

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ESTUDIO FILOGENÉTICO DE TRES LINEAS DE
CUYES (*Cavia porcellus* L.), PERÚ, ANDINA E INTI EN
LA HACIENDA “EL PRADO”**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

ELABORADO POR:

MARCELA ALEXANDRA DÍAZ RIVADENEIRA

**SANGOLQUÍ – ECUADOR
2012**

RESUMEN

Para seleccionar cuyes reproductores por caracteres morfológicos y variabilidad genética; se efectuó un análisis fenotípico detallado y se secuenció el gen mitocondrial citocromo b de 21 ejemplares de las líneas mejoradas Inti, Perú y Andina del criadero del IASA, y un ejemplar adicional de la línea Inka del mismo criadero. El análisis fenotípico cualitativo calificó positivamente a todos los ejemplares de las distintas líneas. La variable sintética generó tres grupos de individuos según el puntaje adquirido por los mismos, en cada variable fenotípica cualitativa y cuantitativa. El mejor grupo lo conformaron un cuy de la línea Andina, dos de la línea Perú, y cuatro de la línea Inti.

La metodología para la caracterización molecular y el análisis filogenético del gen mitocondrial citocromo b incluyó a secuencias depositadas en el GenBank de ejemplares *Cavia porcellus* de países vecinos y de otros géneros asociados a esta especie. Los ejemplares de la Hda. El Prado, alcanzaron un promedio de 1101,5 nt o el 98,27% del gen completo (1120,8 nt). Se obtuvo un 98,08% de pares idénticos y 1,92% de variables por transición y transversión. El 85,50% de sitios analizados fueron conservados y el 14,50 % fueron variables, de los cuales el 55,48% fueron parsimoniosos informativos. Los ejemplares más diversos fueron I2 e I5, de la línea Inti. El ejemplar I5 fue el más variable genéticamente de entre la población muestreada y obtuvo un buen puntaje en la caracterización fenotípica. El árbol de distancias genéticas para la inferencia filogenética fue bastante robusto y determinó una similitud del 100% para individuos de la especie *C. porcellus* bajo una frecuencia de análisis de 1000 réplicas.

PALABRAS CLAVE: *Cavia porcellus*, citocromo b, ADN mitocondrial, análisis filogénico, selección, variabilidad, distancias genéticas.

ABSTRACT

To select stud guinea pigs using morphological features and genetic variability, a detailed phenotypic analysis was done also the mitochondrial gen cytochrome b of twenty one specimens corresponding to the breeding lines Inti, Peru and Andean and an extra specimen of the line Inka, all of them from the Iasa "El Prado" hatchery, were sequenced. The qualitative phenotypic analysis graded positively all the specimens of the different lines. Three specimens groups were generated by the synthetic variable according to score achieved by them for each qualitative and qualitative phenotypic variable. The best group was integrated by: one guinea pig from the Andean line, two from the Peru line and four from the Inti line.

The methodology for the molecular characterization and the phylogenetic analysis of the mitochondrial gen cytochrome b includes sequences deposited in GenBank of *Cavia porcellus* specimens from neighbor countries to Ecuador and other genus associated to this specie. The specimens from the "El Prado" hatchery reach a mean of 1101.5 nt or the 98.27% of the entire gen (1120.8 nt). A 98.08% of identical pairs were obtained and 1.92% of variables by transition and transversion. The 85.50% of analyzed locations were conserved and the 14.50% were variables, of them, the 55.48% were informative parsimonious. The more diverse specimens were I2 and I5 of the Inti line. The specimen I5 was the most genetically varying among the sampled population and obtained a good score in the phenotypic characterization. The tree of genetic distances for the phylogenetic inference was quite robust and determined a 100% similitude for the samples of the *Cavia Porcellus* specie under a frequency analysis of 1000 replicas.

KEYWORDS: *Cavia porcellus*, cytochrome b, mitochondrial DNA phylogenetic analysis, selection, variability, genetic distances

**ESTUDIO FILOGENÉTICO DE TRES LINEAS DE CUYES (*Cavia porcellus*
L.), PERÚ, ANDINA E INTI EN LA HACIENDA “EL PRADO”**

MARCELA ALEXANDRA DÍAZ RIVADENEIRA

REVISADO Y APROBADO

Ing. Patricia X. Falconí S.

DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Ing. Patricia Falconí S.

DIRECTORA

Ing. Cesar Falconí S.

CODIRECTOR

Abg. Carlos Orozco B. MSc.

SECRETARIO ACADÉMICO

**ESTUDIO FILOGENÉTICO DE TRES LINEAS DE CUYES (*Cavia porcellus*
L.), PERÚ, ANDINA E INTI EN LA HACIENDA “EL PRADO”**

MARCELA ALEXANDRA DÍAZ RIVADENEIRA

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACION DEL INFORME TECNICO.

| | CALIFICACIÓN | FECHA |
|---|---------------------|--------------|
| Ing. Patricia Falconí DIRECTORA | _____ | _____ |
| Ing. Cesar Falconí CODIRECTOR | _____ | _____ |

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN
ESTA SECRETARIA.

SECRETARIA ACADEMICA

CERTIFICACIÓN

Ing. Patricia Falconí S.

Ing. Cesar Falconí S.

Certifican:

Que el trabajo titulado, “*ESTUDIO FILOGENÉTICO DE TRES LINEAS DE CUYES (Cavia porcellus), PERÚ, ANDINA E INTI EN LA HACIENDA EL PRADO*”, realizado por Marcela Alexandra Díaz Rivadeneira, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido al contenido científico – técnico expuesto en el presente trabajo recomendamos su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Marcela Alexandra Díaz Rivadeneira que lo entregue a la Ing. Patricia Falconí S., en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, febrero de 2012.

Ing. Patricia Falconí
DIRECTOR

Ing. Cesar Falconí
CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

MARCELA ALEXANDRA DÍAZ RIVADENEIRA

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “*ESTUDIO FILOGENÉTICO DE TRES LINEAS DE CUYES (Cavia porcellus), PERÚ, ANDINA E INTI EN LA HACIENDA EL PRADO*”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, febrero de 2012.

Marcela Alexandra Díaz Rivadeneira

AUTORIZACIÓN

Yo, Marcela Alexandra Díaz Rivadeneira

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “*ESTUDIO FILOGENÉTICO DE TRES LINEAS DE CUYES (Cavia porcellus), PERÚ, ANDINA E INTI EN LA HACIENDA EL PRADO*”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, febrero de 2012.

Marcela Alexandra Díaz Rivadeneira

*A los seres más valiosos de la tierra,
mis amados padres y hermanas.*

A Esteban.

Marcela A. Díaz Rivadeneira

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la culminación de este proyecto a Dios por ser mi fuente de fortaleza, a la Escuela Politécnica del Ejército, en especial a la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias por su incesante labor en la formación de profesionales de alta calidad y a todos los docentes, quienes de alguna forma aportaron a la realización de este proyecto.

Agradezco a mis directores de tesis, la Ing. Patricia Falconí y el Ing. Cesar Falconí, por compartirme sus valiosos conocimientos, así como también por su colaboración, paciencia y dedicación en la ejecución de este proyecto.

Agradezco de manera especial a los doctores Darwin Rueda y Wilmer Pozo por sus constructivos comentarios y acertados aportes en beneficio de la presente investigación.

Agradezco a mis padres Patricia y Marcelo, y a mis hermanas Gissela y Silvia, por su lucha incansable, sus sabias enseñanzas, su apoyo incondicional a pesar de las adversidades y por la confianza que han depositado en mí en el desarrollo de mis proyectos y la culminación de mis metas.

A mis amigos por su amistad, la ayuda prestada y su confianza, en especial a Anita Alarcón por su tiempo y el aporte científico trascendental en la elaboración de la investigación. Y finalmente quiero agradecer a mi mejor amigo, mi inspiración, mi cómplice Esteban Chávez por su profunda fe en mí, su apoyo y paciencia.

Marcela A. Díaz Rivadeneira

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Marcela Alexandra Díaz Rivadeneira

**DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Ing. Patricia X. Falconí S.

DELEGADO DE LA UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO

Ab. Carlos Orozco Bravo, MSc.

Sangolquí, febrero de 2012.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 ANTECEDENTES..... | 1 |
| 1.2 OBJETIVOS | 5 |
| 1.2.1 General | 5 |
| 1.2.2 Específicos..... | 5 |
| | |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 6 |
| 2.1 GENERALIDADES SOBRE EL CUY (<i>Cavia porcellus</i>) | 6 |
| 2.1.1 Origen y Distribución | 6 |
| 2.1.2 Descripción Taxonómica y Morfológica | 7 |
| 2.1.3 Caracteres morfológicos de cada línea | 9 |
| 2.1.3.1 Descripción fenotípica de la línea Andina..... | 9 |
| 2.1.3.2 Descripción fenotípica de la línea Inti | 9 |
| 2.1.3.3 Descripción fenotípica de la línea Perú | 10 |
| 2.1.4 Efectos de la Consanguinidad en Cuyes..... | 11 |
| 2.1.5 Genética del Cuy (<i>Cavia porcellus</i> L.)..... | 12 |
| 2.2 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA..... | 12 |
| 2.2.1 Extracción de ADN | 12 |
| 2.2.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) | 14 |
| 2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa..... | 17 |
| 2.2.4 Secuenciación..... | 19 |
| 2.3 HERRAMIENTAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA | 20 |
| 2.3.1 Marcadores Moleculares | 21 |

