.6) y 315 pb (0.1 y 0.3). Otros alelos de menor frecuencia fueron los de 303 pb y 311 pb. La población de SM presentó un alelo exclusivo de 305 pb, de baja frecuencia (0.009) (Figura 9).

**h) APT21**

Para ambas poblaciones, el alelo más común fue el de 181 pb (0.4 y 0.6), mientras que los menos frecuentes fueron los de 169 pb, 177 pb y 185 pb. La población de SM presentó tres alelos exclusivos de 173 pb, 183 pb y 189 pb de baja frecuencia (0.002 a 0.009), mientras que la población de Lam presentó solo uno de 171 pb, también de baja frecuencia (0.003) (Figura 9).



**Figura 9:** Distribución de las frecuencias alélicas de los loci APH18, APL11, APT004 y APT21.

***i) APT25***

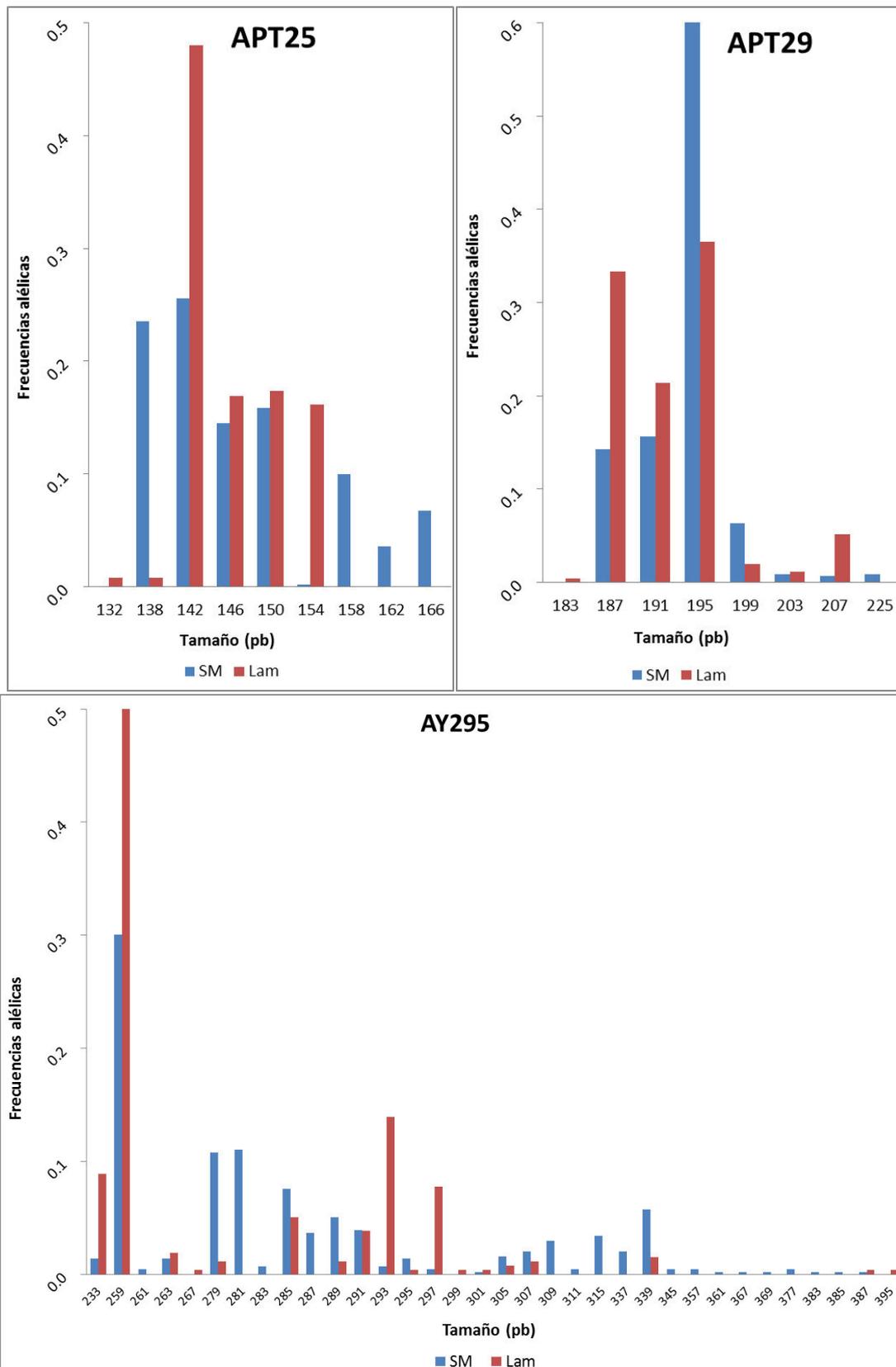
Ambas poblaciones presentaron alelos comunes de 138 pb, 142 pb, 146 pb, 150 pb y 154pb con un rango de frecuencia de 0.002 a 0.479. La población de SM presentó tres alelos exclusivos de 158 pb, 162 pb y 166 pb de baja frecuencia (0.03 a 0.09), mientras que la población de Lam presentó solo uno de 132 pb (0.008) (Figura 10).

***j) APT29***

Los alelos más frecuentes en ambas poblaciones fueron los de 187 pb, 191 pb y 195 pb (0.1 a 0.6) y los menos comunes fueron los de 199 pb, 203 pb y 207 pb (0.006 a 0.009). La población de SM presentó un alelo exclusivo de 224 pb (0.009) y en la población de Lam, el alelo exclusivo fue de 183 pb (0.004) (Figura 10).

***k) AY295***

Posee la mayor cantidad de alelos (34), siendo el alelo de 259 pb el de mayor frecuencia (0.5 del total). El resto de alelos aparecieron en un rango de frecuencias de 0.005 a 0.2. La población de SM (31) presentó mayor cantidad de alelos frente a la población de Lam (18) (Figura 10).



**Figura 10:** Distribución de las frecuencias alélicas de los loci APT25, APT29 y AY295.

***l) CAUD001***

Para ambas poblaciones, el alelo de 316 pb fue el más común (0.86) mientras que los demás alelos de 314 pb y 318 pb, mostraron baja frecuencia (0.03 a 0.2) (Figura 11).

***m) CAUD22***

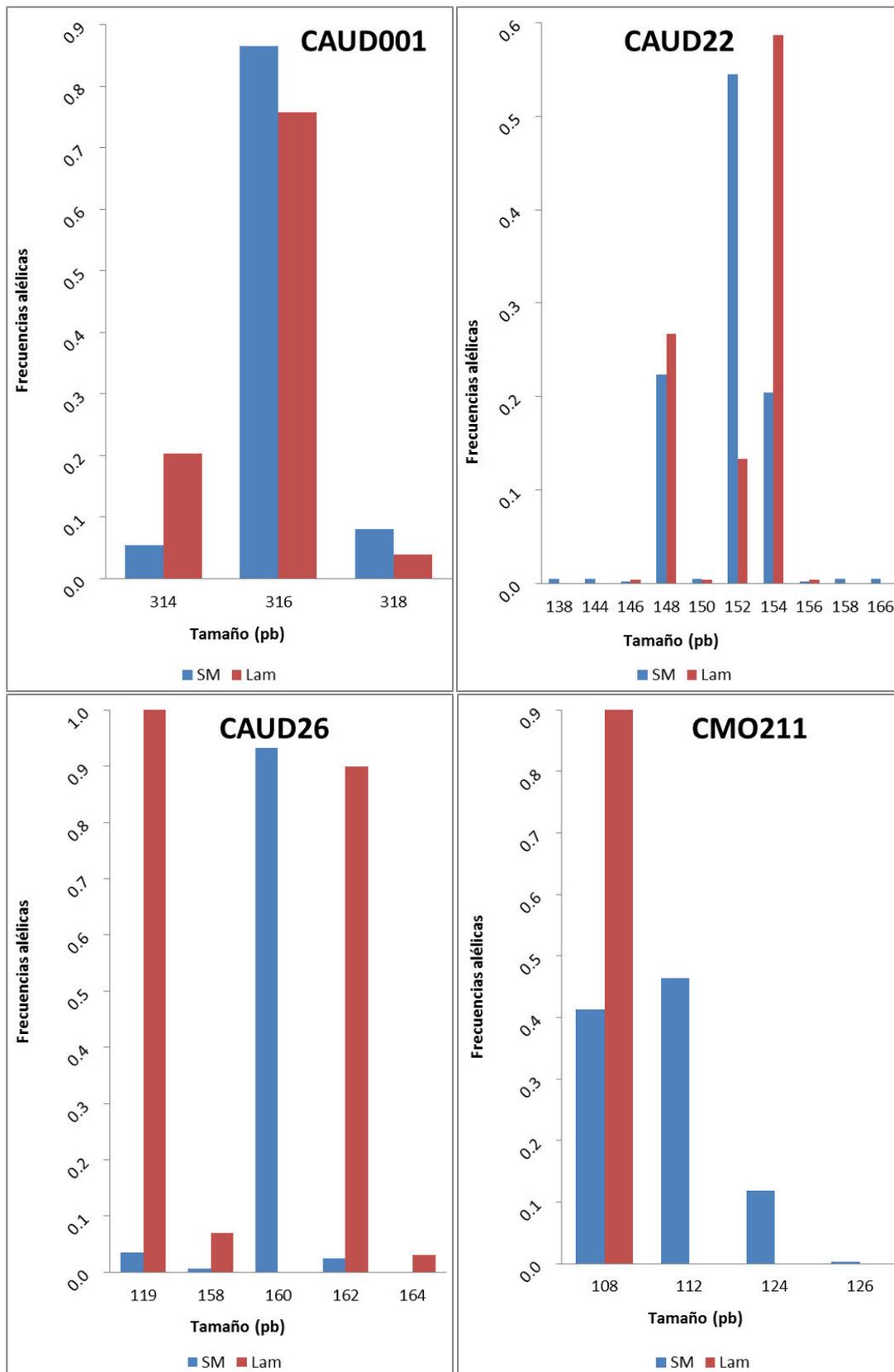
En ambas poblaciones, los alelos más comunes fueron de 148 pb, 152 pb y 154 pb con un rango de frecuencias de 0.1 a 0.5, mientras que los de menor frecuencia fueron los de 146 pb, 150 pb y 156 pb (0.002 a 0.004). A su vez, la población de SM presentó tres alelos exclusivos de 138 pb, 144 pb, 158 pb y 166 pb de baja frecuencia (0.004) (Figura 11).

***n) CAUD26***

Ambas poblaciones presentaron tres alelos en común, de los cuales el más frecuente fue el de 162 pb (0.9) y los de menor frecuencia fueron los de 158 pb y 164 pb (0.02 a 0.06). La población de SM presentó un alelo exclusivo de 160 pb de baja frecuencia (0.006) (Figura 11).

***o) CMO211***

La población de Lam presentó un alelo exclusivo de 108 pb. Mientras que la población de SM presentó dos alelos de 108 pb y 112 pb, de mayor frecuencia (40%), y otros dos de 124 pb y 126 pb de menor frecuencia (0.3 – 1%) (Figura 11).



**Figura 11:** Distribución de las frecuencias alélicas de los loci CAUD001, CAUD22, CAUD26 y CMO211.

A su vez, se presentaron alelos raros (AR) y alelos muy raros (AmR) en ambas poblaciones, cuyas frecuencias fueron menores a 0.05 y 0.01 respectivamente (Tabla 5).