| | |
|---|---------------|
| 2.3.2 ADN Mitocondrial (ADNmt) | 22 |
| 2.3.2.1 Citocromo b | 23 |
| 2.3.3 Polimorfismos | 25 |
| 2.3.4 Endogamia o Consanguinidad | 25 |
| 2.4 SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA | 25 |
| 2.4.1 Máxima Parsimonia | 26 |
| METODOLOGÍA | 28 |
| 3.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN | 28 |
| 3.1.1 Ubicación Política | 28 |
| 3.1.2 Ubicación Geográfica | 28 |
| 3.1.3 Ubicación Ecológica | 28 |
| 3.2 MATERIALES | 29 |
| 3.2.1 Materiales de campo | 29 |
| 3.2.1.1 Especímenes..... | 29 |
| 3.2.1.2 Muestras de tejido | 29 |
| 3.2.2 Materiales de laboratorio | 30 |
| 3.2.2.1 Materiales y equipos..... | 30 |
| 3.2.2.2 Enzimas y reactivos..... | 30 |
| 3.3 MÉTODOS | 30 |
| 3.3.1 Caracterización morfológica | 30 |
| 3.3.2 Caracterización molecular | 35 |
| 3.3.2.1 Colecta de tejido..... | 35 |
| 3.3.2.2 Extracción de ADN | 36 |
| 3.3.2.3 Visualización y cuantificación del ADN | 38 |
| 3.3.2.4 Amplificación vía PCR | 39 |
| 3.3.2.5 Visualización de los productos PCR..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.2.6 Secuenciación | 41 |
| 3.3.3 Análisis filogenético | 42 |
| 3.3.4 Análisis estadístico | 42 |
| 3.3.4.1 Caracteres fenotípicos cualitativos | 43 |
| 3.3.4.2 Caracteres fenotípicos cuantitativos | 43 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |
| 4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA | 46 |
| 4.1.1 Descripción fenotípica | 46 |
| 4.1.1.1 Color del pelo | 46 |
| 4.1.1.2 Color de ojos | 48 |
| 4.1.1.3 Número de dedos | 48 |
| 4.1.1.4 Color de orejas | 49 |
| 4.1.2 Medidas morfométricas | 49 |
| 4.1.2.1 Peso vivo (PV) | 49 |
| 4.1.2.2 Largo total (LT) | 50 |
| 4.1.2.3 Longitud cabeza-cuerpo (CC) | 50 |
| 4.1.2.4 Largo del rudimento caudal (LC) | 51 |
| 4.1.2.5 Largo de la oreja (LO) | 52 |
| 4.1.2.6 Largo de la pata (LP) | 52 |
| 4.1.2.7 Largo de la cabeza (Lca) | 53 |
| 4.1.2.8 Altura de la cabeza (Aca) | 53 |
| 4.1.2.9 Largo del pelo (Lp) | 54 |
| 4.1.3 Variable sintética | 54 |
| 4.1.3.1 Grupo 1 | 54 |
| 4.1.3.2 Grupo 2 | 56 |
| 4.1.3.3 Grupo 3 | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR | 60 |
| 4.2.1 Extracción de ADN | 60 |
| 4.2.2 Caracterización de ADN mitocondrial amplificado | 61 |
| 4.2.1 Caracterización de ADN mitocondrial secuenciado | 61 |
| 4.2.2 Caracterización del gen citocromo b | 63 |
| 4.2.2.1 Análisis de secuencias completas | 63 |
| 4.2.2.2 Selección de reproductores | 68 |
| 4.2.3 Análisis de secuencias incompletas..... | 69 |
| 4.2.4 Análisis filogenético | 70 |
| | |
| CONCLUSIONES | 73 |
| | |
| RECOMENDACIONES..... | 75 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 76 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla. 2.1. Clasificación zoológica del cuy doméstico. | 8 |
| Tabla. 2.2. Medidas morfométricas correspondientes a cuyes de la línea Andina, tomadas a los 3 meses de edad. | 10 |
| Tabla. 2.3. Medidas morfométricas correspondientes a cuyes de la línea Inti, tomadas a los 3 meses de edad. | 10 |
| Tabla. 2.4. Medidas morfométricas correspondientes a cuyes de la línea Perú, tomadas a los 3 meses de edad (Guzmán 2000). | 11 |
| Tabla. 3.1. Rango de colores para la característica fenotípica color de pelo. | 31 |
| Tabla. 3.2. Rango de colores para la característica fenotípica color de orejas. | 32 |
| Tabla. 3.3. Categorías según el número de dedos | 33 |
| Tabla. 3.4. Secuencias de los iniciadores Citocromo b1 y Citocromo b2 para <i>Cavia porcellus</i> L. | 39 |
| Tabla. 3.5. Componentes para 50 µL de muestra para la amplificación vía PCR. | 40 |
| Tabla. 3.6. Índice de valoración para variables fenotípicas cualitativas.. | 44 |
| Tabla. 3.7. Índice de valoración para variables fenotípicas cuantitativas | 44 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|--------------|--|----|
| Cuadro. 4.1. | Calificación de los caracteres fenotípicos cualitativos. | 47 |
| Cuadro. 4.2. | Calificación de la variable sintética | 58 |
| Cuadro. 4.3. | Significado de acrónimos del cuadro 4.2. | 60 |
| Cuadro. 4.4. | Tamaño y concentración del ADN mitocondrial amplificado vía PCR. | 62 |
| Cuadro. 4.5. | Tamaño y concentración del ADN mitocondrial citocromo b secuenciado. | 63 |
| Cuadro. 4.6. | Porcentaje de pares idénticos, en transición y en transversión de las secuencias completas del gen mitocondrial citocromo.. | 64 |
| Cuadro. 4.7. | Fragmentos de mayor divergencia genética en la secuencia del gen mitocondrial citocromo b de la muestra I5..... | 68 |
| Cuadro. 4.8. | Porcentaje de pares idénticos, en transición y en transversión de las secuencias semi-completas del gen mitocondrial citocromo b. | 70 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura. 2.1. Distribución del genero <i>Cavia</i> en América del Sur (Huckinghaus 1961, citado por Chauca, 2007)..... | 7 |
| Figura. 2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Rosales 2002)..... | 17 |
| Figura. 2.3. Parte de una secuencia de ADN producida por un secuenciador automatizado. | 20 |
| Figura. 2.4. Estructura del ADN mitocondrial humano (Meneses, 2010). | 24 |
| Figura. 3.1. Color de ojos. a) Negro. b) Rojo. (Díaz, 2012)..... | 32 |
| Figura. 3.2. Esquema y medidas tomadas en un ratón (Tirira 2007). | 33 |
| Figura. 3.3. Registro de medidas morfométricas (Díaz, 2012)..... | 34 |
| Figura. 3.4. Toma de muestras de tejido (Díaz, 2012)..... | 36 |
| Figura. 3.5. ADN del gen citocromo b de tres muestras de cuy (<i>Cavia porcellus</i>) comparación con el marcador de ADN de 2000 pb (Díaz, 2012). 41 | |
| Figura. 4.1. Correlación entre Peso vivo (PV) y Longitud cabeza-cuerpo (CC) en cuyes de las líneas Andina, Perú e Inti de la Hda. El Prado (Díaz, 2012.). | 51 |
| Figura. 4.2. Visualización de ADN en gel de agarosa al 0.8% (Díaz, 2012). | 60 |
| Figura. 4.3. Dedrograma de secuencias completas del gen mitocondrial citocromo b de especímenes de la especie <i>C. porcellus</i> (Díaz, 2012)..... | 65 |
| Figura. 4.4. Matriz de distancias genéticas de secuencias completas del gen citocromo b en cuyes de las líneas Andina, Perú e Inti (Díaz, 2012; Mega 4.0.). | 66 |
| Figura. 4.5. Sitios de divergencia transicional entre secuencias del gen mitocondrial citocromo b (Díaz, 2012; Mega 4.0.)..... | 67 |
| Figura. 4.6. Sitios de divergencia transversional entre secuencias del gen mitocondrial citocromo b (Díaz, 2012; Software Mega 4.0). | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura. 4.7. Árbol de distancias genéticas a partir de secuencias mitocondriales del gen para citocromo b de especímenes de la Familia Caviidae (Díaz, 2012). | 71 |
| Figura. 4.8. Matriz de distancias genéticas de especímenes de la Familia Caviidae (Díaz, 2012). | 71 |

NOMENCLATURA

| | |
|---------------------------|---|
| A | Adenina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNmt | Ácido desoxirribonucleico mitocondrial |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| C | Citosina |
| cM | Centimorgan |
| dNTPs | Dinucleótidos |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| G | Guanina |
| GenBank | Banco Genético |
| mA | Miliamperio |
| MgCl₂ | Cloruro de magnesio |
| nt | Nucleótido |
| NaOAc | Acetato de Sodio |
| Na₄EDTA | Edetato sódico |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa <i>(Polymerase Chain Reaction)</i> |
| Pb | Pares de bases |
| T | Timina |
| TAE | Tris Acetatos EDTA |
| V | Voltio |
| (1) x g | (1) Gravedad |

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

A través del tiempo el cuy (*Cavia porcellus*) ha tomado gran importancia a nivel mundial. Se lo ha empleado principalmente en la alimentación y en rituales religiosos en países como Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia, de donde es originario (Chauca 1999), y con otros usos en diversos países, por lo que esta especie se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial.

La población de cuyes en la región andina es de alrededor de 35 millones de individuos, siendo Perú el país que registra el mayor nivel de consumo y de producción anual, valorada en 16.500 TM de carne (Chauca 1999). En el Ecuador la población de cuyes registrada para el año 2000 por el III Censo Agropecuario, superó los 5 millones de cabezas, además se calcula que aproximadamente 13 millones de cabezas son consumidas anualmente en el país correspondientes a 25.590 TM permitiendo un consumo per cápita de 1,41 Kg al mes o 16,90 Kg anuales, que dan un promedio de 8 cuyes por persona al año en las zonas rurales (Robayo 2008).

En su afán por satisfacer la creciente demanda de carne de cuy en los últimos años, a lo largo de la sierra ecuatoriana, se han instalado grandes y medianos criaderos; la mayoría de estos han asumido un sistema de crianza

y manejo semi-tecnificado en el que todavía se observan animales del tipo criollo donde los cruces indiscriminados con animales mejorados han logrado satisfacer un pequeño porcentaje de la demanda pero han provocado cierta deficiencia en la expresión de caracteres productivos (Vásconez y Vásconez 2003).

En el criadero de cuyes de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, al igual que en la mayoría de centros productivos del país, los cruces se han guiado siempre por líneas, y en épocas de escases de reproductores, se ha cruzado en forma aleatoria sin tomar en cuenta registros ni características morfológicas de relevancia para el productor (Falconí Patricia; comunicación personal).

A pesar de que inicialmente se había trabajado con estándares morfológicos para la aplicación de técnicas de selección, cruzamientos, consanguinidad y manejo del medio ambiente para potencializar parámetros genéticos, fenotípicos y económicos (Chauca 1999), basarse en este tipo de caracteres no ha dado muy buenos resultados en programas de mejoramiento genético y productivo (Guzmán 2000). Por lo que en la última década del siglo XX, se ha realizado muchas investigaciones relacionadas con los parámetros productivos de las especies domésticas y su relación con la expresión de los genes.

Casos como el peso vivo y el rendimiento a la canal en especies dedicadas a la producción de carne como los cuyes, han sido evaluados a través de

registros sobre el desempeño del animal y de los progenitores, permitiendo seleccionar animales con las mejores características productivas (Solarte y Rosero 2008).

Razón por la cual, en los últimos años se ha decidido aplicar otro tipo de metodologías como el uso de marcadores moleculares con el fin de alcanzar mayor eficiencia en los programas de selección. Con base en la genómica, ha sido posible identificar en el genoma de cualquier especie, secuencias de ADN relacionadas con caracteres productivos, reproductivos y de salud; mecanismo que ayudarán al progreso genético de las especies y a maximizar la productividad animal (Solarte y Rosero 2008).

La aplicación de marcadores moleculares para estimar la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones es una técnica eficaz. En el caso de *Cavia porcellus*, no existen reportes referentes al uso de estas técnicas a nivel nacional. En su mayoría los estudios que emplean marcadores moleculares han sido aplicados a especies vegetales y pocos han estudiado partes puntuales del genoma, como es el caso del citocromo b, en especies animales.

El presente estudio filogenético permitió determinar el origen de las tres líneas de cuyes mayoritariamente explotadas a nivel nacional, Perú, Andina e Inti; y asociar sus características morfológicas con patrones genotípicos, de tal forma que los animales de mejores características serán empleados como base para un futuro programa de Mejoramiento Genético para el

Proyecto de Producción de cuyes de la Carrera de Ciencias Agropecuarias – IASA. De igual forma esta investigación ayudó a identificar el nivel de endogamia presente en cada línea con el fin de reducir la consanguinidad en futuros cruzamientos.