**Tabla 5:** Frecuencias de AR y AmR en las poblaciones de SM y Lam.

	<b>AR (f &lt; 0.05)</b>	<b>AMR (f &lt; 0.01)</b>
San Martín	18	44
Lambayeque	15	17

*AR= Alelos raros, AmR= Alelos muy raros.*

### 6.2.3. Alelos nulos y PIC

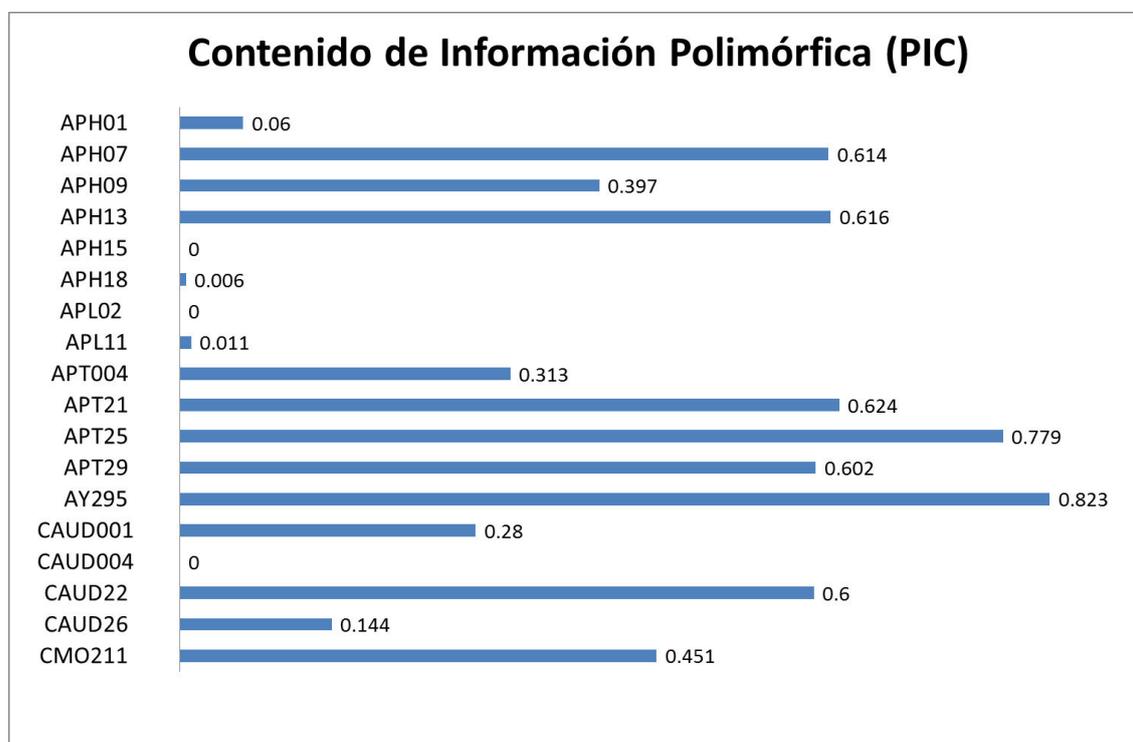
La prueba de alelos nulos, desarrollado bajo cuatro métodos, y considerando al menos uno de estos mayor a 0.1; muestra que 12 loci de los 18 analizados presentan alelos nulos. Solo los loci: APH01, APH15, APL02, CAUD001, CAUD004 y CAUD26 pasaron la prueba de alelos nulos bajo los cuatro métodos utilizados (Oosterhout, Chakraborty, Brookfield1 y Brookfield2) (Tabla 6).

El contenido de información polimórfica (PIC) muestra un valor promedio de 0.3511 en la población total. El locus con mayor índice es AY295 con 0.823 mientras que los más bajos valores son para los loci APL02, CAUD004 y CAUD26 con un valor de 0. El grupo de loci con mayor contenido polimórfico (PIC>0.5) son APH07, APH13, APT21, APT25, APT29, AY295 y CAUD22 (Figura 12).

**Tabla 6:** Estimación de alelos nulos calculada en la población total.

Locus	alelos nulos				
	P	O	Ch	B 1	B 2
APH01	no	-0.0271	-0.0095	-0.001	0
APH07	si	0.0888	0.1095	0.0783	0.1287
APH09	si	0.3992	1	0.3213	0.3317
APH13	si	0.2314	0.3266	0.1968	0.1968
APH15	no	0	0	0	0
APH18	si	0.0519	1	0.0056	0.0056
APL02	no	0	0	0	0
APL11	si	0.0902	1	0.0175	0.0175
APT004	si	0.067	0.0931	0.0307	0.1299
APT21	si	0.0626	0.0677	0.0508	0.1067
APT25	si	0.0379	0.0392	0.0336	0.0697
APT29	si	0.065	0.0727	0.0532	0.0951
AY295	si	0.1056	0.1185	0.0984	0.1184
CAUD001	no	0.0096	0.0229	0.0104	0.046
CAUD004	no	0	0	0	0
CAUD22	si	0.1089	0.1385	0.0818	0.814
CAUD26	no	0.0311	0.0469	0.0102	0.0102
CMO211	si	0.388	0.8636	0.3201	0.6715

*P= Presencia, O= Oosterhout, Ch= Chakraborty, B1= Brookfield 1, B2= Brookfield 2.*



**Figura 12.** Estimación del PIC en la población total

#### 6.2.4. Heterocigosidad

En la población total los valores de  $H_e$  variaron desde 0 (APH15, APL02 y CAUD004) hasta 0.832 (AY295) mientras que la  $H_o$  varió desde 0 (APH09, APH15, APH18, APL02 y CAUD004) hasta 0.739 (APT25), siendo la  $H_e$  promedio de 0.380. Así mismo, todos los loci analizados mostraron mayor  $H_e$  que  $H_o$ , lo cual indica un déficit de heterocigosidad.

En el análisis por departamento, la población de SM presentó un rango de  $H_e$  de 0 a 0.870, mientras que la población de Lam presentó un rango de 0 a 0.710; siendo en ambas poblaciones, el locus AY295 quien muestra los mayores valores de  $H_e$ . Así mismo, la población de SM mostró una  $H_e$  promedio de 0.373 y Lam una  $H_e$  promedio 0.314, presentándose en ambos departamentos que la  $H_e$  supera la  $H_o$  para cada uno de los loci (Tabla 7).

**Tabla 7:** Estimación de la heterocigosidad (Nei 1984), calculada para las poblaciones de SM y Lam, utilizando 18 loci.

Locus	SM		Lam		TOTAL	
	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$
APH01	0.054	0.053	0.063	0.076	0.057	0.061
APH07	0.571	0.67	0.452	0.561	0.528	0.662
APH09	0	0.552	0	0.046	0	0.474
APH13	0.317	0.635	0.375	0.667	0.338	0.667
APH15	0	0	0	0	0	0
APH18	0	0.009	0	0	0	0.006
APL02	0	0	0	0	0	0
APL11	0	0.018	0	0	0	0.011
APT004	0.181	0.235	0.516	0.501	0.301	0.357
APT21	0.639	0.69	0.496	0.57	0.586	0.67
APT25	0.738	0.819	0.742	0.688	0.739	0.804
APT29	0.523	0.578	0.635	0.709	0.564	0.649
AY295	0.688	0.87	0.605	0.71	0.657	0.832
CAUD001	0.23	0.243	0.391	0.384	0.289	0.303
CAUD004	0	0	0	0	0	0
CAUD22	0.531	0.613	0.448	0.569	0.502	0.669
CAUD26	0.117	0.128	0.171	0.186	0.136	0.15
CMO211	0.064	0.601	0	0	0.043	0.529
PROMEDIO	0.259	0.373	0.272	0.315	0.263	0.380

$H_o$ = Heterocigosidad observada,  $H_e$ = Heterocigosidad esperada,

Se realizó un segundo análisis de la heterocigosidad retirando los loci poco informativos ( $PIC < 0.25$ ) APH01, APH15, APH18, APL02, APL11, CAUD004 y CAUD26. De esta manera se obtiene una  $H_e$  promedio de 0.601 en la población total, mientras que en la población de SM y Lam la  $H_e$  promedio es de 0.591 y 0.491 respectivamente. Al igual que el caso anterior, tanto la población de SM como Lam, presentan una  $H_e$  que supera a la  $H_o$  en cada locus analizado (Tabla 8).

**Tabla 8:** Estimación de la heterocigosidad (Nei 1984), calculada para las poblaciones de SM y Lam, utilizando 11 loci.

Locus	SM		Lam		TOTAL	
	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$
APH07	0.571	0.67	0.452	0.561	0.528	0.662
APH09	0	0.552	0	0.046	0	0.474
APH13	0.317	0.635	0.375	0.667	0.338	0.667
APT004	0.181	0.235	0.516	0.501	0.301	0.357
APT21	0.639	0.69	0.496	0.57	0.586	0.67
APT25	0.738	0.819	0.742	0.688	0.739	0.804
APT29	0.523	0.578	0.635	0.709	0.564	0.649
AY295	0.688	0.87	0.605	0.71	0.657	0.832
CAUD001	0.23	0.243	0.391	0.384	0.289	0.303
CAUD22	0.531	0.613	0.448	0.569	0.502	0.669
CMO211	0.064	0.601	0	0	0.043	0.529
PROMEDIO	0.4075	0.5915	0.4236	0.4915	0.4134	0.6015

$H_o$ = Heterocigosidad observada,  $H_e$ = Heterocigosidad esperada

Por otro lado, el análisis de heterocigosidad entre las Estaciones Experimentales Agrarias (EEA VF y EEA EP) y sus alrededores (Lam alr y SM alr) mostró que son estas últimas quienes poseen ligeramente mayor diversidad genética (Tabla 9)

**Tabla 9:** Comparación de los valores de heterocigosidad (Nei 1984), entre la EEA EP y SM alr, y entre EEA VF y Lam alr, utilizando 18 y 11 loci.

	SM		Lam	
	EEA EP	SM alr	EEA VF	Lam alr
18 LOCI	0.318	0.381	0.302	0.315
11 LOCI	0.511	0.598	0.485	0.476

### 6.2.5. Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)

En la población total solo el locus CAUD 26 ( $p=0.148$ ) mostró equilibrio H-W, mientras que del resto, solo los loci APT21 y APT29 mostraron valores no significativos bajo la corrección de Bonferroni (Tabla 10).

Por otro lado, el análisis por departamento reveló que la población de SM posee 5 loci (APH01, APT21, APT29, CAUD001 y CAUD26) sin desviación del EHW, mientras que población de Lam posee 6 loci (APT21, APT29, AY295, CAUD22, CAUD26). Aplicando la corrección de Bonferroni, el locus APH07 muestra un valor de desviación no significativo.

Así mismo, cabe resaltar que los loci APH15, APH18, APL02, APL11, CAUD004 y CMO211 no mostraron resultados por ser monomórficos.

**Tabla 10:** EHW evaluado mediante la prueba exacta para cada locus en las poblaciones de SM y Lam, asumiendo la hipótesis nula de que existe equilibrio.

LOCUS	SM	Lam	TOTAL
	P-value	P-value	P-value
APH01	1	0	0
APH07	0	0.003	0
APH09	0	0	0
APH13	0	0	0
APH15	-	-	-
APH18	0	-	0
APL02	-	-	-
APL11	0	-	0
APT004	0	0.404	0
APT21	0.312	0.095	0.012
APT25	0.002	0	0
APT29	0.177	0.457	0.032
AY295	0	0.054	0
CAUD001	0.097	0	0.001
CAUD004	-	-	-
CAUD22	0	0.105	0
CAUD26	0.231	0.254	0.148
CMO211	0	-	0

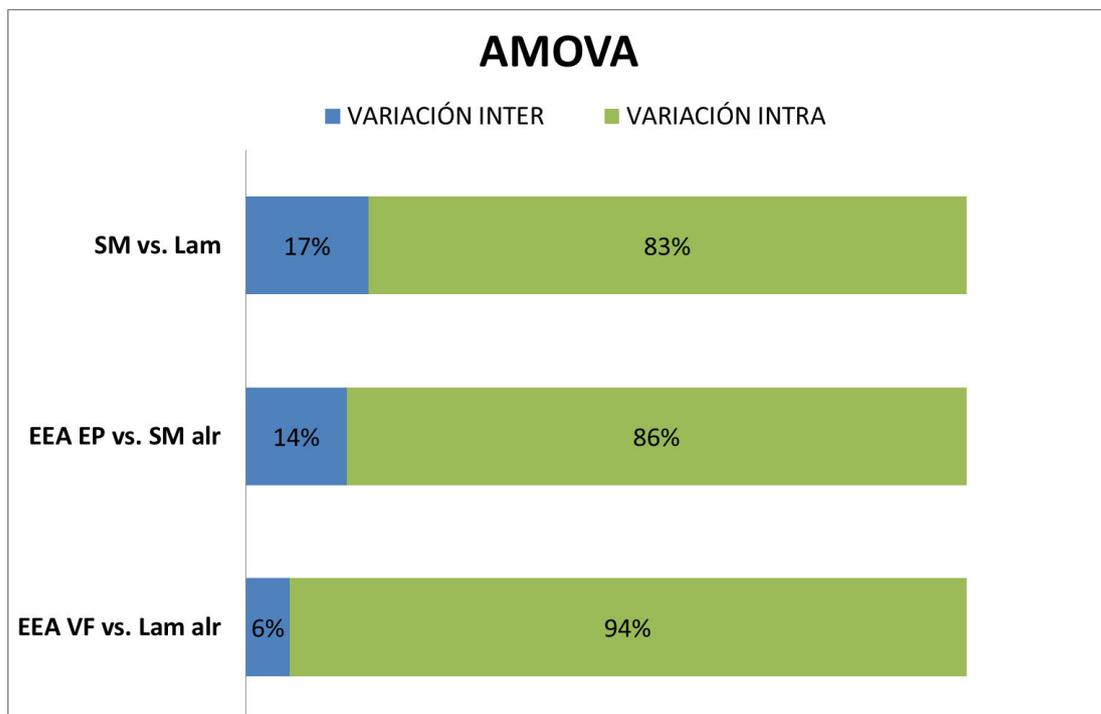
*ns=no significativo, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$*

*Corrección de Bonferroni  $p<0.003$  ( $p= 0.05/k=18$ ,  $k$  número de locus)*

### 6.3. Análisis de la estructura poblacional

#### 6.3.1. AMOVA y Estadísticos F y R

En la prueba de AMOVA se obtuvo que la variación genética a nivel poblacional es elevada dentro de cada una de estas (83%) mientras que entre poblaciones es baja (17%). Así mismo, tanto en la población de SM como en la población de Lam se observó que había mayor variación genética dentro de sus subpoblaciones (EEA EP y SM 86%, EEA VF y Lam alr 94%) que entre ellas (14% y 6% respectivamente) (Figura 13). Mediante el AMOVA también se obtuvo los estadísticos  $F_{ST}$  (bajo el modelo clásico de Varianza al Azar) y su análogo el estadístico  $R_{ST}$  (bajo el Stepwise Mutation Model). El valor de  $F_{ST}$  fue moderado (0.115) mientras que el valor de  $R_{ST}$  fue muy bajo (0.011) y ambos resultados fueron significativos con un grado de confianza de 0.001 (Tabla 11).