Se espera que la técnica aplicada para esta investigación sea difundida y aplicada en diferentes criaderos a nivel nacional de tal manera que sirva de ejemplo para fomentar la crianza tecnificada de cuyes, mejorar la calidad del producto y contribuir a la seguridad alimentaria especialmente de las familias que se benefician económicamente de la crianza de esta especie.

Así también se espera que este proyecto contribuya para la conservación de los recursos genéticos y para el mejoramiento de las poblaciones de cuyes en el país.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General

Establecer relaciones morfológicas y moleculares en las líneas de cuyes Perú, Andina e Inti que sirvan como base para un futuro programa de mejoramiento genético en el Proyecto de Especies Menores de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria.

1.2.2 Específicos

- Identificar caracteres morfológicos, específicos para cada línea, que permitan la selección de especímenes para mejoramiento genético.
- Caracterizar molecularmente tres líneas de cuyes mejorados a través del gen mitocondrial para citocromo b y estimar posibles relaciones con especies silvestres que se encuentran registradas en el GenBank.
- Establecer el grado de asociación o de variabilidad genética de las líneas de producción con el fin de conocer el nivel de endogamia dentro de cada línea.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL CUY (CAVIA PORCELLUS)

Diversos historiadores señalan que el cuy (*Cavia porcellus*) es originario de Sudamérica y que antes de la llegada de los españoles este mamífero roedor ya había sido domesticado (Solarte *et al.* 2007).

2.1.1 Origen y Distribución

El cuy, cobayo, curi o conejillo de indias es originario de la zona andina de los países de Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú. Se encuentra distribuido a lo largo de la cordillera de los Andes en los países de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, noreste de Argentina y el norte de Chile, bajo los 4500 msnm hasta las costas y la región oriental (Chauca 1997).

El hábitat del cuy silvestre es más extenso, va desde América Central hasta el sur de Brasil, Uruguay y Paraguay. En Argentina se han encontrado tres especies. La especie *Cavia aperea tschudii* se distribuye entre Argentina, Perú y Bolivia. La especie *Cavia aperea aperea* va desde el sur de Brasil hasta el noreste de Argentina, y la especie doméstica *Cavia porcellus*, se distribuye en Guayana, Venezuela, Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia (Chauca 1999; figura 2.1).

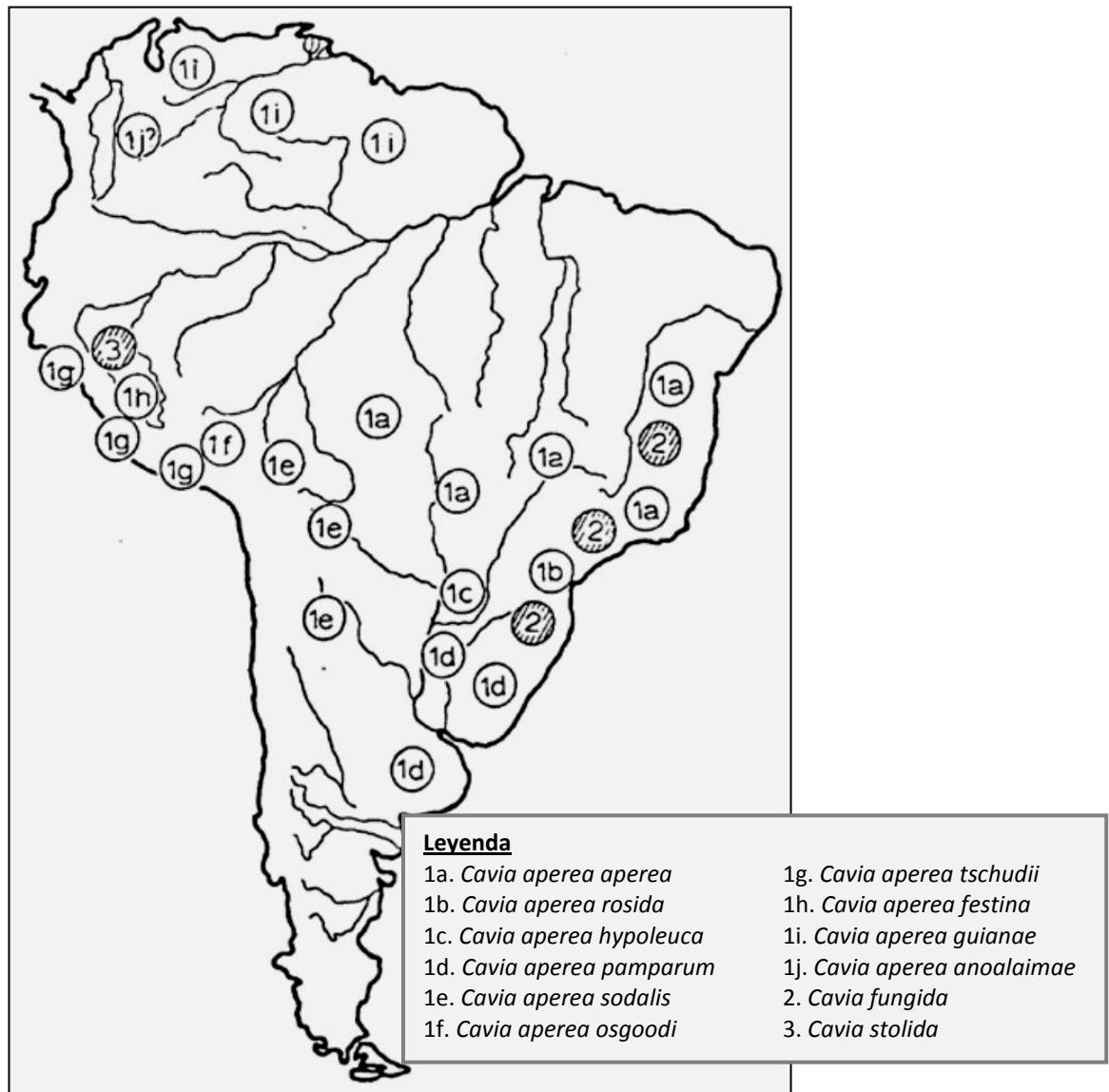


Figura. 2.1. Distribución del genero *Cavia* en América del Sur (Huckinghaus 1961, citado por Chauca, 2007).

2.1.2 Descripción Taxonómica y Morfológica

En la escala zoológica el cuy doméstico se ubica en la siguiente clasificación (tabla 2.1):

Tabla. 2.1. Clasificación zoológica del cuy doméstico.

| | |
|----------|-----------------|
| REINO | Animal |
| CLASE | Mammalia |
| SUBCLASE | Placentalia |
| ORDEN | Rodentia |
| SUBORDEN | Hystricomorpha |
| FAMILIA | Cavidae |
| GÉNERO | Cavia |
| ESPECIE | Cavia porcellus |

Fuente: Chauca, 1997; Esquivel, 1994.

El cuy doméstico, *Cavia porcellus* presenta un cuerpo de forma alargada y cubierto de pelos desde el nacimiento. Presenta una cabeza relativamente grande en relación al cuerpo, de forma cónica y de longitud variable de acuerdo al tipo de animal con orejas caídas por lo general, o paradas cuando son más pequeñas, están bastante irrigadas pero carecen de pelo. Los ojos son redondos de color negro o rojo. El hocico es cónico, con fosas nasales y ollares pequeños, el labio superior partido, labio inferior entero, sus incisivos son alargados con curvatura hacia dentro, crecen continuamente y no poseen caninos pero sí amplios molares. Presentan la siguiente fórmula dentaria:

$$I (1/1), C (0/0), PM (1/1), M (3/3) = \text{Total } 20$$

El cuello es grueso, musculoso, bien implantado al cuerpo, formado de siete vértebras, el atlas y el axis están bien desarrollados. El tronco tiene forma cilíndrica y está formado por 13 vértebras dorsales. Las primeras diez se unen a un par de costillas, las mismas que a su vez se sujetan al esternón, las 3 últimas son flotantes (Chauca 1997).

El abdomen es la parte de mayor volumen y capacidad del animal, que tiene como base anatómica a 7 vértebras lumbares. Las extremidades son cortas, las anteriores un poco más que las posteriores. Ambos miembros terminan en dedos provistos de uñas. El número de dedos varía desde 3 para los miembros posteriores y 4 para los anteriores. Siempre el número de dedos en las manos es igual o mayor que en las patas (Chauca 1997).

2.1.3 Caracteres morfológicos de cada línea

Según Guzmán (2000); los cuyes tipo C, 1.1, 1.2 y 1.3, caracterizan morfológicamente a las líneas Andina, Inti y Perú, respectivamente.

2.1.3.1 Descripción fenotípica de la línea Andina

Cuy clasificado como de pelaje simple o tipo 1, de pelo delgado, color blanco, cuyo valor en la tabla de colores le corresponde al 0 (White). Presenta ojos color negro, carece de dedos supernumerarios (Guzmán 2000), por lo general tienen cabeza mediana y en su mayoría no presentan remolino en la cabeza (Chauca, *et al* 2005; tabla 2.2).

2.1.3.2 Descripción fenotípica de la línea Inti

Cuy de color simple, bayo, o bayo con blanco; ubicado en la tabla de colores como 121D, 139 y 36 (Pale pinkish buff, true cinnamon and amber). Corpulento, con aptitudes para carne, presencia de dedos extras, ojos siempre de color negro. Pelo grueso y piel sin pigmentación (Chauca, *et al* 2005; Guzmán 2000; tabla 2.3).

Tabla. 2.2. Medidas morfométricas correspondientes a cuyes de la línea Andina, tomadas a los 3 meses de edad.

| LÍNEA ANDINA | |
|-------------------------------|----------|
| LARGO TOTAL | 289,0 mm |
| LARGO DEL CUERPO | 281,0 mm |
| LARGO RUDIMENTO CAUDAL | 8,0 mm |
| LARGO OREJA | 33,7 mm |
| LARGO PATA | 50,0 mm |
| LARGO CABEZA | 62,5 mm |
| ANCHO CABEZA | 26,0 mm |
| PESO | 600 g |

Fuente: Guzmán, 2000.

Tabla. 2.3. Medidas morfométricas correspondientes a cuyes de la línea Inti, tomadas a los 3 meses de edad.

| LÍNEA INTI | |
|-------------------------------|----------|
| LARGO TOTAL | 270,0 mm |
| LARGO DEL CUERPO | 263,8 mm |
| LARGO RUDIMENTO CAUDAL | 6,2 mm |
| LARGO OREJA | 34,0 mm |
| LARGO PATA | 45,0 mm |
| LARGO CABEZA | 62,5 mm |
| ANCHO CABEZA | 29,0 mm |
| PESO | 600 g |

Fuente: Guzmán, 2000.

2.1.3.3 Descripción fenotípica de la línea Perú

Es un cuy de pelaje simple conocido como alazán o rojizo cuya numeración en la tabla de colores corresponde a 240 y 340 (Kingfisher rufous y robin rufous), presenta pelo grueso, cuerpo brevilineo, compacto,

apto y preferido para la producción. Es de ojos negros, tranquilo, y presenta dedos extras en sus extremidades posteriores (Guzmán 2000; tabla 2.4).

Tabla. 2.4. Medidas morfométricas correspondientes a cuyes de la línea Perú, tomadas a los 3 meses de edad (Guzmán 2000).

| LÍNEA PERÚ | |
|-------------------------------|----------|
| LARGO TOTAL | 270,0 mm |
| LARGO DEL CUERPO | 263,4 mm |
| LARGO RUDIMENTO CAUDAL | 6,6 mm |
| LARGO OREJA | 32,0 mm |
| LARGO PATA | 46,5 mm |
| LARGO CABEZA | 64,0 mm |
| ANCHO CABEZA | 30,0 mm |
| PESO | 600 g |

Fuente: Guzmán, 2000.

2.1.4 Efectos de la Consanguinidad en Cuyes

Una práctica de mejoramiento incontrolado, no planificada de manera integral puede terminar en el uso indiscriminado de reproductores provocando de manera inevitable el incremento de la consanguinidad y pérdida o disminución en la expresión de los índices productivos y reproductivos (Mantilla 2009), consecuentemente la generación de abortos y una mayor susceptibilidad al contagio de enfermedades (Falconí Patricia; comunicación personal), así como también la degeneración de la especie reflejada en anomalías de carácter fenotípico como enanismo o polidactilia, características que reducen la calidad del animal productor de carne.

2.1.5 Genética del Cuy (*Cavia porcellus* L.)

En el Ecuador, como en otros países Andinos; se conocen básicamente dos genotipos de cuyes, el criollo y el mejorado. El cuy criollo se caracteriza por su rusticidad y tamaño pequeño pero que al ser cruzado con cuyes mejorados puede optimizar su rendimiento productivo. El cuy mejorado es el resultado de un proceso de selección del cuy criollo por lo que ha ganado precocidad y adaptación a sistemas de producción intensivos (Chauca, 1997).

Según algunos análisis citogenéticos se demuestra que el Género *Cavia* se caracteriza por un número diploide de 64 cromosomas ($2n=64$) asociados en 4 grupos según su forma y tamaño (Guzmán 2000).

2.2 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Los diferentes estudios han determinado que para entender las funciones metabólicas es necesario amplificar pequeñas regiones del ADN y del ARN, o detectar la presencia de ARNm, lo que permitirá detectar la expresión de diferentes genes que cumplen funciones específicas en procesos físicos y biológicos (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

2.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de los ácidos nucleicos es necesario separarlos de las células que los contengan a través de distintos pasos.

Lisis. Consiste en liberar al ADN del interior de la célula utilizando diversos buffers. Los kits comerciales emplean diferentes agentes químicos para este proceso, algunos de los cuales son detergentes, otras son las moléculas quelatantes, que desestabilizan la membrana celular e inhiben la presencia de ADNasas a través de la eliminación de cationes dentro de la solución. También es necesaria la aplicación de enzimas como la Proteinasa K, Proteasa OB o RNasa A para la degradación de proteínas y enzimas, y un agente que establezca el pH de la solución (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Las sales cumplen la función de evitar la degradación de los ácidos nucleicos mediante la formación de una capa iónica suave que protege al ADN durante la lisis. Durante este proceso es necesario incubar las muestras a temperaturas entre 50 y 70 °C con agitaciones frecuentes, de tal manera que se promueva la ruptura de los lípidos de la membrana celular facilitando la liberación del ADN de la estructura celular (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Eliminación de proteínas. Se logra con la aplicación de alcoholes como fenol, etanol absoluto e incluso cloroformo; se homogeniza la mezcla y se centrifuga para poder colectar el sobrenadante clarificado libre de proteínas, de esta manera se limpia la muestra del exceso de lípidos (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Lavado. Se realiza varios lavados con sales y buffers reconstituidos con etanol, lo que obliga al ADN que está cargado negativamente a obtener

una capa iónica positiva que facilite su precipitación. Al efectuar el último lavado se eliminan el exceso de sales que recubren el ADN y las soluciones acuosas que quedaron de los otros buffers (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Secado. Por medio de centrifugación se consigue eliminar las sales restantes y el exceso de alcohol que se consigue con cada lavado (Eguiarte, *et al* 200 Eguiarte, *et al.* Comps. 20077).

Recolección de ADN. Finalmente se somete la muestra a centrifugación con un buffer eluyente que ayuda a recoger los ácidos nucleicos.

2.2.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La técnica PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*), detecta pequeños fragmentos de ADN y multiplica geométricamente regiones específicas de ADN blanco a través de ciclos sucesivos de síntesis (Rosales 2002).

La síntesis de ADN en una reacción PCR requiere varios componentes que permitan simular dicho proceso que originalmente sucede en la célula (Rosales 2002). Los componentes de reacción de la PCR son el ADN “blanco” que contiene la fracción en estudio, la *taq* polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*, los oligonucleótidos llamados también primers, cebadores o iniciadores, los dinucleótidos o dNTPs, y algunos

agentes químicos que ayuden a mantener las condiciones necesarias para la reacción como el Buffer 10X y el $MgCl_2$ (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

La técnica PCR tiene algunas variaciones según el tipo de investigación que se realice, algunas de estas técnicas son los RAPDs, AFLPs, ISSRs, ITSs, etc. Por ejemplo; si se conoce el fragmento específico que se desea estudiar, como el gen 16S; la técnica consistirá en utilizar primers para esa secuencia y se amplificarán únicamente los fragmentos conocidos. Con esta técnica es posible detectar cambios de una sola base dentro de la secuencia (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

En el genoma hay algunas zonas hipervariables que pueden amplificarse con esta técnica, como los llamados microsatélites, que son los sitios donde se inicia la síntesis de ADN dentro de los cromosomas. Esta técnica se utiliza además para determinar polimorfismos genómicos que pueden observarse fácilmente en un gel de agarosa (Eguiarte, *et al.* 2007).

Para la amplificación de las secuencias a través de la técnica PCR es necesario seguir un proceso térmico que consiste en tres etapas, las mismas que se llevan a cabo dentro de un termociclador.

Desnaturalización. Consiste en la disociación de la doble hebra de ADN a través del incremento de temperatura que puede subir hasta alcanzar los 90 a 95°C (Rosales 2002; figura 2.2).

Alineamiento o hibridación de cebadores. La temperatura del termociclador baja rápidamente oscilando entre los 30 y 60 °C, dependiendo del tamaño y la secuencia del primer. A esta temperatura se forman y se rompen los puentes de hidrógeno del ADN y de los primers hasta que estos queden alineados en una región de doble cadena (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007, Rosales 2002). A continuación la polimerasa se une a esta región y empieza a copiar bases en el sentido 5` - 3` permitiendo estabilizar la unión entre los puentes del primer con el ADN y las nuevas bases (figura 2.2).

Extensión. La temperatura sube hasta alcanzar los 72 °C provocando la actividad máxima de la polimerasa al incorporar más nucleótidos sintetizados de acuerdo a la secuencia presente en el ADN blanco (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007; Rosales 2002; figura 2.2).

Finalmente, el resultado de la PCR corresponde a una copia de hebra doble del ADN blanco, cada copia puede ser amplificada millones de veces. Posteriormente los productos de la PCR son visualizados por medio de una electroforesis para determinar si el ADN blanco fue amplificado (Rosales 2002).

Es importante considerar que antes de iniciar los ciclos del proceso térmico se debe precalentar las muestras por varios minutos a 95 °C para favorecer el inicio de la desnaturalización, y al finalizar los ciclos se debe mantener al menos unos 30 segundos a 75 °C para permitir que la polimerasa sintetice

aquellos fragmentos que quedaron incompletos (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

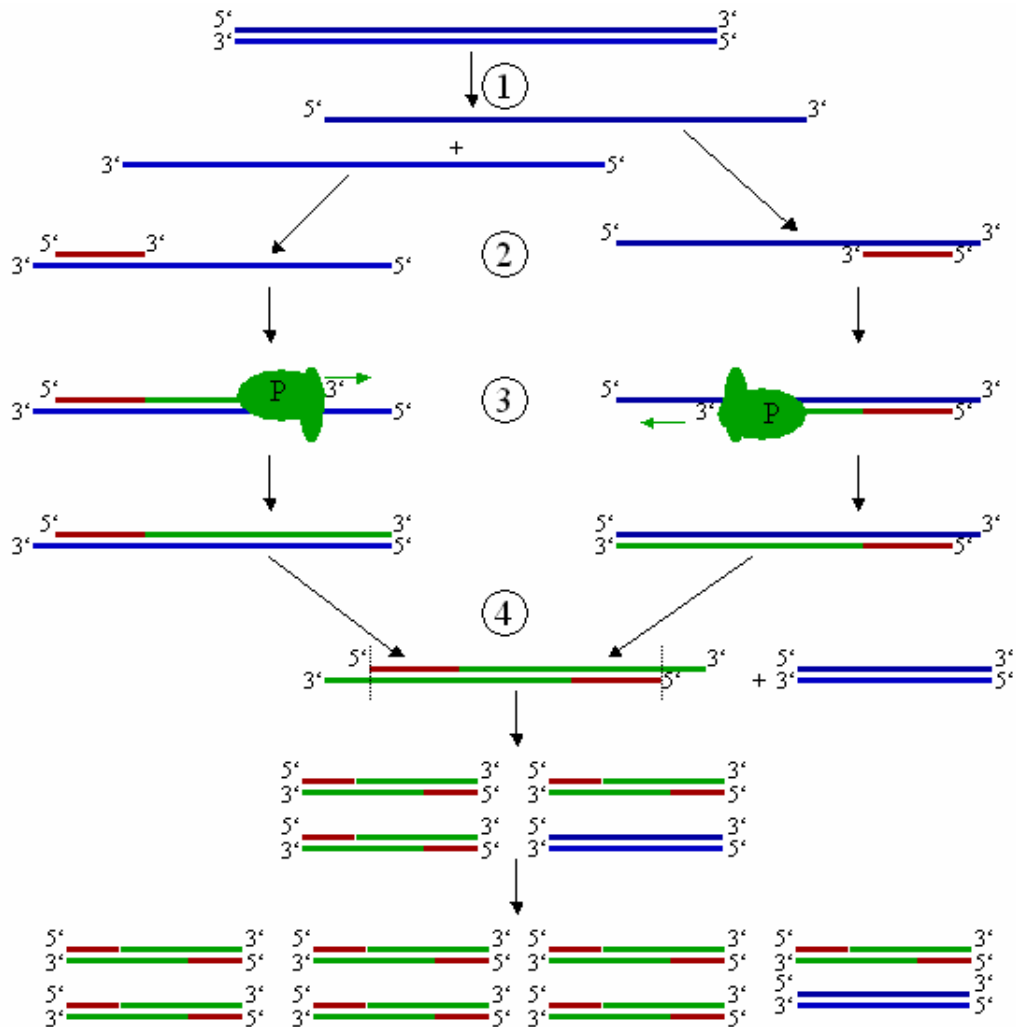


Figura. 2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa¹ (Rosales 2002).