**Figura 13.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para la población de SM y Lam.

**Tabla 11.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y Estadísticos  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ .

FUENTE DE VARIANZA	d.f.	SSD	COMPONENTES DE VARIANZA	VARIANZA ESTIMADA	% DE VARIANZA	$F_{ST}$	$R_{ST}$
Varianza entre las poblaciones SM y Lam	1	294.18	294.183	1.747	17%	0.1151	0.0114
Varianza dentro de las poblaciones SM y Lam	350	3045.86	8.702	8.702	83%		
Varianza entre las subpoblaciones de SM	1	158.61	158.618	1.356	14%	0.0932	0.0158
Varianza dentro de las subpoblaciones de SM	221	1892.21	8.562	8.562	86%		
Varianza entre las subpoblaciones de Lam	1	37.51	37.513	0.463	6%	0.0358	0.0001
Varianza dentro de las subpoblaciones de Lam	127	1001.21	7.884	7.884	94%		

*d.f.= degree of freedom, SSD= sum of squares,  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  con  $P$ -value = 0.001*

El análisis del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) mostró valores altos y positivos. En la población de SM se presentó solo 1 loci con exceso de heterocigotos (APH01) mientras que en la población de Lam fueron 3 (APT004, APT25 y CAUD004). Para el total de la población el  $F_{IS}$  fue 0.308 lo que indica la presencia de endogamia en la población. Para la EEA EP, SM alr y Lam alr los coeficientes de endogamia fueron muy parecidos: 0.229, 0.295 y 0.221 respectivamente. Solo la EEA VF mostró valores más cercanos a cero (0.027) (Tabla 12).

**Tabla 12:** Estimación del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) total, por departamento y por EEA.

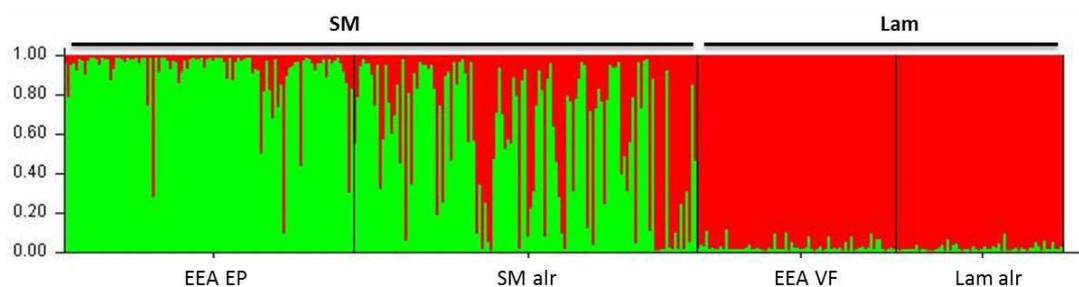
<b>LOCUS</b>	<b>SM</b>	<b>Lam</b>	<b>TOTAL</b>
APH01	-0.017	0.177	0.071
APH07	0.149	0.194	0.203
APH09	1	1	1
APH13	0.502	0.439	0.493
APH15			
APH18	1		1
APL02			
APL11	1		1
APT004	0.229	-0.031	0.155
APT21	0.075	0.131	0.126
APT25	0.1	-0.079	0.919
APT29	0.096	0.105	0.132
AY295	0.209	0.149	0.211
CAUD001	0.055	-0.016	0.046
CAUD004			
CAUD22	0.135	0.214	0.251
CAUD26	0.092	0.085	0.09
CMO211	0.894		0.919
<b>PROMEDIO <math>F_{IS}</math></b>	<b>0.308</b>	<b>0.137</b>	<b>0.308</b>
$F_{IS}$ EEA EP			0.229
$F_{IS}$ SM alr			0.295
$F_{IS}$ EEA VF			0.027
$F_{IS}$ Lam alr			0.221
<b>PROMEDIO <math>F_{IT}</math></b>			<b>0.377</b>

### 6.3.2. Análisis de asignación a grupos por probabilidades bayesianas

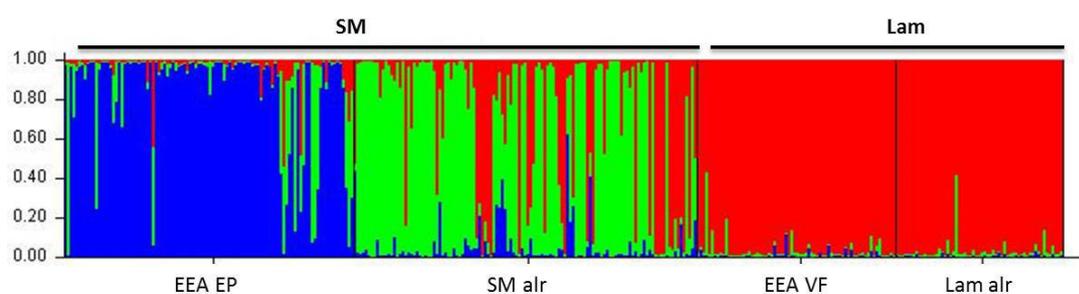
En el análisis con el programa STRUCTURE, el número de poblaciones asumidas ( $K$ ) varió de 1 a 7. Cuando  $K=2$  se formaron dos grupos principales conformados por la población de Lam y SM; aunque en este último grupo, específicamente en SM alr, presentaba algunos individuos mezclados. Cuando  $K=3$  se formaron dos grupos principales, la población de Lam y EEA EP, y un tercer grupo no uniforme conformado por SM alr. Cuando el  $K=4$  o más, no se observa agrupamientos lógicos (Figura 14).

En el análisis con STRUCTURE HARVESTER, los datos y gráficos generados indicaron que el mejor valor para K es igual a dos (Figura 15, Tabla 13).

### K=2



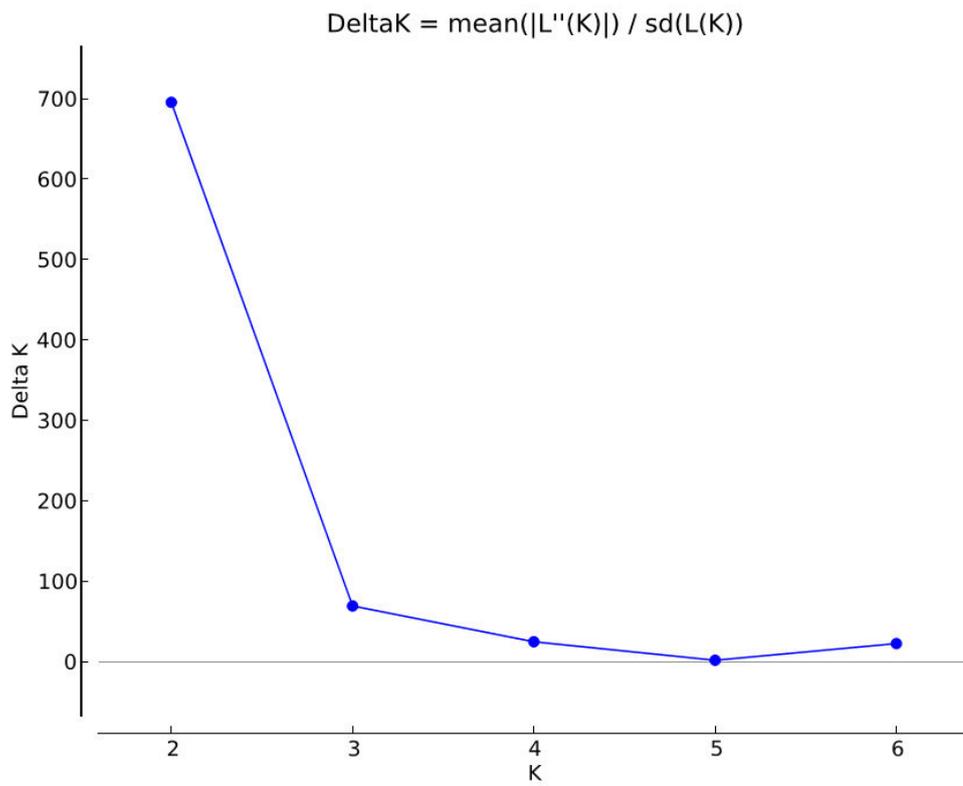
### K=3



**Figura 14:** Análisis de estructuración: A) Prueba asumiendo K=2 y B) Prueba asumiendo K=3.

**Tabla 13:** Data de STRUCTURE HARVESTER resaltando el mejor valor para K.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	6	-9715.983	0.075	—	—	—
2	6	-8706.700	0.822	1009.283	571.967	695.661
3	6	-8269.383	3.530	437.317	244.800	69.346
4	6	-8076.867	3.167	192.517	78.650	24.833
5	6	-7963.000	7.683	113.867	14.050	1.829
6	6	-7863.183	13.647	99.817	307.883	22.560
7	6	-8071.250	838.530	-208.067	—	—



**Figura 15:** Gráfico de la prueba STRUCTURE HARVESTER, donde el parámetro Delta K muestra el mejor valor para K.

## 7. DISCUSIÓN

La investigación sobre la diversidad genética contenida en las poblaciones de SM y Lam conllevó una serie de dificultades, ya que no existen protocolos ni cebadores específicos para la especie *C. moschata*, por lo que se recurrió a transferir información de su pariente *A. platyrhynchos*.

Las EEAs del INIA, debido a su gran interés, facilitaron la obtención de un tamaño de muestra grande (352 individuos). Se sabe que para estudios básicos de diversidad genética se requiere un mínimo de 30 individuos por población (Hale et al. 2012) y en nuestro caso, el mayor tamaño muestral obtenido nos permitió detectar de manera más certera la diversidad genética, alelos únicos y especialmente en que magnitud las EEAs del INIA representan la variabilidad genética de los patos criollos de cada departamento evaluado.

Cabe resaltar que en cada uno de los departamentos visitados se encontraron diferentes escenarios con respecto a la crianza de los patos criollos. En el departamento de Lambayeque, la EEA VF contaba ya con grupos reproductores seleccionados por características deseadas y cada generación provenía de cruces específicos, mientras que en Lam alr la crianza de patos era menos organizada, pero trabajaban en el mejoramiento de sus poblaciones. Por otro lado, en el departamento de San Martín, la EEA EP posee una población de patos criollos que se encuentra iniciando un manejo organizado de estos; sin embargo, un caso muy diferente se encuentra en SM alr donde las poblaciones no cuentan con una crianza controlada y el apareamiento es aleatorio con altas probabilidades de endogamia. Se considera que la situación de crianza en cada departamento es importante para poder analizar los resultados de diversidad genética y especialmente para poder tomar acciones en el mejoramiento y conservación de esta especie doméstica.

### **7.1. Extracción de DNA a partir de plumas**

El pato criollo, es un ave de crianza familiar, del cual las EEAs del INIA buscan formar bancos de germoplasma. Por tal motivo, se requería estudiar a los patos vivos causando el menor estrés posible. Recientes publicaciones han resaltado la utilidad de las plumas como fuente de DNA para estudios con marcadores moleculares (Smith et al. 2003). Con este método no invasivo se llega a obtener cantidades importantes de DNA siendo particularmente un muestreo bastante fácil y rápido que reduce el estrés en las aves durante la captura. Este método fue comparado con el tradicional muestreo de sangre, el cual proporciona una gran cantidad de DNA pero no resulta ser muy práctico en el momento de la colecta (Morin et al. 1994, Bello et al. 2001, Harvey et al. 2006). Estos factores fueron decisivos para optar por la colecta de plumas como método de muestreo. Así mismo, de acuerdo con De Volo et al. (2008), cuanto más grande es la pluma mayor cantidad de DNA se obtendrá; sin embargo, ya que para el presente trabajo se buscaba evitar el estrés en las aves, se terminó por escoger plumas de tamaño intermedio, como las cobertoras secundarias (Taberlet 1991). Este tipo de pluma, brindó suficiente cantidad de DNA para trabajar con microsatélites y además aquellas plumas que se encontraban en estado de muda o que al arrancar salieron con rastros de sangre, contuvo mayor cantidad de DNA que el resto ya que al encontrarse en formación presentan proliferación de células en el cálamo de las plumas (Harvey et al. 2006, De Volo et al. 2008).

### **7.2. Transferibilidad de microsatélites**

Para el análisis de variabilidad genética con microsatélites, y debido a la ausencia de SSRs específicos para *C. moschata*, se optó por la transferibilidad de SSRs de *A. platyrhynchos* al pato criollo; donde, de los 24 loci escogidos, solo 18 resultaron exitosos ante las pruebas de amplificación. Dichas pruebas incluyeron variaciones a nivel de concentración de DNA, de cebadores, MgCl<sub>2</sub> y temperatura de hibridación.

Seis loci no pudieron ser amplificados, posiblemente a causa de las mutaciones adquiridas que transformaron las regiones flanqueantes a los microsatélites de *C. moschata* respecto a las de *A. platyrhynchos* (Barbará et al. 2007, Bech et al. 2010). Esta sospecha se puede corroborar a través de la filogenia de la familia Anatidae donde se ve que *C. moschata* pertenece a la tribu Cairinini mientras que *A. platyrhynchos* a la tribu Anatini, es decir, existe cierta distancia filogenética entre las especies que evita el éxito completo de la transferibilidad de SSRs (Donne-Goussé et al. 2002). Por tal motivo, el análisis de variabilidad genética se realizó con los 18 marcadores exitosamente transferidos. Así mismo, estos loci mostraron diferentes parámetros de amplificación, por lo que se le tuvo que separar en cuatro grupos de amplificación bajo dos protocolos de PCR. Los grupos de amplificación fueron asignados según el rango del peso molecular del microsatélite, ya que lo que se quiere evitar en un PCR multiplex es el solapamiento de alelos provenientes de diferentes microsatélites, y a cada grupo se le designó un fluoróforo (6-FAM, NED, VIC y PET). De igual forma, cada grupo presentó parámetros y temperaturas específicas para la hibridación. Los grupos 6-FAM y NED emplearon un mismo protocolo de amplificación (P1), con la excepción de la temperatura de hibridación, que fueron 59 °C y 53 °C respectivamente. El grupo NED fue quien tuvo la temperatura de hibridación más baja ya que dentro de este grupo se encontraba el cebador CAUD22, que requería bajas temperaturas de hibridación, 50 °C – 53 °C (Huang et al. 2005); sin embargo, finalmente se escogió la temperatura de 53 °C ya que producía menos ruido en los electroferogramas. Los grupos VIC y PET también presentaron un protocolo de amplificación parecido al mencionado anteriormente, con la diferencia de la temperatura de hibridación que fue de 57 °C, para ambos grupos. Además presentó 10 ciclos adicionales, con temperatura de hibridación de 53 °C para la hibridación específica de la cola M13 (Schuelke 2000). De esta forma se logró optimizar la amplificación de los segmentos fluoromarcados y la reducción en la amplificación de inespecíficos.

### 7.3. Parámetros indicativos de variabilidad genética

Los 18 loci reportados en este trabajo presentan un número alélico que varía entre 1 hasta un máximo de 34, en comparación con los estudios de *A. platyrhynchos* donde estos mismos loci presentaban un rango de alelos entre 3 a 17 (Maak et al. 2003, Baratti et al. 2009). A pesar de que originalmente todos los loci eran muy polimórficos, al realizar la transferibilidad de marcadores microsatélite a *C. moschata*, se obtuvo a nivel de toda la población que 3 loci se transformaron en monomórficos: APH15, APL02 y CAUD004. En la población de SM los loci monomórficos fueron 4: APH15, APH18, APL02 y CAUD004. Mientras que en la población de Lam se presentaron hasta seis loci monomórficos: APH15, APH18, APL02, APL11, CAUD004 y CMO211. Así mismo, el loci con mayor número de alelos en la población total fue AY295 presentando hasta 34 alelos. Esta cantidad supera a la cantidad de alelos reportados en *A. platyrhynchos*, 17.alelos (Su et al. 2007). El número de alelos, para AY295, en la población de SM y Lam fueron 34 y 18 respectivamente, notándose así la tendencia de que la población de SM (n=223) supera a la población de Lam (n=129) en diversidad alélica (promedio = 6.1 y 3.9 respectivamente), aunque esto esté relativamente asociado al tamaño de muestra. Esta tendencia se visualiza en algunos otros marcadores y probablemente se deba a la alta tasa de mutación de los microsatélites (Oliveira et al. 2006) así como a las poblaciones estudiadas.

Ambas poblaciones presentaron alelos en común (63), pero los alelos exclusivos fueron 47 para la población de SM y 8 para la población de Lam, lo que demuestra una vez más que la población de SM tendría mayor diversidad alélica que Lam. Así mismo, muchos de estos alelos exclusivos se caracterizaron por tener frecuencias bajas. Según Hale et al. (2012) los AR (frecuencia < 0.05) son comunes de encontrar en estudios con microsatélites; pero, los AmR (frecuencia < 0.01) casi no brindan información útil para la mayoría de los análisis poblacionales, ya que su presencia puede deberse meramente a mutaciones recurrentes y no a factores históricos o flujo

génico. En este contexto, la población de SM presentó 18 AR y 44 AmR mientras que la población de Lam presentó 15 AR y 17 AmR. Cabe resaltar que la condición de estos alelos se debe principalmente a la alta tasa de mutación de los microsatélites, la cual es responsable del cambio en el número, frecuencia y hasta en la aparición de nuevos alelos; y que es característico en varios de los alelos exclusivos encontrados en ambas poblaciones. Si bien muchos de estos alelos poco frecuentes y/o exclusivos no son útiles para los análisis poblacionales ( $H_e$  y  $F_{ST}$ ), si pueden llegar a ser útiles en los programas de mejoramiento y conservación de los patos criollos, que a su vez es parte de los objetivos del presente trabajo.

La presencia de alelos nulos fue significativa, encontrándose en 12 loci de los 18 analizados: APH07, APH09, APH13, APH18, APL11, APT004, APT21, APT25, APT29, AY295, CAUD22 y CMO211. Mediante el programa Microchecker (Van Oosterhout et al. 2004) y bajo el análisis de cuatro métodos, la mayoría de las frecuencias de alelos nulos superaba el valor 0.1 ( $f_{null} > 0.1$ ). La causa de los alelos nulos puede estar asociada a la mutación de las regiones flanqueantes de los microsatélites, lo que estaría causando la no amplificación de algunos alelos; es decir, incremento de falsa homocigosidad (Chapuis y Estoup 2006). Una forma de determinar con exactitud si un alelo es realmente homocigoto o no, es secuenciando la región entera del microsatélite (Carlsson 2008); sin embargo, ya que se trata de un procedimiento que requiere mayor inversión en tiempo y recursos, no se llegó a realizar en este trabajo. Entonces, la presencia de alelos nulos en la mayoría de los loci estaría indicando un falso exceso de homocigosidad a nivel poblacional, además de causar una pequeña pero significativa sobreestimación del  $F_{ST}$  (Chapuis y Estoup 2006, Carlsson 2008), por lo cual se debe tener cautela a la hora de interpretar la diversidad genética y la estructuración genética de las poblaciones muestreadas.

El PIC es un buen índice de evaluación del polimorfismo del marcador microsatélite. Según Botstein et al. (1980) cuando  $PIC > 0.5$ , el locus tiene alta diversidad; cuando el

PIC se encuentre entre 0.5 y 0.25, el locus tiene una diversidad intermedia; y cuando el  $PIC < 0.25$ , el locus tiene baja diversidad. De los 18 marcadores microsatélites analizados, 7 resultaron tener alta diversidad (APH07, APH13, APT21, APT25, APT29, AY295 y CAUD22), mientras que 4 resultaron tener diversidad intermedia (APH09, APT004, CAUD001 y CMO211), lo cual nos indica que 11 de los loci analizados serán útiles para los análisis de diversidad genética. Por otro lado, los 7 loci con baja diversidad fueron APH01, APH11, APH18 y CAUD26 ( $PIC < 0.25$ ) además de los loci monomórficos APH15, APL02 y CAUD004 ( $PIC = 0$ ). Estos últimos, al no ser informativos, no aportarán al análisis de la diversidad genética poblacional, por lo que a su vez, el análisis de la heterocigosidad contando solo con los 11 loci polimórficos puede dar una mejor versión de la real diversidad genética de las poblaciones estudiadas.

Con respecto a los niveles de heterocigosidad de la población total, la  $H_o$  varió de 0 (locus monomórficos APH15, APL02 y CAUD004) hasta 0.739 (APT25), mientras que la  $H_e$  de 0, también debido a los loci monomórficos, hasta 0.832 (AY295). Así mismo, en este trabajo la  $H_o$  promedio fue menor que la  $H_e$  promedio siendo 0.263 y 0.380 respectivamente. Cuando se encuentra esta situación, se sospecha que el exceso de homocigosidad sea a causa de la endogamia en la población (Toro et al. 2011).

Se observó además que la heterocigosidad total ( $H_{e\text{ TOTAL}} = 0.380$ ) resultó estar por debajo de los valores encontrados para poblaciones de *C. moschata* fuera de Perú. Se puede citar a: 1) Stai y Hughes (2003) ( $H_e = 0.901$ ), cuyas poblaciones silvestres brasileras mostraron alta heterocigosidad, lo cual era de esperarse para poblaciones silvestres, y 2) Maak et al. (2003) ( $H_e = 0.569$ ) y Khan (2007) ( $H_e = 0.410$ ), con poblaciones de patos criollos domésticos alemanes e iraníes respectivamente; los cuales mostraron una heterocigosidad moderada, como era de esperarse debido al proceso de domesticación. Un estudio realizado en Perú por Conto (2014) ( $H_e = 0.438$ ),

encontró diversidad baja a moderada en poblaciones domésticas peruanas, valores muy parecidos a los del presente trabajo.

Así mismo, también podemos tomar como referencia algunos estudios del pato Pekín doméstico de china, *A. platyrhynchos*, que presenta valores de heterocigosidad de  $H_e=0.660$  (Su et al., 2007),  $H_e=0.604$  (Wu et al., 2009) y  $H_e=0.695$  (Su y Chen, 2009). Dichos valores de heterocigosidad respecto a los encontrados en el presente trabajo, estarían reafirmando que las poblaciones peruanas de patos criollos cuentan con una diversidad genética baja a moderada.

Por otro lado, se encontró diferencia de la  $H_e$  promedio entre las poblaciones de SM y Lam siendo estas 0.373 y 0.315 respectivamente. En este escenario, la población de SM resulta tener una diversidad genética ligeramente mayor que Lam, tendencia que ya se veía desde el análisis de la diversidad alélica. Sin embargo, a pesar de esta diferencia entre las poblaciones, ambas poseen valores que están por debajo de los valores de  $H_e$  reportados para *C. moschata* doméstica y silvestre (Maak et al. 2003, Stai y Hughes 2003). Por ejemplo, Khan (2007) considera  $H_e=0.44$  como una heterocigosidad moderada, por tanto los niveles inferiores encontrados por este estudio para las poblaciones peruanas estaría indicando una baja heterocigosidad, indicios que Conto (2014) ya había reportado estudiando al pato criollo peruano a partir de muestras de músculo e hígado de los mercados de los departamentos de Lambayeque y Piura.

No obstante, la fuerte presencia de alelos nulos así como los marcadores de bajo PIC deben estar jugando un papel importante en la subestimación de la diversidad genética de estas poblaciones. Por lo que una alternativa para tratar de acercarnos a la verdadera diversidad genética de estas poblaciones podría ser el análisis de solo los 11 loci más polimórficos ( $PIC>0.25$ ). En este nuevo escenario, la  $H_e$  promedio de la población total fue de 0.602 mientras que en la población de SM y Lam fue 0.592 y

0.492 respectivamente. Estos resultados indicarían una heterocigosidad moderada para las poblaciones peruanas del pato criollo, tomando como referencia a Khan (2007), lo cual correspondería mejor con el hecho histórico de que Perú es el país de origen de esta especie.

Otro de los objetivos del presente trabajo es determinar la representatividad a nivel de variabilidad genética de las poblaciones de patos criollos de las EEAs (INIA) respecto a la población SM alr y Lam alr. El análisis de  $H_e$ , mostró que la diversidad genética de SM alr ( $H_e_{EEA EP}= 0.318$ ,  $H_e_{SM alr}=0.381$ ) y Lam alr ( $H_e_{EEA VF}=0.302$ ,  $H_e_{Lam alr}=0.315$ ) es ligeramente mayor a la diversidad genética de sus respectivas EEAs. Esta pérdida de diversidad estaría siendo provocada, a su vez, por la constante selección artificial a la que es sometida esta especie doméstica (FAO 2007). Sumado a esto, se podría decir que debido al desconocimiento de la condición genética del pato criollo; no se han llevado a cabo programas de cruzamiento adecuados, que permitan a las EEAs y a las familias poder mejorar las características de estos animales sin provocar en la población erosión genética de los mismos (Boettcher et al. 2010). El análisis de  $H_e$  con 11 loci, mostró los mismos patrones de diversidad que los indicados anteriormente, y ya que la  $H_e$  de las EEAs y los alrededores son cercanas se podría decir que las EEAs tendrían una representación significativa de la variabilidad genética de las poblaciones de patos criollos en cada departamento.