2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica que ayuda a visualizar los fragmentos obtenidos en la PCR separándolos de acuerdo al tamaño y al peso de los

¹ 1) Desnaturalización. 2) Alineamiento. 3) Extensión de la hebra de ADN. 4) Doble hebras de ADN amplificadas

mismos. La agarosa, al igual que la poliacrilamida, constituyen un medio poroso por el cual los fragmentos de ADN pasan atraídos por la corriente eléctrica, desde el polo negativo debido a la presencia de grupos fosfato (P^-), al polo positivo (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Los fragmentos pequeños pasan más rápido que los fragmentos grandes, los cuales se van atrapando entre los poros del gel, de tal manera que si hay varios fragmentos del mismo tamaño se agruparán en un solo lugar formando lo que se conocen como bandas (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Los geles de acrilamida están constituidos por moléculas más uniformes dando lugar a poros más homogéneos, por lo que son recomendados para la visualización de fragmentos muy pequeños. Los geles de agarosa forman redes menos homogéneas pero permiten la visualización de moléculas de ADN en bandas separadas (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Para realizar la electroforesis en gel de agarosa se requiere de una fuente de poder y una cámara electroforética en la que se debe aplicar el buffer de corrida que puede ser un TBE (Tris Boratos EDTA) o un TAE (Tris Acetatos EDTA), cuya función es la de facilitar la migración de los fragmentos de ADN a través del gel (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

La tinción del gel de agarosa se realiza con bromuro de etidio, una molécula que brilla con luz UV y se intercala con las bases de ADN para facilitar su visualización. La tinción del gel puede hacerse colocando el bromuro de

etidio directamente en el buffer con agarosa antes de su gelificación o después de la corrida sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio.

En el primer caso se agregan 0,5 µg de bromuro de etidio por mL de gel, y en el segundo, la solución de bromuro de etidio debe contener la misma concentración por mL del buffer que se empleará para sumergir el gel durante 30 a 40 minutos. La visualización se realiza con un transiluminador con luz UV y una cámara fotográfica (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

2.2.4 Secuenciación

La secuenciación es una técnica que puede ser ejecutada de diferentes maneras, cuyo objetivo es el de analizar detalladamente un fragmento de ácidos nucleicos que permita establecer diferencias y similitudes entre individuos (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

Existen tres técnicas para la secuenciación, la enzimática, la química y la automática. La técnica enzimática de Fred Sanger sugiere la síntesis *in vitro* del ADN analizado con la ayuda de una polimerasa y una réplica del ADN que iniciará la secuencia. La clave para este método está en la adición de trifosfato de dideoxirribonucleósido (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), el cual carece del radical 3 – OH de tal manera que al entrar en la cadena se bloquea la adición de otro nucleótido. Los fragmentos sintetizados llegan a formar una escalera de nucleótidos que pueden ser detectados por electroforesis (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

La técnica química desarrollada por Alan Maxam y Walter Gilbert hace uso de agentes químicos que rompen el ADN específicamente en cada base tratando de reducir al máximo cualquier daño que se pueda producir a la cadena. Finalmente las bases pueden ser observadas por electroforesis y tinturadas con radiactividad (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

La secuenciación automática (figura 2.3) parte de la reacción enzimática pero emplea una emisión fluorescente que detecta las bases mediante un láser, las señales son transmitidas a un software el cual interpreta y codifica cada nucleótido (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

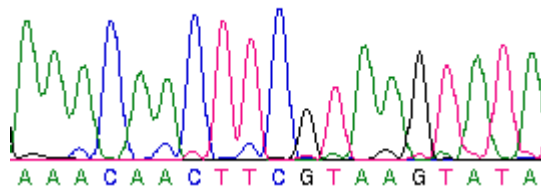


Figura. 2.3. Parte de una secuencia de ADN producida por un secuenciador automatizado.

2.3 HERRAMIENTAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

En todas las poblaciones, los organismos presentan pequeñas variaciones en su genoma que pueden estar ocultas o manifestarse en su fenotipo. Este tipo de variaciones son empleadas por los investigadores para estudios de relaciones filogenéticas dada la presencia de genes, como los

ribosomales y mitocondriales que proveen información sobre variabilidad (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007, Vargas 2005).

La variabilidad genética o polimorfismo se debe a que cada individuo es afectado en forma diferente en su interacción con el medio ambiente y sufre pequeñas alteraciones o mutaciones en los componentes básicos del ADN. Dichos cambios se dan por sustituciones, inserciones o eliminaciones de nucleótidos en la cadena de ADN, además de otros procesos más complejos como la inversión y el rearrreglo de segmentos (Vargas 2005).

El número y grado de cambios en la secuencia del ADN definen la variabilidad genética dentro de las especies y permiten identificar a los organismos de una población específica, de distintas localidades o a especies semejantes (Vargas 2005).

2.3.1 Marcadores Moleculares

Vargas (2005), define a los marcadores moleculares como regiones del ADN que presentan variación en su secuencia sin que, necesariamente, se aprecien cambios sustanciales en las funciones del organismo.

El uso de marcadores moleculares es una herramienta que permite asociar el origen del animal con sus características y comportamiento, certificar el establecimiento de una nueva línea, raza, cepa o variedad, y localizar o aislar genes de interés (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007, Vargas 2005).

Los marcadores moleculares pueden aplicarse a partir de los primeros estadios de vida de cualquier especie, lo que reduce el tiempo en la generación de resultados para un programa de mejoramiento genético. Por ello son consideradas como herramientas útiles en dichos programas ya que, son capaces de predecir la presencia de los caracteres deseados en el animal, aún cuando no puedan observarse fácilmente (Vargas 2005).

La detección de marcadores moleculares puede realizarse sobre cualquier tipo de tejido animal y los datos obtenidos proveen información altamente confiable y útil para el estudio de genomas, características del ADN, transmisión de caracteres, distancias filogenéticas, etc. (Solarte y Rosero 2008).

El nivel de información, la facilidad y el costo de los marcadores depende del tipo de marcador que se desea utilizar pero en general, los marcadores se diferencian por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples, por lo que son de tipo dominante o co-dominante (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007). Se dice que proveen mayor información aquellos marcadores que tienen más alelos y poseen un tipo de herencia codominante, aunque eso depende únicamente del alcance de la investigación (Solarte y Rosero 2008).

2.3.2 ADN Mitocondrial (ADNmt)

El ADNmt es una molécula circular de doble cadena, una más pesada que la otra debido a la presencia desequilibrada de bases nitrogenadas. Éste

ADN contiene información para la síntesis de una gran cantidad de componentes mitocondriales como ARNt, ARNr, polipéptidos que constituyen las enzimas citocromo-oxidasas, NADH-deshidrogenasa, ATPasas y otros, que se codifican en el núcleo pero luego se integran a las mitocondrias.

Algunos de estos componentes son: ADN-polimerasa, necesaria para la replicación del ADNmt; ARN-polimerasa que interviene en la transcripción; proteínas ribosomales, para la formación de los ribosomas mitocondriales, y algunas otras subunidades peptídicas para la integración de las enzimas citocromo-oxidasas, NADH-deshidrogenasa, y ATPasas (Quaring 2003).

El ADN mitocondrial en el caso de los animales superiores carece de intrones (secuencias altamente variables) pero se transcribe como ARN poligénico antecedido por ADN monogénico, cuya traducción es esencial en el desarrollo de historias filogenéticas y de estructura poblacional genética relacionada con linaje debido al tipo de herencia uniparental y no recombinante (Eguiarte, *et al.* Comps. 2007).

2.3.2.1 Citocromo b

De los genes mitocondriales codificadores de proteínas, el citocromo b ha sido el más extensamente estudiado después de que algunos investigadores identificaron una secuencia única de “cebadores universales” que pueden ser usados para amplificar porciones de este gen en diferentes

especies de animales, como reptiles y mamíferos. En roedores, la longitud de este gen es de aproximadamente 1140 nt (Guevara 2004).

El citocromo b que interviene en los procesos de generación de energía formando parte del complejo III conocido como complejo citocromo bc1, mecanismo elemental en el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria (Ochoa, *et al.* 2008), ha sido considerado uno de los genes más útiles para los trabajos filogenéticos (Guevara 2004).

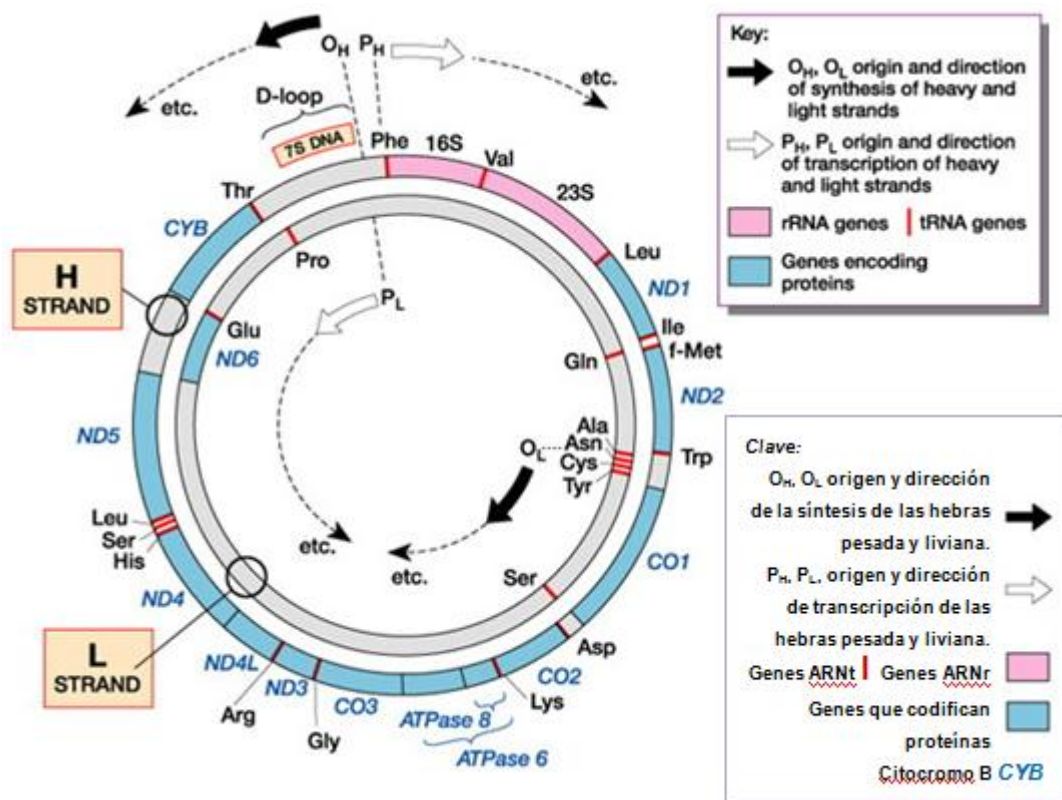


Figura. 2.4. Estructura del ADN mitocondrial humano (Meneses, 2010).

2.3.3 Polimorfismos

Cuando un *locus* tiene variantes alélicas a frecuencias demasiado altas se dice que es un *locus polimórfico* y que la población exhibe polimorfismo para ese *locus* específico. En forma práctica un *locus* es polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es menor que 0,99; caso contrario es un *locus monomórfico* que corresponde a individuos homocigóticos para un alelo. El polimorfismo es la fuente de variación de los caracteres cuantitativos (Falconer y Mackay 2006)

2.3.4 Endogamia o Consanguinidad

La consanguinidad se define como un sistema de apareamiento en el cual los progenitores tienen parentesco más cercano que el de la población de la que provienen. Los efectos perjudiciales de la consanguinidad se registran principalmente sobre la tasa reproductiva y el vigor, y fenotípicamente sobre el apareamiento de defectos genéticos (Lasley 1987).

El coeficiente de consanguinidad de un individuo se refiere a la probabilidad de que dos genes que están presentes en un locus de un individuo sean idénticos por causa de la descendencia (Nicholas 1990).

2.4 SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

También conocida como sistemática cladística o cladismo, tiene su origen en 1950 en base a estudios desarrollados por el científico Willi Hennig. El objetivo del cladismo es generar una hipótesis “comprobable” de

las relaciones genealógicas entre grupos monofiléticos de organismos (López y Pérez 1999), es decir; entre organismos que compartan ciertos caracteres heredados o sinapomorfias (Guevara 2004).

El dendrograma llamado también cladograma o árbol filogenético, es una herramienta usada para mostrar la genealogía, es decir; la relación ancestral – descendiente, de forma tal que sea posible explicar las relaciones filogenéticas observadas entre diferentes organismos (López y Pérez 1999).

Hennig propuso una idea para determinar si los caracteres evaluados corresponden a caracteres avanzados o a primitivos mediante la técnica del out-group o grupo externo. De tal manera que si se desean analizar caracteres en los miembros de un grupo monofilético, se deben buscar los homólogos a estos en su grupo hermano. Al presentarse los homólogos se podrá deducir que los caracteres del grupo monofilético son de origen primitivo o plesiomórfico, de lo contrario; serán únicamente caracteres avanzados (apomórficos) correspondientes al mismo grupo monofilético (Guevara 2004).

2.4.1 Máxima Parsimonia

En un contexto general, parsimonia quiere decir simplicidad, por lo que aplicado a la sistemática filogenética se refiere a la elección del cladograma o árbol genealógico que explique la filogenia de un grupo con el menor número de cambios evolutivos (González 2007), es decir, de los que están más estrechamente relacionados.

Bajo el criterio de parsimonia se puede reconocer sitios o caracteres que contribuyen a decidir cuál será el origen más cercano, estos sitios son considerados como filogenéticamente informativos y presentan más de dos secuencias aparentemente iguales u homólogas (González 2007).

METODOLOGÍA

3.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

3.1.1 Ubicación Política

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de control biológico de la Carrera de Ciencias Agropecuarias de la ESPE, localizadas en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, dentro de la Hacienda “El Prado”.

3.1.2 Ubicación Geográfica

La hacienda “El Prado” se encuentra a una altitud de 2748 msnm, latitud de 0° 23′ 28.29″ S y longitud de 78° 24′ 48.72″ O (Estación meteorológica del IASA, 2009).

3.1.3 Ubicación Ecológica

La ubicación ecológica corresponde a una zona de vida de bosque húmedo pre montano, con una temperatura que varía entre 20.06 °C a 8.08 °C, y un promedio de 16.35 °C. La precipitación es de 1200 mm por año (Estación meteorológica del IASA, 2009).

3.2 MATERIALES

3.2.1 Materiales de campo

3.2.1.1 Especímenes

Se analizaron 7 cuyes machos de la línea Perú, 7 de la línea Andina y 7 de la Inti, dando como resultado un total de 21 animales. Además se tuvo la oportunidad de evaluar un reproductor de la Línea Inka (anexo 1). Las medidas morfométricas de cada individuo fueron tomadas con una cinta métrica y un calibrador pie de rey.

3.2.1.2 Muestras de tejido

Inicialmente se probó la extracción de ADN a partir de pelos y folículos pilosos sin obtener resultados positivos en cuanto a calidad y cantidad de ADN por lo que se decidió emplear una muestra de tejido.

Se tomaron entre 25 a 30 mg de tejido conectivo de orejas; es decir, entre 3 y 4 discos de 3 mm de diámetro tomados con una perforadora manual de un solo hueco. Además se utilizó una balanza electrónica, alcohol, lidocaína en crema y eterol para la toma de muestras.

3.2.2 Materiales de laboratorio

3.2.2.1 Materiales y equipos

En el laboratorio se emplearon tubos eppendorf, micropipetas, puntas estériles para micropipeta, gradillas, cristalería, micro centrifuga, termociclador Techne TC-3000, equipo de electroforesis en gel de agarosa horizontal, transiluminador (CS Clever scientific Ltd CSL-Microdoc), vortex, balanza digital, baño maría, congelador, termo, cámara de flujo laminar, guantes y mascarillas.

3.2.2.2 Enzimas y reactivos

Se utilizó alcohol antiséptico, agua destilada, agua desionizada o molecular, etanol absoluto, etanol al 96%, kit para extracción de ADN de tejido animal de Omega Biotek, *Taq* DNA polimerasa, RNAsa A, primers para citocromo b (Invitrogen), agarosa ultrapura, bromuro de metilo, blue juice, marcadores de ADN de 100pb y 1Kb, buffers TAE 10X y 1X, Buffer 10X para PCR, MgCl₂, dNTPs.





3.3 MÉTODOS

3.3.1 Caracterización morfológica

Se seleccionaron animales con características fenotípicas contrastantes o discriminantes como el color del pelo, de los ojos, de las orejas y número de dedos en las patas anteriores y posteriores.

Los colores típicos para cada línea se registraron como blanco para la línea Andina, alazán (marrón) para la Perú y bayo para la línea Inti (Chauca *et al.* 2005; Guzmán 2000). Los colores, alazán y bayo se encontraron combinados únicamente con el color blanco (tabla 3.1).

Tabla. 3.1. Rango de colores para la característica fenotípica color de pelo.

| Línea | Color Típico | Rango de colores para todas las líneas | Imagen |
|--------|--------------|--|---|
| Andina | Blanco | 100% típico |  |
| Perú | Alazán | 75% típico, 25% otro |  |
| Inti | Bayo | 50% típico, 50% otro |  |
| Inti | Bayo | 25% típico, 75% otro |  |

Fuente: Díaz, 2012.

El color de los ojos se registró como negro o rojo, según se indica en la figura 3.1.

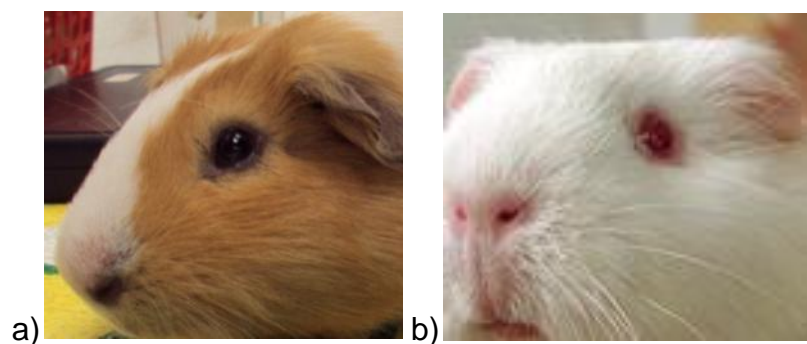






Figura. 3.1. Color de ojos. a) Negro. b) Rojo. (Díaz, 2012).

El color de las orejas fue registrado bajo los parámetros de la tabla 3.2, y el número de dedos se analizó bajo las categorías que muestra la tabla 3.3.

Tabla. 3.2. Rango de colores para la característica fenotípica color de orejas.

| Color | Detalle | Imagen |
|------------------|---|---|
| Negro | Ambas orejas de color negro |  |
| Rosado | Ambas orejas de color rosado |  |
| Combinado | Una oreja de color negro y la otra color rosado |  |
| Pintado | Una o ambas orejas con pintas de color negro o rosado |  |

Fuente: Díaz, 2011.

Tabla. 3.3. Categorías según el número de dedos

| Categoría | Número de dedos | |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| | Patatas anteriores | Patatas posteriores |
| Normal | 4 | 3 |
| Polidactilia parcial | 4 | > 3 |
| Polidactilia total | > 4 | > 3 |

Fuente: Díaz, 2012.

Utilizando registros se tomaron también las medidas zométricas establecidas para roedores que consideran Tirira (2007) y Guzmán (2000) (figura 3.3; anexo 2).

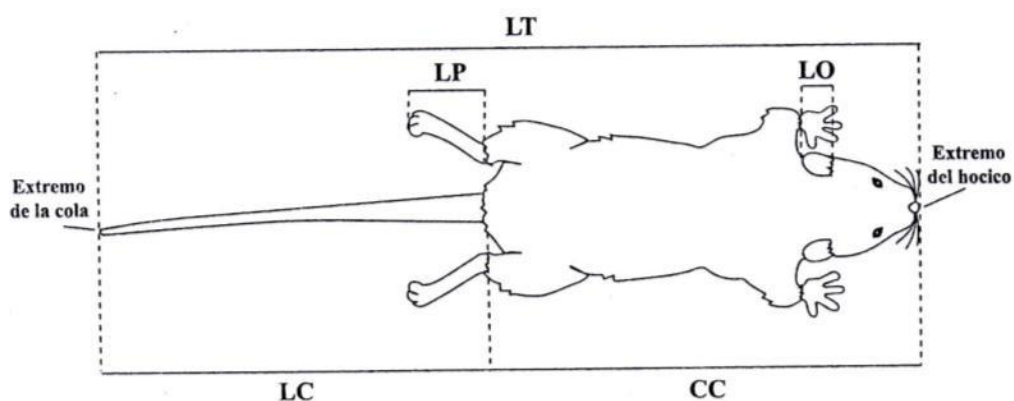


Figura. 3.2. Esquema y medidas tomadas en un ratón² (Tirira 2007).

Largo total (LT). Desde el extremo del hocico hasta la punta del rudimento caudal (figura 3.3).

Longitud cabeza-cuerpo (CC). Corresponde al largo del cuerpo desde el extremo del hocico hasta la base del rudimento caudal.

² LT. Largo total. CC. Largo de la cabeza y el cuerpo juntos. LC. Largo de la cola. LP. Largo de la pata posterior. LO. Largo de la oreja

Largo de la cola (LC). Desde la base hasta la punta del vestigio de cola o rudimento caudal.

Largo de la pata (LP). Desde el talón hasta la punta de las garras de la pata posterior (figuras 3.3 y 3.4).

Largo de la oreja (LO). Medida desde la base hasta el extremo más sobresaliente, tomada por la cara anterior (figuras 3.3 y 3.4).

Largo de la cabeza (Lca). Tomado desde el extremo del hocico hasta la altura del atlas en la nuca (figura 3.3).