La aplicación de la prueba de EHW mostró que el 66.6% de los loci evaluados mostraron estar en desequilibrio considerando un  $P\text{-value}<0.05$ , e incluyendo la corrección de Bonferroni ( $P\text{-value}<0.003$ ). Factores como una alta presión selectiva (búsqueda de mejora de las características del pato criollo) y la endogamia (cruzamientos de 1 macho con 6 a más hembras) pueden estar provocando el incumplimiento de los supuestos del EHW en la población total (Frankham et al. 2002, Allendorf y Luikart 2007). A su vez, estos resultados se correlacionan con los datos ya obtenidos de alelos nulos (alta presencia) y heterocigosidad.

El pato criollo es un recurso genético importante de origen peruano; sin embargo, en la actualidad muestra una tendencia a la pérdida de su variabilidad genética, probablemente a causa de algunos factores ya mencionados, como el inadecuado manejo reproductivo. Este caso se puede comparar con el del pato doméstico Pekín *A. platyrhynchos*, el cual puede ser considerado un precedente de cómo las especies domésticas caen en un proceso de pérdida de variabilidad genética. Por ejemplo, Maak et al. (2003) reporta uno de los valores más bajos de diversidad genética para el pato Pekín ( $H_e=0.310$ ), valor que no se encuentra muy lejos de los reportados para el pato criollo en esta investigación. Por tal motivo, con el presente trabajo se espera resaltar la importancia de mantener la variabilidad genética del pato criollo.

#### **7.4. Análisis de estructura poblacional**

La prueba de AMOVA mostró una moderada diferenciación genética entre las poblaciones de SM y Lam (17%), y una diferenciación genética menor entre las subpoblaciones contenidas en ellas (EEA EP vs. SM  $alr=14\%$  y EEA VF vs. Lam  $alr=6\%$ ). Los resultados concuerdan con el moderado y significativo valor de  $F_{ST}$  (0.1151) a nivel poblacional. Estos resultados muestran una diferenciación genética moderada entre las poblaciones, que es de esperarse debido a la separación geográfica entre ambas poblaciones; sin embargo, no es muy alta, probablemente debido a que el hombre por medio de la selección artificial colabora en el flujo génico de este recurso (Meirmans 2012). Así mismo, el estadístico  $R_{ST}$  (0.011) mostró un valor que se aproxima mucho al cero (panmixia) indicando poca diferenciación genética entre las poblaciones. En este estudio, el estadístico  $R_{ST}$  se usa con la finalidad de reforzar o refutar el valor del  $F_{ST}$ , debido a su capacidad de rechazar la alta y compleja tasa de mutación que caracteriza a los microsatélites y por tanto evitar la sobreestimación del grado de diferenciación genética por homoplasia (Balloux y Lugon 2002, Estoup et al. 2002, Hardy et al. 2003).

La diferenciación genética entre las poblaciones resultó ser moderada a baja, a pesar de la gran separación entre el departamento de Lambayeque (Costa) y San Martín (Selva). Esto es debido a la facilidad con que el hombre puede transportar al pato criollo. Un ejemplo de esto se refleja en el trabajo de Conto (2014), donde las poblaciones de patos criollos analizados (mercados de Lambayeque - Piura) mostraron valores de  $F_{ST}$  de 0.008. En ambos casos, a pesar de que los valores  $F_{ST}$  o  $R_{ST}$  sean bajos, se debe resaltar la presencia de al menos una diferenciación genética baja o estructuración débil. En primer lugar, porque no existen casos reales en que el índice de fijación llegue a los extremos 0 y 1 (Balloux y Lugon 2002); y en segundo lugar, porque la presencia de al menos esta diferenciación genética baja será importante para el mejoramiento reproductivo de esta especie y su conservación.

Para complementar el análisis de estructuración genética entre las poblaciones, se realizó un análisis con el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000, Pritchard et al. 2010). Los supuestos clusters (K) variaron de 1 a 7; sin embargo, fue el K=2 quien demostró tener mayor concordancia con los análisis ya mencionados de AMOVA y  $F_{ST}$ . Una vez más, la obtención de dos grupos es coherente con lo observado en el campo: considerable separación geográfica entre los departamentos evaluados, y una marcada diferencia en la forma de crianza en cada grupo de los patos criollos. Dichos factores probablemente han ido marcando una leve, pero importante, diferenciación genética en las poblaciones. De igual forma, mediante el método de Evanno se corroboraron todos los valores de probabilidad obtenidos en la prueba de estructuración (K=2 a 7), siendo K=2 el número ideal de poblaciones.

Por tanto, las poblaciones de SM y Lam tendrían una baja diferenciación genética entre ellas, lo cual vendría ser una buena señal de que se está conservando lo que queda del acervo genético de las poblaciones del pato criollo. Con un buen programa de manejo, que incluya el flujo génico controlado, se podría conservar y mejorar la variabilidad genética de las poblaciones de patos criollos.

A pesar de esto, la baja heterocigosidad observada tiene una de sus causas en el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) alto y positivo (0.308) que se corrobora con la falta de EHW y que indica un moderado grado de endogamia en la población total. Esto tiene mucha relación con la forma de crianza, la cual es de tipo familiar y no suele estar preocupada por la introducción constante de machos reproductores. Por el contrario, este macho se aparea con varias generaciones de su descendencia provocando que cada vez más estas sean muy parecidas genéticamente entre ellas. Esta situación pone en riesgo a las poblaciones futuras de patos criollos y a su vez la seguridad alimentaria de muchas zonas del Perú.

Estos niveles de endogamia son moderados y muy parecidos en la EEA EP (0.229), SM alr (0.295) y Lam alr (0.221), mientras que en la EEA VF – Lambayeque (0.027) es reducida. El resultado en la EEA VF es debido a que existe un programa de manejo del pato criollo, con la finalidad de obtener mejores características (como tiempo de madurez, peso, número de huevos, etc.) sin perder la variabilidad genética.

Los resultados de esta investigación se convierten en una herramienta útil para el desarrollo sostenible del pato criollo, en nuestro país y el mundo. Si bien Conto (2014) ya mostraba indicios de que las poblaciones peruanas de patos criollos presentaban baja variabilidad genética, estudiando las muestras que llegaban a los importantes mercados del norte del Perú, esta investigación evidencia la tendencia a la reducción de la variabilidad genética del pato criollo, estudiando en tiempo real los patos criados en los departamentos de Lambayeque y San Martín. Particularmente, el INIA, como institución competente del desarrollo agrario, junto a sus EEAs serán los encargados de crear programas reproductivos adecuados, los que a su vez permitirán a las familias más humildes beneficiarse del mejoramiento de las características del pato criollo, sin dejar de lado la importante labor de su conservación.

## 8. CONCLUSIONES

- Los loci APH07, APH09, APH13, APT004, APT21, APT25, APT29, AY295, CAUD001, CAUD022 y CMO211 mostraron alto contenido de información polimórfica por lo que son considerados útiles para estudios de diversidad genética.
- La población total de patos criollos exhibió una moderada-baja diversidad genética, siendo esta más alta en la población de San Martín.
- La Estación Experimental Agraria Vista Florida fue la que mostró los más bajos grados de endogamia, debido a un adecuado manejo reproductivo.
- La estructuración genética entre las poblaciones de SM y Lam es moderada-baja lo que evidencia la presencia de flujo génico entre ellas.

## 9. RECOMENDACIONES

Es necesario evaluar otras poblaciones domésticas de *C. moschata* para determinar en qué situación se encuentran a nivel de diversidad genética. Los estudios en poblaciones silvestres podrían ser útiles desde el punto de vista de reintroducción de diversidad genética en las poblaciones domésticas.

Emplear con cautela el método de transferibilidad de marcadores microsatélite, ya que cuanto más lejanas sean las especies involucradas menor éxito tendrá la transferencia. Otras alternativas, como el RADSeq, pueden ser usadas para estudios poblacionales.

Los resultados obtenidos deben ser utilizados para tomar acciones en el manejo reproductivo del pato criollo y evitar la creciente pérdida de variabilidad genética.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allendorf F.W. & G.H. Luikart. 2007. Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell. 664 pp.
- Angulo E.G. 1998. Interpretación biológica acerca de la domesticación del pato criollo (*Cairina moschata*). Bulletin de l'Institut français d'études andines 27(1): 17–40.
- Aranguren J.A., R. Bravo, W. Isea, et al. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 13(1): 30–42.
- Avilez J.P. & M.F. Camiruaga. 2011. Manual de Crianza de Patos. Chile: Editorial UC TEMUCO.
- Avise J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York: Chapman & Hall.
- Bacher, J.W., L.F. Hennes, W. Gu, et al. 1999. Pentanucleotide repeats: highly polymorphic genetic markers displaying minimal stutter artifact. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega Corporation. Pp. 24–37.
- Ballabio A., J.E. Ranier, J.S. Chamberlain, et al. 1990. Screening for steroid sulfatase (STS) gene deletions by multiplex DNA amplification. Human Genetics 84(6): 571–573.
- Balloux F. & N. Ligon. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11(2): 155–165.
- Bandelj D., J. Jakse & B. Javornik. 2004. Amplification of fluorescent-labelled microsatellite markers in olives by a novel, economic method. Acta agriculturae Slovenica 37(4): 2031–6.
- Baratti M., M. Cordaro, F. Dessì-Fulgheri, et al. 2009. Molecular and ecological characterization of urban populations of the mallard (*Anas platyrhynchos* L.) in Italy. Italian Journal of Zoology 76(3): 330–339.

- Barbará T., C. Palma-Silva, G.M. Paggi, et al. 2007. Cross-Species Transfer of Nuclear Microsatellite Markers: Potential and Limitations. *Molecular Ecology* 16 (18): 3759–67.
- Bech N., C. Novoa, J.F. Allienne, et al. 2010. Transferability of Microsatellite Markers among Economically and Ecologically Important Galliform Birds. *Genetics and Molecular Research* 9(2): 1121–29.
- Bello N., O. Francino & A. Sánchez. 2001. Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 13(2): 162–164.
- Boettcher P.J., M. Tixier-Boichard, M.A. Toro, et al. 2010. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics* 41(1): 1–14.
- Botstein D., R.L. White, M. Skolnick, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bower B., K. Kodama, B. Swanson, et al. 1998. Introduction to capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*. Pp. 327–334.
- Brack A.J. 2004. (en línea). Biodiversidad y alimentación en el Perú. Seminario del PNUMA en el Perú. Parlamento Latinoamericano. URL: <http://www.parlatino.org>, visitada 20-06-2014
- Bundy E. & R. Diggins 1991. La producción avícola. Prentice - Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. USA.
- Butler J.M. 2005. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2 ed. Chemistry & biodiversity (Vol. 1).
- Carlsson J. 2008. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity* 99(6): 616–623.
- CENAGRO. 2012. (en línea). IV Censo Nacional Agropecuario. URL: <https://www.inei.gob.pe/estadisticas/censos/>. Revisado: abril 2016.
- Coburn J.R, S.V. Temnykh, E.M. Paul, et al. 2002. Design and application of microsatellite marker panels for semiautomated genotyping of rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Science* 42: 2092-2099

- Conto K.G. 2014. Estudio de la diversidad genética del Pato Criollo Doméstico (*Cairina moschata*) en la costa norte peruana utilizando marcadores microsatélites. Tesis para optar el título de licenciada en Biología. Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú. Pp. 1-72.
- Crawford R.D. 1992. Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkeys from the America. *Archivos de Zootecnia* 41: 307–14.
- Chapuis M.P. & A. Estoup. 2006. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621–631.
- Deyl Z., I. Miksik & F. Tagliaro. 1998. Advances in capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92(2-3): 89–124.
- De Volo S.B., R.T. Reynolds, M.R. Douglas, et al. 2008. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. *The Condor* 110(4): 762–766.
- Diwan N., A. Bhagwat, G. Bauchan, et al. 1997 Simple sequence repeat DNA markers in lucerne and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40: 887–895.
- Donkin R. 1989. The Muscovy duck, *Cairina moschata domestica*: origins, dispersal and associated aspects of the geography of domestication. Rotterdam: A.A. Balkema.
- Donne C., V. Laudet & C. Hänni. 2002. A molecular phylogeny of Anseriformes based on mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23(3): 339–356.
- Edwards M. & R. Gibbs. 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research* 3: 65–75.
- Earl D.A. & B.M. VonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359–61.
- Edwards A., H. Hammond, L. Jin, et al. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12(2): 241-253.

- El-Gendy E., M. Helal, N. Goher, et al. 2005. Molecular characterization of genetic biodiversity in ducks, using RAPD-PCR analysis. *Arab Journal of Biotechnology* 8(2): 253-264.
- Eguiarte L.E., E. Aguirre, E. Scheinvar, et al. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones. Universidad Autónoma de México. 30 pp.
- Estoup A., P. Jarne & J. Cornuet. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11(9): 1591–604.
- Evanno G., S. Regnaut & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 :2611–2620.
- FAO. 2007. (en línea). The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome, Italia. URL:<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/a1250e.pdf>, visitado 05-07-2014.
- Fei W., T. Huang, M. Ying, et al. 2009. Evaluation of genetic diversity and relationship within and between two breeds of duck based on microsatellite markers. *Progress in Natural Science* 19: 1581-1586.
- Frankham R., J.D. Ballou & D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cambridge University Press. 594 pp.
- Golstein D., L. Zhivotovsky, K. Nayar, et al. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1213-1218.
- Guo S. & E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Hale M.L., T.M. Burg & T.E. Steeves. 2012. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* 7(9): 45170.
- Hayden M. 2008a. Application of multiplex-ready PCR for fluorescence-based SSR genotyping in barley and wheat. *Molecular Breeding* 21: 271–281.

- Hayden M., T. Nguyen, A. Waterman, et al. 2008b. Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics* 9(1): 80.
- Hartl D. 1981. A primer of population genetics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hartl D. & A. Clark. 1989. Principles of population genetics. 2<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hardy O.J, N. Charbonnel, H. Fréville, et al. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163(4): 1467–82.
- Harvey M.G., D.N. Bonter, L.M. Stenzler, et al. 2006. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology* 77(2): 136–140.
- He D.Q., J. Du, Y.P. Liu, et al. 2008. Analysis on partial mitochondrial DNA D-loop sequences of Muscovy duck (*Cairina moschata*). *Acta Agriculturae Shanghai* 24(4): 1–4 (en Chino).
- Henegariu O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, et al. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Bio Techniques* 504–511.
- Hernández D., D. Muñoz, N. Valencia, et al. 2007. Caracterización Molecular Del Pato Criollo Colombiano En Cuatro Departamentos. *Acta Agronómica (Colombia)* 56 (3): 141–45.
- Hillis D.M. & J.J. Wiens. 2000. Molecules versus morphology in systematics. Phylogenetic analysis of morphological data. Smithsonian Institution Press. Washington.
- Hsiao M.C., H.C. Liu, Y.C. Hsu, et al. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers in Tsaiya duck. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21(5): 624-627.
- Holsinger K.E. 2008. The Hardy-Weinberg Principle and Estimating Allele Frequencies in Populations Derivation of the Hardy-Weinberg Principle. In *Generations Journal of the American Society on Aging* 2: 1–11.

- Huang Y., J. Tu, X. Cheng, et al. 2005. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genetics, Selection, Evolution* 37(5): 455–472.
- Innis M.A. & D.H. Gelfand. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press
- Jin L., Y. Zhong & R. Chakraborty. 1994. The exact numbers of possible microsatellite motifs. *American Journal of Human Genetics* 55: 582–583.
- Kalinowski S.T., M.L. Taper & T.C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology* 16(5): 1099-1106.
- Khan A.A. 2007. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity in Pekin (*Anas Platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina Moschata*) Duck Populations. *International Journal of Poultry Science* 6(5):378–82.
- Kear J. 2005. *Ducks, geese and swans: general chapters, species accounts (Anhima to Salvadorina)*. Oxford University Press. 908 pp.
- Kainz P. 2000. The PCR plateau phase- towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta* 1494: 23-27.
- Kocher T.D., W. Thomas, A. Meyer, et al. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6196-6200
- Konomi N., M. Yamaguchi, H. Naito, et al. 2000. Simultaneous detection of Hepatitis B, C, and G viral genomes by multiplex PCR method. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 53: 70- 72.
- Londoño J.M. 2011. Estructura poblacional y diversidad genética de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes. Tesis. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad Del Quindío. Colombia.
- Maak S., K. Neumann, G. Vonlengerken, et al. 2000. First seven microsatellites developed for the Pekín duck. *Animal Genetics* 31: 233.

- Maak S., K. Wimmers, S. Weigend, et al. 2003. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3(2): 224–227.
- Madge S. & H. Burn. 1988. *Waterfowl: an identification guide to the ducks, geese and swans of the world*. Editorial Boston: Houghton Mifflin.
- Meirmans P.G. 2012. Amova-Based Clustering of Population Genetic Data. *Journal of Heredity*. Pp 1–7.
- Michalakis Y. & L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064
- Morin P.A., J. Messier & D. Woodruff. 1994. DNA extraction, amplification, and direct sequencing from hornbill feathers. *Journal of the Science Society of Thailand* 20: 31-41.
- Mullis K.B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48(8): 579.
- Narvaiza I. 2008. *Aumente la producción del pato real, manual*. FODECI. Puerto Ayacucho. Venezuela. 43 pp.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nei M. & W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Oetting W.S, H.K. Lee, D.J. Flanders, et al. 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed cebador. *Genomics* 30: 450-458.
- Oliveira E.J., J.G. Pádua, M.I. Zucchi, et al. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.

- Peakall R. & P.E. Smouse. 2012. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research and update. *Bioinformatics* 28(19): 2537–39.
- Pérez M. 2010. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. III Simposio Científico En Biología Celular y Molecular. Universidad de Coruña. Pp. 267-276.
- Pierce B. 2009. *Genética: Un enfoque conceptual*. Edición Médica Panamericana. 832 pp.
- Pritchard J.K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard J.K., X. Wen & D. Falush. 2010. *Documentation for Structure Software: Version 2.3*. University of Chicago & University of Oxford.
- Provan J., N. Soranzo, N.J. Wilson, et al. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153: 943-947.
- Ravela P. (en línea). 2004. Primer Informe Nacional Sobre La Situación de Los Recursos Zoogenéticos. FAO- Perú. URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1250f/annexes/CountryReports/Peru.pdf>
- Rodrigues P., T. De Campos, J. Kupper, et al. 2009. Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44(6): 638-644.
- Rousset F. 2008. GENEPOP-007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–6.
- Salem I., M. Aouni, & R. Mzoughi. 2010. Specific detection of *Salmonella sp.* in food by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Advanced Studies in Biology* (2): 73–88.
- Sambrook J., E. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18(2): 233–234.

- Schwengel D.A., A.E. Jedlicka, E.J. Nanthakumar, et al. 1994. Comparison of fluorescence-based semiautomated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. *Genomics* 22: 46-54.
- Shi-Yi C., H. Da-Qian & L. Yi-Ping. 2009. Low genetic variability of domestic Muscovy duck (*Cairina moschata*) in china revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Biochemical Genetics* 47: 734–738.
- Schulenberg T.S., D.F. Stotz & L. Rico. 2006. Distribution maps of the birds of Peru. Environment, Culture & Conservation (ECCo), The Field Museum. URL: [http://fm2.fieldmuseum.org/uw\\_test/birdsofperu/default.asp?page=1](http://fm2.fieldmuseum.org/uw_test/birdsofperu/default.asp?page=1)
- Schulenberg T.S., D.F., Stotz, D. Lane, et al. 2010. *Birds of Perú*. Princeton University Press.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 73-76.
- Slatkin M. 1994. Flujo génico y estructura de las poblaciones. *Ecological Genetics* 34: 1–11.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* 139: 457-462.
- Smith T.B., P.P. Marra, M.S. Webster, et al. 2003. A Call for Feather Sampling. *The Auk* 120(1): 218–221.
- Stahl P., M. Muse & F. Delgado. 2006. New evidence for pre-columbian Muscovy duck *Cairina moschata* from Ecuador. *International Journal of Avian Science* 148: 657–663
- Stahl P. 2008. Animal domestication in South America. *The Handbook of South American Archaeology*. USA: Springer. Pp. 121-130.
- Stai S. & C. Hughes. 2003. Characterization of microsatellite loci *Cairina* in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics* 34(5): 384–386.
- Su Y., R. Long, G. Chen, et al. 2007. Genetic analysis of six endangered local duck populations in china based on microsatellite markers. *Journal of Genetics and Genomics* 34(11): 1010–1018.

- Su Y. & G. Chen. 2009. DNA microsatellite analysis of genetic diversity among chinese indigenous laying-type ducks (*Anas platyrhynchos*). Czech Journal of Animal Science 54(3): 128-135.
- Taberlet P. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. The Auk 959–960.
- Tautz D. y M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 12: 4127–4138
- Thomas W., S. Paabo, F. Villablanca, et al. 1990. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. Molecular Evolution 31: 101-112
- Toro M.A., T.H. Meuwissen, J. Fernandez, et al. 2011. Assessing the genetic diversity in small farm animal populations. Animal 5(11): 1669–83.
- Urquhart A., C. Kimpton, T. Downes, et al. 1994. Variation in short tandem repeat sequences a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. International Journal of Legal Medicine 107: 13–20.
- Van Oosterhout C., W.F. Hutchinson, D.P. Wills, et al. 2004. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4(3): 535–538.
- Vigilant L., R. Pennington, H. Harpending, et al. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 9350-9354.
- Walsh P.S., N.J. Fildes & R. Reynolds. 1996. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleic Acids Research 24: 2807–2812.
- Wang R., L. Zheng, Y. T Toure, et al. 2001. When Genetic Distance Matters : Measuring Genetic Differentiation at Microsatellite Loci in Whole- Genome Scans of Recent and Incipient. Proceedings of the National Academy of Sciences 98 (19): 10769–74.
- Wang J., M. Chu, A. Wang, et al. 2004. Genetic relationships among seven sheep populations using four microsatellite markers. Hereditas 26(5): 637-643.

- Whatley H. 2001. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. From: Book Title; Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis.
- Weber L. & C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.
- Weir B. & C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wiessenbach J. & G. Dib. 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.
- Wilson I. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 3741–3751.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wu F., Y. Huang, Y. Ma, et al. 2009. Evaluation of genetic diversity and relationships within and between two breeds of duck based on microsatellite markers. *Progress in Natural Science* 19(11): 1581–1586.
- Yan W., L. Xiao-Lin, H. Shui-Sheng, et al. 2008. Study on genetic diversity of six duck populations with microsatellite DNA. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 21(6): 776 – 783.

## **ANEXOS**

**Anexo 1:** Mapa de las evidencias arqueológicas, observaciones etnoentomológicas y probable área de domesticación y difusión de *C. moschata* (Angulo 1998)



**Anexo 2:** Encuesta realizada a los criadores de patos criollos.

<b>ENCUESTA</b>	
Propietario: _____	Fecha: ____/____/____
Edad: _____	Sexo: F ( ) M ( )
Región: _____	Provincia: _____
Distrito: _____	Localidad: _____
<b>A. INFORMACIONES GENERALES</b>	
1. ¿Qué animales cría conjuntamente con los patos? ( ) Gallinas ( ) Pavo ( ) Codorniz ( ) Otros _____	
2. Número inicial de patos _____ a. Hembras: _____ b. Machos: _____ Año: _____	
3. Número actual de patos _____ a. Hembras: _____ b. Machos: _____	
4. Identificación de animales Si ( ) No ( ) Especificar (anillos, aros, etc.): _____	
5. Lugar de procedencia: _____	
6. Lugar de venta: ( ) Mercado ( ) Chacra ( ) Distribuidor  Costo de venta S/. _____ Frecuencia de venta: _____	
7. Tipo de Alimentación a) Balanceado b) otros _____	
8. Capacitación recibidas: Si ( ) No ( ) Capacitante / Tema: _____	
9. Vacunaciones: Si ( ) No ( ) Frecuencia: 1 vez al año ( ) 2 vez al año ( )	
10. Problemas sanitarios más comunes: _____	
11. Cruzamientos: Al azar ( ) Dirigido ( )	
12. Presencia de reproductores: Si ( ) No ( ) N°( ) Hembras ( ) Machos	
<b>B. DESCRIPCION</b>	
1. Tipo de plumaje: ( ) Blanco uniforme ( ) Negro uniforme ( ) Plomo ( ) Compuesto _____	
2. Color de los tarsos y los dedos: ( ) Amarillo ( ) Blanco ( ) Rojo ( ) Negro ( ) Otros _____	
3. Otros signos particulares: _____	
<b>C. APTITUDES</b>	
1. Indicar los usos principales de esta población: ( ) Reproductores ( ) Carne ( ) Hígado graso ( ) Huevos ( ) Plumas ( ) Investigación	
2. ¿Cuáles son los sistemas de producción observada? ( ) Producción intensiva ( ) Crianza familiar ( ) Mixta	

**Anexo 3.** Ficha de campo utilizada en el presente proyecto.

FICHA CAMPO PATOS CRIOLLOS									
RESPONSABLES	Claudia Yalta / Wendy Acuña		FECHA				DEPARTAMENTO		
COMUNIDAD	DISTRITO		PROVINCIA						
LATITUD	LONGITUD		ALTURA						
Nº	COD. MUESTRA LABORATORIO	ID (Nº ARETE)	REGISTRO/ TATUAJE/ OTROS	SEXO	COLOR	EDAD	PROPIETARIO	Nº FOTO	OBSERVACIONES
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