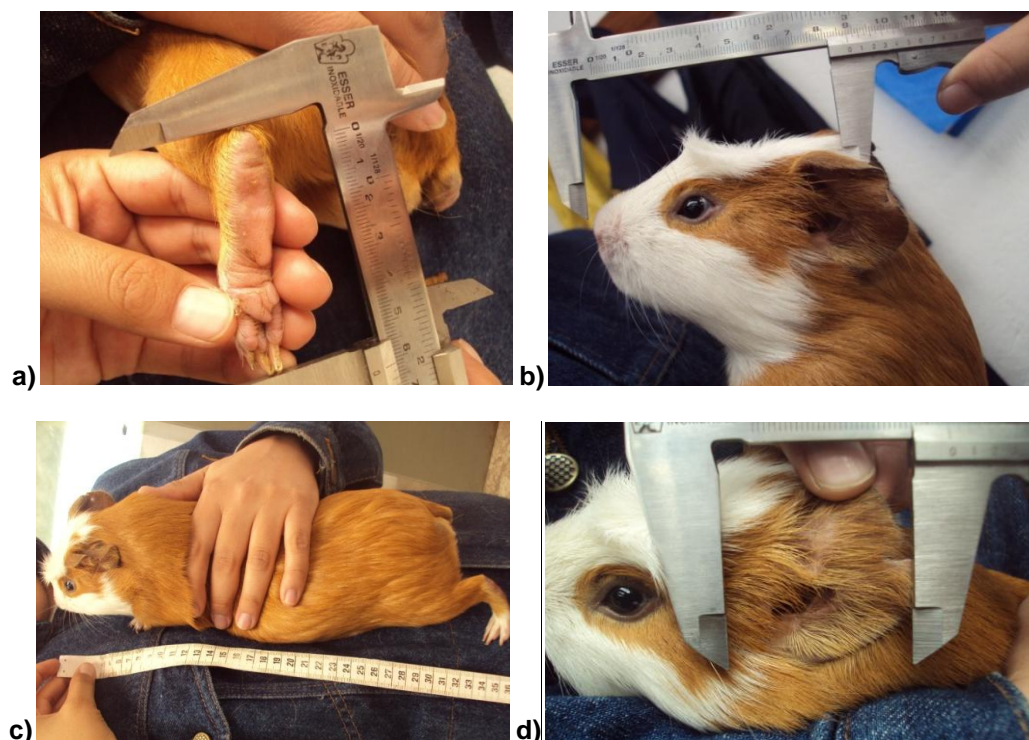


Figura. 3.3. Registro de medidas morfométricas³ (Díaz, 2012).

³ a) Largo de la pata (LP). b) Largo de la cabeza (Lca). c) Largo del cuerpo (LC). d) Largo de la oreja (LO).

Altura de la cabeza (Aca). Medido desde la base de la mandíbula hasta la parte más alta del cráneo a la altura de las orejas.

Largo del pelo (Lp). Corresponde a la medida de un pelo tomado de la nuca, desde la base del folículo hasta la punta.

Peso vivo (PV). Tomado en gramos con ayuda de una balanza digital cuando los animales han alcanzado la edad reproductiva.

3.3.2 Caracterización molecular

Las muestras de tejido se procesaron hasta obtener ADN y posteriormente producto PCR necesario para la identificación y secuenciación del gen citocromo b.

3.3.2.1 Colecta de tejido

Se recolectaron 2 discos de 3mm de diámetro de cada oreja de los diferentes individuos con ayuda de una perforadora manual previamente esterilizada y lavada con alcohol. Para la toma de muestras se aplicó una pequeña cantidad de lidocaína en crema a fin de minimizar el dolor al momento de perforar las orejas. Las muestras fueron tomadas en la parte más amplia del pabellón auricular cuidando de no afectar ningún vaso sanguíneo, una vez tomadas las muestras se aplicó eterol para evitar posibles infecciones (figura 3.4).

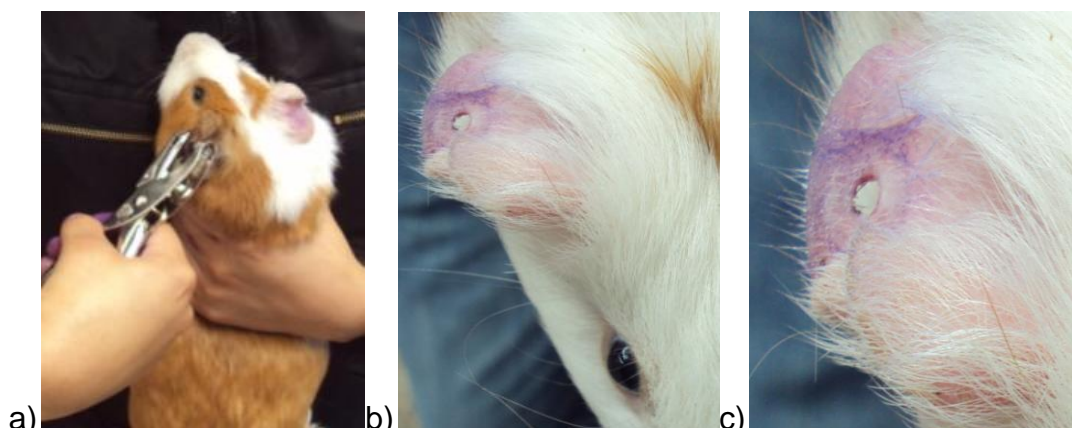


Figura. 3.4. Toma de muestras de tejido (Díaz, 2012).

3.3.2.2 Extracción de ADN

Las muestras fueron colectadas en tubos eppendorf de 1,5mL. Luego se lavaron con 300 μ L de agua destilada esteril, 300 μ L de jabón antibacterial y 150 μ L de alcohol antiséptico, agitando con un vortex por 30 segundos para eliminar la mayor cantidad de impurezas. Una vez lavadas las muestras se almacenaron a -20°C .

A continuación se realizó la extracción siguiendo el protocolo del kit E.Z.N.A Tissue DNA. Para ello se colocaron entre 20 a 30 mg de tejido animal previamente lavado en un tubo eppendorf esteril de 1,5 mL. Seguidamente se adicionaron 200 μ L de TL Buffer al tubo y 25 μ L de Proteasa OB reconstituida, se aplicó vortex durante 30 segundos y se incubaron las muestras en baño maría a 55°C durante 2 horas con agitaciones mediante vortex por 30 segundos cada 20 a 30 minutos.

Luego se colocaron 4 μL de RNasa A en las muestras, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos, y una vez terminado el proceso de centrifugación se aspiró el sobrenadante y se lo transfirió a otro tubo de 1,5mL.

Luego se añadió 220 μL de BL Buffer y se mezcló por inversión 10 veces. Se incubaron las muestras a 70 °C por 10 minutos, se adicionó 220 μL de etanol absoluto a la muestra y se mezcló nuevamente por inversión para condensar el ADN. Posteriormente se pasaron las muestras a una columna colocada dentro de un tubo eppendorf de 2 mL.

Se centrifugó las muestras a 10000 xg por 1 minuto, se descartó el filtrado y el tubo, y la columna se transfirió a otro tubo de 2mL. Se añadieron 500 μL de HB Buffer, se centrifugó nuevamente a 10000 xg durante 30 segundos y se descartó el filtrado y el tubo. En seguida se pasó la columna a otro tubo, y se agregó 700 μL de DNA Wash Buffer (previamente diluido en etanol). Luego se centrifugó a 10000 xg por 30 segundos, se descartó el filtrado y se conservó la columna en el mismo tubo.

Posteriormente se repitió el lavado con el DNA Wash Buffer. A continuación se volvió a centrifugar a 13000 xg las muestras durante 2 minutos para secar la columna. Finalmente se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1,5 mL, se agregaron 100 μL de Elution Buffer precalentado a 70 °C, se dejó reposar las muestras durante 2 minutos para luego centrifugarlas a 13000 xg por 1 minuto, de esta forma se obtuvo la fracción A que contenía gran

cantidad de impurezas por lo que fue necesario repetir el último paso dos veces más a fin de obtener las fracciones B y C que contenían ADN de mejor calidad.

3.3.2.3 Visualización y cuantificación del ADN

Para identificar la presencia de ADN después de seguido el protocolo de extracción se visualizó las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal al 0,8%.

Para esto se preparó primeramente el buffer TAE 10X utilizando 48,40 g de Tris Base; 4,10 g de NaOAc; 2,92 g de Na₄EDTA para 1000 mL de buffer TAE 10X, se aforó con agua destilada estéril y se ajustó a pH 8 con ácido acético glacial. El buffer TAE 1X se preparó mediante disolución del buffer TAE10X en una proporción 10 a 1 (CIMMYT, 2006).

En un matraz se colocaron 0,8 g de Agarosa en 100 mL de TAE 1X, se disolvió completamente el agar en el buffer, se colocó el buffer con el agar disuelto y el peine en las muescas de la cubeta, y se dejó gelificar por aproximadamente 15 minutos.

Luego se ubicó la cubeta del gel en la posición correcta a fin de que la corriente del polo negativo migre hacia el polo positivo. Se retiró el peine y se colocó el buffer TAE 1X dentro de la cámara electroforética hasta que el gel entre en contacto con el buffer de corrida.

Para cargar las muestras en la cámara se tomó 1 μL de Blue Juice y 4 μL de muestra. Una vez cargadas todas las muestras se cargó el marcador de ADN de 1 Kb. La cámara y se conectó a la fuente de 100 V y 500 mA durante 60 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de corrida se tinturó el gel dentro con una mezcla de 300 mL de buffer TAE 1X y 30 μL de bromuro de etidio durante 45 minutos aproximadamente. Finalmente se colocó el gel tinturado dentro de la cámara del transiluminador (CSL-Microdoc) donde se observó las bandas de ADN.

3.3.2.4 Amplificación vía PCR

El gen mitocondrial citocromo b se amplificó mediante la técnica PCR, para lo cual se utilizó los primers Citocromo b1 – *Forward* F78 (inicial) y Citocromo b2 – *Reverse* B149 (inverso) secuenciados por Invitrogen. Los primers se reconstituyeron en base a su peso molecular y se diluyeron hasta obtener una concentración de 10 a 1, es decir; 1 μL de primer por 10 μL de agua molecular (CIMMYT, 2006; tabla 3.4).

Tabla. 3.4. Secuencias de los iniciadores Citocromo b1 y Citocromo b2 para *Cavia porcellus* L.

| INICIADORES | SECUENCIA NUCLEOTÍDICA | REFERENCIA |
|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Citocromo b1 (Forward F78) | 5'-TCCAATGTAGGAATTATGACCCACC-3' | Spotorno, <i>et al.</i> 2004 |
| Citocromo b2 (Reverse B149) | 5'-TTTCCCATCTCTGGCTTACAAGAC-3' | Spotorno, <i>et al.</i> 2004 |

Las alícuotas se prepararon dentro de la cámara de flujo laminar para evitar contaminación. Inicialmente se preparó una solución madre (*Master Mix*), en un tubo eppendorf de 1,5 μL (tabla 3.5). Se tomaron 41,6 μL de solución madre, 8 μL de muestra de ADN y 0,4 μL de Taq DNA Polimerasa en tubos eppendorf para PCR para preparar cada muestra.