**Anexo 4:** Georeferencia de los puntos muestreados en los departamentos de San Martín y Lambayeque.

DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	LATITUD	LONGITUD	
San Martín	Picota	Buenos Aires	06°50'04.8"S	76°20'23.6"W	
			06°56'05.1"S	76°24'13.6"W	
	Huallaga	Sacanche	07°04'18.5"S	76°42'18.3"W	
			07°04'15.0"S	76°42'49.0"W	
			07°04'08.8"S	76°42'43.3"W	
			07°04'03.8"S	76°42'48.2"W	
			07°04'16.8"S	76°42'58.8"W	
	Rioja	Nueva Cajamarca	05°53'17.5"S	77°19'07.5"W	
			05°53'36.4"S	77°17'57.5"W	
			05°51'55.3"S	77°16'31.6"W	
			05°51'55.3"S	77°16'31.6"W	
	Moyobamba	Calzadda	06°02'24.9"S	77°03'39.8"W	
			06°02'24.9"S	77°03'39.8"W	
			Jepelacio	06°06'36.7"S	76°50'54.5"W
	Lamas	Shanao	06°24'37.2"S	76°35'38.3"W	
			06°24'38.4"S	76°35'38.7"W	
				06°24'38.4"S	76°35'38.7"W
				06°35'25.0"S	76°19'04.6"W
				06°35'25.0"S	76°19'04.6"W
				06°41'34.4"	76°18'01.8"W
				06°41'34.3"S	76°18'01.8"W
			Juan Guerra	06°41'22.8"S	76°17'55.8"W
				06°35'22.6"S	76°18'30.7"W
		06°36'23.3"S		76°18'52.9"W	
		06°35'07.7"S		76°19'23.6"W	
	San Martín		06°35'05.8"S	76°19'21.2"W	
			06°35'05.8"S	76°19'21.4"W	
			Cacatachi	06°27'33.4"S	76°27'03.0"W
				06°27'33.3"S	76°27'00.3"W
		Shapaja	06°34'47.2"S	76°15'37.5"W	
			06°34'47.2"S	76°15'37.5"W	
			06°34'47.2"S	76°15'37.5"W	
Lambayeque		Picsi	06°43'34.2"S	79°46'51.6"W	
		Chiclayo	06°45'03.0"S	79°47'46.6"W	
	Chiclayo	Pimentel	06°48'52.0"S	79°54'22.4"W	
			06°52'14.4"S	79°48'20.5"W	
		Reque	06°38'29.0"S	79°52'53.6"W	
				06°42'55.0"S	79°55'18.0"W
	Lambayeque	Lambayeque	06°38'33.8"S	79°52'52.4"W	
Mochumi			06°35'42.3"S	79°55'48.6"W	

**Anexo 5:** Protocolo de extracción de DNA genómico a partir de plumas cobertoras alares de *C. moschata*.

## PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE PLUMAS

### DÍA 1

1. Encender el termobloque y regular a una temperatura de 58 °C
2. En un tubo de microcentrífuga (2 mL) adicionar 750 µL de TE<sub>20:5</sub> y 75 µL de SDS
3. Adicionar 1 µL de proteinasa K (20 ng/µL)

NOTA: PREPARAR UNA SOLUCIÓN BUFFER DE LISIS

En un tubo de 50 mL que contenga:

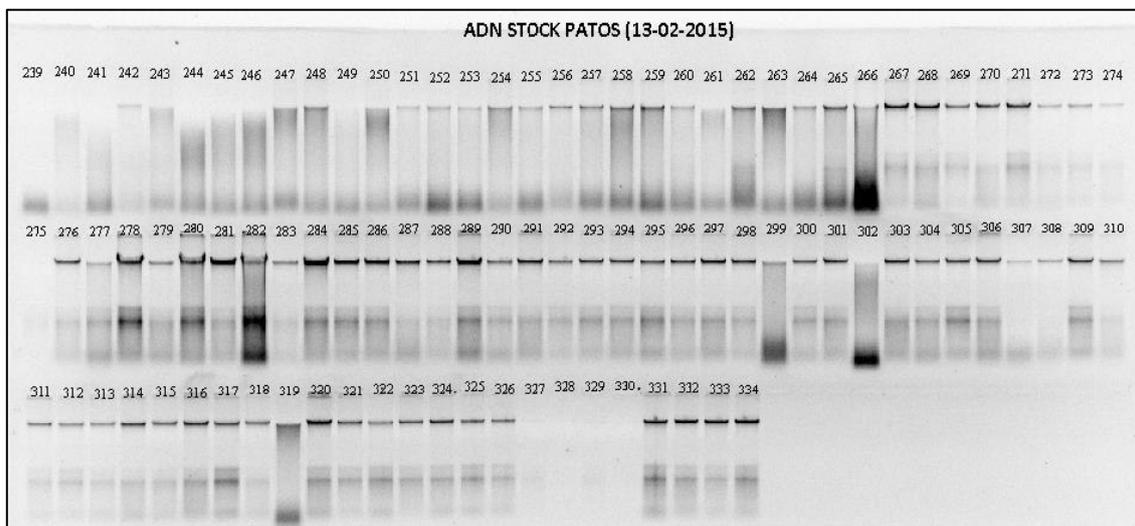
(1)TE <sub>20:5</sub>	(2) SDS 10%	(3) Proteinasa K	TOTAL
750 µL x N° muestras	75 µL x N° muestras	1 µL x N° muestras	826 µL x N° muestras

4. Adicionar los cálamos de 6 plumas, cortando una distancia de 1 a 2 cm, homogenizar usando vortex.
5. Incubar a 58 °C x 3 horas( Observar cada 30 min)
6. Retirar los tubos del termobloque y enfriar (10 minutos aproximadamente)
7. Adicionar 500 µL de acetato de potasio 3M, mezclar (Vortex aprox. Por 1 min) y refrigerar por 10 min a -20 °C.
8. Centrifugar a 14 000 rpm x 10 min a 10 °C y recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL (2 mL)
9. Enrazar con cloroformo alcohol isoamílico, homogenizar en vortex por 1 min.
10. Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min a 10 °C y recuperar el sobrenadante en 2 tubos (es decir por duplicado para cada muestra) de 1.5 mL, que contenga 800 µL de isopropanol helado.
11. Homogenizar suavemente por inversión para la formación del pellet de DNA. Refrigerar por 15 min a -20 °C.
12. Centrifugar a 14 000 rpm por 5 min y eliminar el sobrenadante.
13. Adicionar 200 µL de TE<sub>20:5</sub> (dejar a 4 °C), 200 µL de acetato y 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), homogenizar con vortex por 1 min.
14. Centrifugar a 14 000 rpm por 15 min y luego recuperar el sobrenadante de las muestras por duplicado en un solo tubo de microcentrífuga.
15. Adicionar 600 µL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), Vortex 1 min.
16. Centrifugar por 10 min a 14 000 rpm a 10 °C, trasvasar el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL
17. Adicionar aproximadamente 800 µL de etanol absoluto (enrazar a 1.5 mL), invertir suavemente hasta visualizar el algodón de DNA y refrigerar a -20 °C durante 30 min (o hasta el siguiente día).

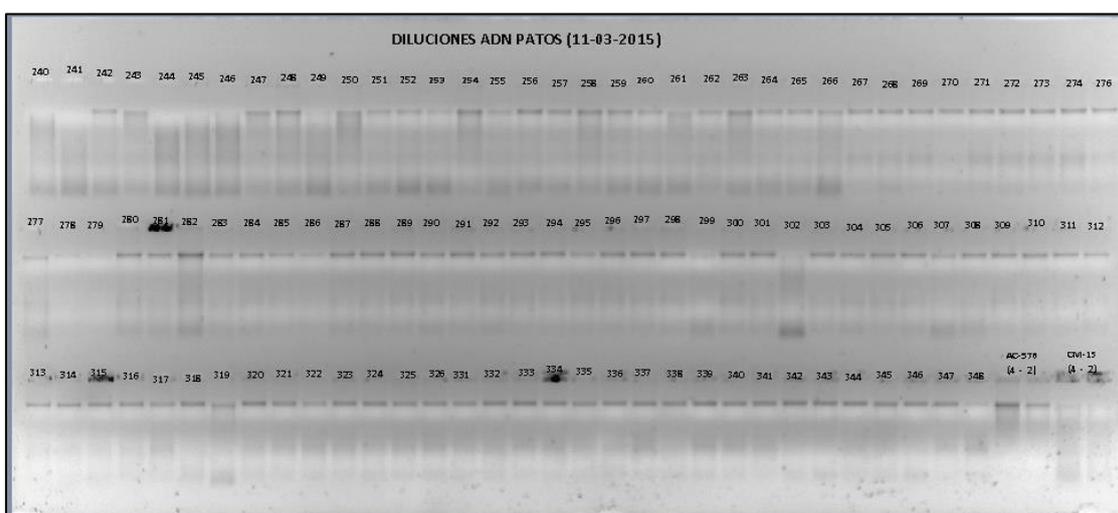
## DÍA 2

18. Centrifugar por 5 min a 14 000 rpm a 10 °C y eliminar el sobrenadante por inversión. Cuidando de no votar el pellet.
19. Adicionar 200 µL de TE<sub>20:5</sub> y mezclar. Adicionar 8 µL NaCl 5M. Mezclar utilizando Vortex
20. Adicionar etanol helado 500 µL, mezclar invirtiendo el tubo suavemente hasta que se formen los pellets de DNA, dejar a 20 °C por 20 minutos.
21. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante.
22. Adicionar 400 µL de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 10 °C, luego eliminar el sobrenadante por inversión.
23. Adicionar 400 µL de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 10 °C, luego eliminar el sobrenadante por inversión
24. Adicionar 300 µL de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 10°C, luego eliminar el sobrenadante por inversión.
25. Adicionar 400 µL de etanol absoluto. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 10 °C, luego eliminar el sobrenadante por inversión.
26. Adicionar 200 µL de etanol absoluto. Centrifugar 5 min a 14 000 rpm a 10 °C, eliminar el sobrenadante por inversión.
27. Dejar secar en la estufa a 39 °C (O/N)
28. Resuspender en buffer TE<sub>10:1</sub> (o en agua libre de nucleasas), de acuerdo al tamaño del pellet de DNA.

**Anexo 6:** Gel de agarosa al 1% del DNA total de *C. moschata*.



**Anexo 7:** Gel de agarosa al 2% de las diluciones de DNA (30 ng/μL) de *C. moschata*.



**Anexo 8:** Características de los 24 loci escogidos para el estudio de diversidad genética de *C. moschata*.

Nº	LOCUS	SECUENCIA	RANGO	FLUORÓFORO	MOTIVO DE REPETICIÓN	REFERENCIA
1	APL02	<b>APL02F: CACGACGTTGTAAAACGACGATTCAACCTTAGCTATCAGTCTC</b> C	90-138	6-FAM	(CA)15GA(CA)32AA A(CAA)4	Denk et al, 2004
		APL02R: CGCTCTTGGCAAATGTCC				
2	CAUD026	<b>CAUD026F: CACGACGTTGTAAAACGACACGTCACATCACCCACAG</b>	138.5-168.7	6-FAM	(AC)17	Huang et al, 20056.
		CAUD026R: CTTTGCCTCTGGTGAGGTTCC				
3	APH15	<b>APH15F: CACGACGTTGTAAAACGACTGAATATGCGTGGCTGAA</b>	168.2-198	6-FAM	(CA)9	Maak et al, 2003; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008.
		APH15R: CAGTGAGGAATGTGTTTGAGTT				
4	CAUD004	<b>CAUD004F: CACGACGTTGTAAAACGACTCCACTTGGTAGACCTTGAG</b>	199-240	6-FAM	(AC)20	Huang et al, 2005.
		CAUD004R: TGGGATTCAGTGAGAAGCCT				
5	AY295	<b>AY295F: CACGACGTTGTAAAACGACGGCTTCTGTGCTCCTCAGAT</b>	245-403	6-FAM	(TCTCTTTC) 9 ... (TTTC) 12	Ying Su et al, 2007.
		AY295R: GCACAAGTGGCATGTGTCAT				
6	APL11	<b>APL11F: CACGACGTTGTAAAACGACAACACTACAGGGCACCTTATTTCC</b>	70-127	NED	(GA)25	Denk et al, 2005
		APL11R: TTGCATCAGGGTCTGTATTTTC				
7	CAUD022	<b>CAUD022F: CACGACGTTGTAAAACGACCATGCTGAGTGTCTATCCT</b>	128-181	NED	(CGA)8	Huang et al, 2005 .
		CAUD022R: CCAGGTCAGGCGTGTGCT				
8	APH01	<b>APH01F: CACGACGTTGTAAAACGACCACTTGCTCTTCACTTTCTTT</b>	182-232	NED	(CA)10	Maak et al, 2000; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008.
		APH01R: GTATGACAGCAGACACGGTAA				

Nº	LOCUS	SECUENCIA	RANGO	FLUORO FORO	MOTIVO DE REPETICIÓN	REFERENCIA
9	APT004	<b>APT004F: CACGACGTTGTAAAACGACGGGCAGGAAAATCTCCTGAAT</b>	292-352	NED	GATAGAT(GATA) 15	Hsiao et al, 2008
		APT004R: TCTCAGTGGCTGAGCGGTC				
10	CMO211	<b>CMO211F: CACGACGTTGTAAAACGACGGATGTTGCCCCACATATTT</b>	90-130	HEX	**	Ying Su et al, 2007.
		CMO211R: TTGCCTTGTTTATGAGCCATT				
11	APT025	<b>APT025F: CACGACGTTGTAAAACGACTCCTAAGAAACGTTGCTTCATAG ACC</b>	131-171	HEX	(GATA)13	Hsiao et al, 2008
		APT025R: GAGTTAAGCTTCATCACTCTGTGACTG				
12	APH13	<b>APH13F: CACGACGTTGTAAAACGACCAACGAGTGACAATGATAAA</b>	173-220	HEX	(GA)10	Maak et al, 2003; Wu et al, 2008.
		APH13R: CAATGATCTCACTCCCAATAG				
13	APH18	<b>APH18F: CACGACGTTGTAAAACGACTTCTGGCCTGATAGGTATGAG</b>	225-300	HEX	(CA)8	Maak et al, 2003; Wu et al, 2008.
		APH18R: GAATTGGGTGGTTCATACTGT				
14	APH09	<b>CACGACGTTGTAAAACGACGGATGTTGCCCCACATATTT</b>	75-150	PET	(CA)11	Maak et al, 2000; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008; Khan Ahmadi et al, 2007.
		TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA				
15	APT029	<b>APT029F: CACGACGTTGTAAAACGACTCTGCAAGGTATTCTCATTCTTAT TCTT</b>	186.5-224.4	PET	(GATA)14	Hsiao et al, 2008
		APT029R: GATACGTAGAGTGGATGCTGGAGAT				
16	APH07	<b>APH07F: CACGACGTTGTAAAACGACACATCTTTGGCATTTTGAA</b>	225-295	PET	(GGAA)18	Maak et al, 2000; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008; Khan Ahmadi et al, 2007.
		APH07R: CATCCACTAGAACACAGACATT				

N°	LOCUS	SECUENCIA	RANGO	FLUORO FORO	MOTIVO DE REPETICIÓN	REFERENCIA
17	CAUD001	<b>CAUD001F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACACAGCTTCAGCAGACTTAGA</b>	300-360	PET	(AAAAC)3A6G(CA) 9A33	Huang et al, 2005.
		CAUD001R: GCAGAAAGTGATTAAGGAAG				
18	APT021	<b>APT021F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACGCACTCCCTAACTAGTAGCGCTC</b>	154-186.5	PET	(GATA)10	Hsiao et al, 2008
		APT021R: GAAGCATTGTCATACTTGCCTGA				
19	CAUD024*	<b>CAUD024F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACTCGCATTAAAGCTCTGATCT</b>	*	*	(TTTC)33T19	Huang et al, 2006.
		CAUD024R: ATCAACAGAATCCAAAATATG				
20	APH02*	<b>APH02F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACCACACGCGCAGCAGAGGA</b>	*	*	(CA)3TA(CA)7	Maak et al, 2003; Baratti et al, 2008.
		APH02R: GTCGTCAGCCAGGGGTTTGAG				
21	APH16*	<b>APH16F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACCCTTCTGAACCTTCGTAG</b>	*	*	(CA)17	Maak et al, 2003; Baratti et al, 2008; Wu et al, 2008.
		APH16R: AAATATAGACTTTTGTCTGAA				
22	APH03*	<b>APH03F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACAACCAAGACAGAATAATCCTTA</b>	*	*	(CA)9(TA)5	Maak et al, 2000; Wu et al, 2008.
		APH03R: GAACACAACCTGCTTTGCTA				
23	APT005*	<b>APT005F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACTCCGTACAGACCAACATCGG</b>	*	*	(GATA)17	Hsiao et al, 2008
		APT005R: AGGTCTTTACAGCCCACTCCC				
24	APH11*	<b>APH11F: CACGACGTTGTA<del>AAA</del>ACGACGGACCTCAGGAAAATCAGTGTA</b>	*	*	**	Maak et al, 2000; Wu et al, 2008; Khan Ahmadi et al, 2007.
		APH11R: GCAGGCAGAGCAGGAAATA				

(\*) Locus con transferibilidad no exitosa, (\*\*) Información que no se encuentra publicada

**Anexo 9:** Protocolo de amplificación en sistemas multiplex para 18 marcadores SSRs.

<b>FAM</b>		
<b>PROTOCOLO: APL02, CAUD26, APH15, CAUD04, AY295</b>		
	<b>Con. Stock</b>	<b>Conc. Final</b>
H <sub>2</sub> O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM
CEBADOR F APL02	10 μM	0.03 μM
CEBADOR R APL03	10 μM	0.06 μM
CEBADOR F CAUD26	10 μM	0.08 μM
CEBADOR R CAUD26	10 μM	0.16 μM
CEBADOR F APH15	10 μM	0.07 μM
CEBADOR R APH15	10 μM	0.17 μM
CEBADOR F CAUD04	10 μM	0.05 μM
CEBADOR R CAUD04	10 μM	0.1 μM
CEBADOR F AY295	10 μM	0.1 μM
CEBADOR F AY295	10 μM	0.2 μM
Cola M13 FAM	20 μM	0.2 μM
TAQ	5 U	0.5 U
DNA	15 ng/μL	
Volumen total		10 μL

<b>NED</b>		
<b>PROTOCOLO: CAUD22, APL11, APH01, APT04</b>		
	<b>Con. Stock</b>	<b>Conc. Final</b>
H <sub>2</sub> O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM
CEBADOR F CAUD22	10 μM	0.2 μM
CEBADOR R CAUD22	10 μM	0.3 μM
CEBADOR F APL11, APH01	10 μM	0.05 μM
CEBADOR R APL11, APH01	10 μM	0.1 μM
CEBADOR F APT04	10 μM	0.1 μM
CEBADOR R APT04	10 μM	0.2 μM
Cola M13 NED	20 μM	0.2 μM
TAQ	5 U	0.5 U
DNA	15 ng/μL	
Volumen total		10 μL

<b>VIC</b>		
<b>PROTOCOLO: CMO211, APH13, APT25, APH18</b>		
	<b>Con. Stock</b>	<b>Conc. Final</b>
H <sub>2</sub> O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM
CEBADOR F CMO211	10 μM	0.25 μM
CEBADOR R CMO211	10 μM	0.3 μM
CEBADOR F APH13	10 μM	0.05 μM
CEBADOR R APH13	10 μM	0.1 μM
CEBADOR F APT25	10 μM	0.07 μM
CEBADOR R APT25	10 μM	0.15 μM
CEBADOR F APH18	10 μM	0.2 μM
CEBADOR R APH18	10 μM	0.3 μM
Cola M13 VIC	20 μM	0.2 μM
TAQ	5 U	0.5 U
DNA	15 ng/μL	
Volumen total		10 μL

<b>PET</b>		
<b>PROTOCOLO: APT29, CAUD001, APH07, APT21, APH09</b>		
	<b>Con. Stock</b>	<b>Conc. Final</b>
H <sub>2</sub> O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM
CEBADOR F APT29	10 μM	0.2 μM
CEBADOR R APT29	10 μM	0.4 μM
CEBADOR F CAUD001	10 μM	0.2 μM
CEBADOR R CAUD001	10 μM	0.4 μM
CEBADOR F APH07	10 μM	0.05 μM
CEBADOR R APH07	10 μM	0.1 μM
CEBADOR F APT21	10 μM	0.05 μM
CEBADOR R APT21	10 μM	0.1 μM
CEBADOR F APH09	10 μM	0.05 μM
CEBADOR R APH09	10 μM	0.1 μM
Cola M13 PET	20 μM	0.2 μM
TAQ	5 U	0.5 U
DNA	15 ng/μL	
Volumen total		10 μL

**Anexo 10:** Programa de amplificación para los PCR multiplex.

<b>PROTOCOLO 1</b>	<b>FAM</b>
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min <b>30</b> ciclos: 95 °C x 45 seg; <b>59 °C</b> x 1 min; 72 °C x 1 min Extensión final: 72 °C x 10 min 4 °C mantenimiento
	<b>NED</b>
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min <b>30</b> ciclos: 95 °C x 45 seg; <b>53 °C</b> x 1 min; 72 °C x 1 min Extensión final: 72 °C x 10 min 4 °C mantenimiento

<b>PROTOCOLO 2</b>	<b>VIC &amp; PET</b>
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min <b>25</b> ciclos: 95 °C x 45 seg; <b>57 °C</b> x 1 min; 72 °C x 1 min  <b>10</b> ciclos: 95 °C x 30 seg; <b>53 °C</b> x 45 seg; 72 °C x 1 min Extensión final: 72 °C x 15 min 4 °C mantenimiento

**Anexo 11:** Tablas de frecuencias alélicas registradas para los 18 marcadores SSRs en las poblaciones de SM y Lam.

Nombre del Locus	N° total de alelos	SM			Lam		
		N° de alelos	Tamaño de alelos	Freq. alélica	N° de alelos	Tamaño de alelos	Freq. alélica
APL02	1	1	119	1.0000	1	119	1.0000
CAUD26	4	4	158	0.0359	3	158	0.0698
			160	0.0067		162	0.8992
			162	0.9327		164	0.0310
			164	0.0247			
APH15	1	1	189	1.0000	1	189	1.0000
CAUD004	1	1	207	1.0000	1	207	1.0000
AY295	35	32	233	0.0138	18	233	0.0891
			259	0.3005		259	0.5039
			261	0.0046		263	0.0194
			263	0.0138		267	0.0039
			279	0.1078		279	0.0116
			281	0.1101		285	0.0504
			283	0.0069		289	0.0116
			285	0.0757		291	0.0388
			286	0.0023		293	0.1395
			287	0.0367		295	0.0039
			289	0.0505		297	0.0775
			291	0.0390		299	0.0039
			293	0.0069		301	0.0039
			295	0.0138		305	0.0078
			297	0.0046		307	0.0116
			301	0.0023		339	0.0155
			305	0.0161		387	0.0039
			307	0.0206		395	0.0039
			309	0.0298			
			311	0.0046			
			315	0.0344			
			337	0.0206			
			339	0.0573			
			345	0.0046			
			357	0.0046			
			361	0.0023			
			367	0.0023			
			369	0.0023			
			377	0.0046			
			383	0.0023			
			385	0.0023			
			387	0.0023			

Nombre del Locus	N° total de alelos	SM			Lam		
		N° de alelos	Tamaño de alelos	Freq. alélica	N° de alelos	Tamaño de alelos	Freq. alélica
APL11	3	3	100	0.0045	1	110	1.0000
			104	0.0045			
			110	0.9910			
CAUD22	10	10	138	0.0047	6	146	0.0043
			144	0.0047		148	0.2672
			146	0.0023		150	0.0043
			148	0.2230		152	0.1336
			150	0.0047		154	0.5862
			152	0.5446		156	0.0043
			154	0.2042			
			156	0.0023			
			158	0.0047			
APH01	6	5	187	0.0022	3	191	0.0078
			189	0.0045		209	0.9609
			195	0.0045		211	0.0313
			209	0.9731			
			211	0.0157			
APT004	5	5	303	0.0068	4	303	0.0282
			305	0.0090		307	0.6210
			307	0.8688		311	0.0121
			311	0.0113		315	0.3387
			315	0.1041			
CMO211	4	4	108	0.4135	1	108	1.0000
			112	0.4647			
			124	0.1186			
			126	0.0032			
APT25	9	8	138	0.2353	6	132	0.0081
			142	0.2557		138	0.0081
			146	0.1448		142	0.4798
			150	0.1584		146	0.1694
			154	0.0023		150	0.1734
			158	0.0995		154	0.1613
			162	0.0362			
APH13	6	6	179	0.0023	4	185	0.3359
			185	0.1147		187	0.2695
			187	0.1995		189	0.3867
			189	0.5505		191	0.0078
			191	0.0344			
APH18	2	2	270	0.9955	1	270	1.0000
			272	0.0045			

Nombre del Locus	N° total de alelos	SM			Lam		
		N° de alelos	Tamaño de alelos	Freq. alélica	N° de alelos	Tamaño de alelos	Freq. alélica
APH09	6	4	110	0.4796	3	100	0.0155
			114	0.4661		108	0.0078
			126	0.0317		110	0.9767
			130	0.0226			
APT21	8	7	169	0.2986	5	169	0.0354
			173	0.0023		171	0.0039
			177	0.0949		177	0.1850
			181	0.4329		181	0.6063
			183	0.0023		185	0.1693
			185	0.1597			
APT29	8	7	187	0.1432	7	183	0.0040
			191	0.1568		187	0.3333
			195	0.6114		191	0.2143
			199	0.0636		195	0.3651
			203	0.0091		199	0.0198
			207	0.0068		203	0.0119
			224	0.0091		207	0.0516
APH07	7	7	236	0.4977	3	236	0.5159
			238	0.0046		268	0.4127
			256	0.2420		280	0.0714
			268	0.1324			
			280	0.0685			
			294	0.0023			
CAUD001	3	3	314	0.0541	3	314	0.2031
			316	0.8649		316	0.7578
			318	0.0811		318	0.0391