Para la amplificación vía PCR se utilizó el siguiente protocolo térmico:

A 94 °C por 2 minutos para el precalentamiento, 30 ciclos de 95 °C por 45 segundos (desnaturalización), 54 °C por 30 segundos (anidamiento) y 72 °C por 60 segundos (extensión) (Spotorno, *et al.* 2004). Finalmente un período de 72 °C para permitir que la Taq polimerasa concluya la síntesis de bases y un período de enfriamiento de los productos PCR a 4 °C por 5 minutos.

Tabla. 3.5. Componentes para 50 μL de muestra para la amplificación vía PCR.

| COMPONENTES DE LA MASTER MIX | CANTIDAD PARA 1 TUBO | CANTIDAD PARA 10 TUBOS |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Buffer 10X | 5 μL | 50 μL |
| MgCl ₂ | 2 μL | 20 μL |
| dNTPs | 0,4 μL | 4 μL |
| Citocromo b1- Forward | 0,25 μL | 2,5 μL |
| Citocromo b2 - Reverse | 0,25 μL | 2,5 μL |
| Agua Molecular | 33,7 μL | 337 μL |
| TOTAL MASTER MIX POR TUBO | 41,6 μL | 41,6 μL |
| Muestra de ADN | 8 μL | 8 μL |
| Taq DNA Polimerasa | 0,4 μL | 0,4 μL |

Fuente: CIMMYT, 2006

3.3.2.5 Visualización de los productos PCR

Para la visualización de los productos PCR se tomó el protocolo usado para la visualización de las bandas de ADN con variaciones en la cantidad de agarosa en el gel y en el peso del marcador de ADN. El gel de agarosa fue del 1.5% y el marcador de tamaño y concentración de ADN fue el *mass low DNA ladder* de 2000 pares de bases (figura 3.6).

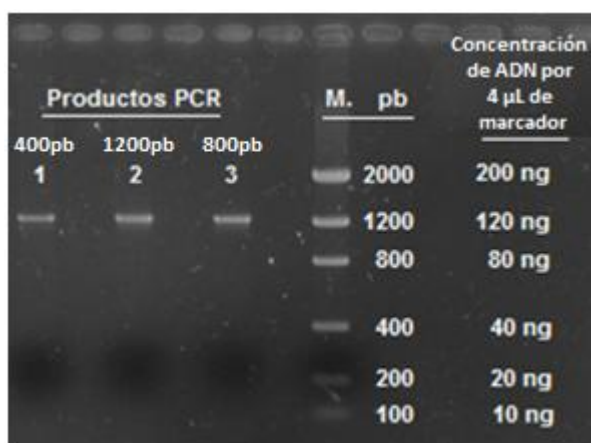


Figura. 3.5. ADN del gen citocromo b de tres muestras de cuy (*Cavia porcellus*) comparación con el marcador de ADN de 2000 pb (Díaz, 2012).

3.3.2.6 Secuenciación

Antes de realizarse la secuenciación, las muestras fueron sometidas a un proceso de purificación en el laboratorio de Eurofins MWG Operon (Alabama – USA) donde se realizó la secuenciación.

La secuenciación se la realizó con la tecnología *Geospiza GeneSifter software* ® *Laboratorio Edition* para facilitar el seguimiento de las muestras a través de códigos de barras. El uso de los códigos de barra permitió hacer

un seguimiento rápido, preciso y seguro de cada muestra, así como la visualización de los resultados de cada reacción a través de la interfaz web compatible con el software Mega 4.0.

3.3.3 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se utilizó el software Mega 4.0, las secuencias de las accesiones del GenBank que se enlistan en el anexo 3, y los resultados de la secuenciación en formato digital compatible con el programa.

Las secuencias fueron ingresadas en el software, luego se alinearon para verificar similitudes y divergencias entre los distintos animales, posteriormente se determinó las distancias genéticas entre los ejemplares y finalmente se elaboró el dendrograma para conocer distancias genéticas entre la población del IASA y la población del GenBank.

Los datos del software, las secuencias de ADN y las fotografías en gel de los productos PCR se analizaron en conjunto para obtener los resultados de consanguinidad y filogenia.

3.3.4 Análisis estadístico

Para la selección de reproductores según sus caracteres morfológicos se utilizó el análisis estadístico de variable sintética que corresponde a una función de un conjunto de variables intermedias, en este caso parámetros

cualitativos y cuantitativos, cada uno de los cuales recibe un valor que ayuda a asignar una calificación para cada individuo. Esta calificación (variable sintética) permitió seleccionar los mejores animales en relación al puntaje obtenido luego de la evaluación, lo que permite que los reproductores sean aquellos animales cuyas características deseables para el sistema de producción puedan ser heredadas a su descendencia.

3.3.4.1 Caracteres fenotípicos cualitativos

A los caracteres fenotípicos más deseables, coloración típica del pelo para la línea, color negro en los ojos, color negro o rosado en las orejas y número normal de dedos en manos y patas, se les asignó el mayor valor; es decir 2 puntos.

El valor de 1 fue asignado para caracteres medianamente aceptables como presencia de polidactilia parcial (en manos o en patas), y colores combinados en las orejas. Para caracteres no deseables como colores atípicos dentro de la línea, ojos de color rojo, orejas de pintadas y polidactilia total se asignó el valor de 0.

3.3.4.2 Caracteres fenotípicos cuantitativos

La calificación de las variables cuantitativas se determinó mediante un sistema de análisis por grupos a través del cálculo de la media muestral y la desviación estándar de los datos dentro de cada variable.

De igual forma se asignó un puntaje de acuerdo al valor de la variable dentro de cada grupo. El grupo 1 fue para aquellos individuos con valores que superaban significativamente a la media, el grupo 2 para los individuos cuyos datos se encontraron alrededor de la media, y, el grupo 3 fue para los valores que se encontraron bajo la media muestral.

Tabla. 3.6. Índice de valoración para variables fenotípicas cualitativas

| VARIABLE | CARACTERÍSTICA FENOTÍPICA | PUNTAJE |
|-----------------|---------------------------|---------|
| Color de pelo | Típico de la línea | 2 |
| | Atípico | 0 |
| Color de ojos | Negro | 2 |
| | Rojo | 0 |
| Color de orejas | Rosado | 2 |
| | Negro | 2 |
| | Combinado | 1 |
| | Pintado | 0 |
| Número de dedos | Normal | 2 |
| | Polidactilia parcial | 1 |
| | Polidactilia total | 0 |

Fuente: Díaz, 2012.

Tabla. 3.7. Índice de valoración para variables fenotípicas cuantitativas

| VARIABLE | Superior a la media | Alrededor de la media | Bajo la media |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|---------------|
| Peso vivo (PV) | 2 | 1 | 0 |
| Largo total (LT) | 2 | 1 | 0 |
| Longitud cabeza-cuerpo (CC) | 2 | 1 | 0 |
| Largo rudimento caudal (LC) | 0 | 1 | 2 |
| Largo de la oreja (LO) | 0 | 1 | 2 |
| Largo de la pata (LP) | 0 | 1 | 2 |
| Largo de la cabeza (Lca) | 0 | 1 | 2 |
| Altura de la cabeza (Aca) | 0 | 1 | 2 |
| Largo del pelo (Lp) | 0 | 1 | 2 |

Fuente: Díaz, 2012.

Las formulas empleadas para el cálculo de la media, la desviación estándar y los rangos de cada grupo son las siguientes:

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n - 1}}$$

$$\text{Rango de grupos} = \mu \pm \sigma$$

Donde, μ es la media muestral, n corresponde al número de datos que comprenden la muestra, x es cada uno de los datos de la muestra, y σ representa la desviación estándar.

Las variables cuantitativas, PV, LT y CC se calificaron con 2 puntos cuando los datos tomados en campo superaba la media muestral. El valor de 1 se otorgó cuando las medidas se encontraban alrededor de la media, y el 0 cuando las medidas estaban por debajo de la media muestral.

Las variables, LC, LO, LP, Lca, Aca y Lp, fueron calificadas en forma inversa tomando en cuenta que estas características al ser superiores a la media muestral se convierten en caracteres indeseables para la selección. De tal forma que la calificación de 2 fue asignada a las medidas que se encontraban bajo la media muestral, el puntaje de 1 para los datos encontradas en torno a la media, y el valor de 0 para aquellas medidas que superaron la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

4.1.1 Descripción fenotípica

El análisis fenotípico cualitativo determinó que los parámetros que permiten una adecuada selección de reproductores están basados en el color del pelo, de los ojos y de las orejas, y, en el número de dedos en las patas anteriores y posteriores.

4.1.1.1 Color del pelo

El color de pelo no presentó variabilidad dentro de las líneas estudiadas, cada una registra su coloración típica; por ejemplo, color blanco para cuyes de la línea Andina, marrón combinado con blanco para la línea Perú, y color bayo para los cuyes de la línea Inti (cuadro 4.1).

Según Chauca *et al.* (2005), la línea Andina presenta el manto blanco de forma predominante en un 96,2% en la generación XXVIII y alcanza el 100% en la generación XXXII, en una población que ha sido estrictamente seleccionada. De la misma forma, Chauca *et al.* (2005) y Guzmán (2000), aseguran que el cuy de la línea Perú y el cuy de la línea Inti; presentan en su capa un color alazán (marrón) y bayo, respectivamente; que puede estar

combinado con blanco, formando fajas o solamente algunas manchas irregulares.

Cuadro. 4.1. Calificación de los caracteres fenotípicos cualitativos.

| Línea | Cód. | Color Pelo | Color Ojos | Color Orejas | Número Dedos | Sub Total |
|--------|------|------------|------------|--------------|--------------|-----------|
| ANDINA | A1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 |
| | A2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | A3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | A4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | A5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | A6 | 2 | 0 | 1 | 2 | 5 |
| | A7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| PERÚ | P1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 7 |
| | P2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 6 |
| | P3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | P4 | 2 | 2 | 2 | 0 | 6 |
| | P5 | 2 | 2 | 1 | 2 | 7 |
| | P6 | 2 | 2 | 0 | 0 | 4 |
| | P7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| INTI | I1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | I2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | I3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | I4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | I5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |
| | I6 | 2 | 2 | 0 | 1 | 5 |
| | I7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 8 |

Fuente: Díaz, 2012.

Otras investigaciones demuestran, que la selección en base al color del pelaje no tiene relación con la conversión alimenticia del animal pero si promueve su aceptación en el mercado, ya que animales con tonalidades blancas en un 70% de su cuerpo, son más apreciados que animales con colores oscuros por presentar cierto grado de pigmentación en la piel (Esquivel 1994, Hidalgo *et al.* 1999).

4.1.1.2 Color de ojos

Se encontró que el color negro fue constante para el 95,45 % de la población evaluada, exceptuando el caso de un representante de la línea Andina que presentó ojos de color rojo (cuadro 4.1). La característica de ojos color negro es un atributo positivo para la selección de individuos de las líneas, ya que al parecer animales con ojos rojos (albinos) tienen dificultades para ver, limitando su capacidad para alcanzar el alimento y provocando efectos negativos en su ganancia de peso (Hidalgo *et al.* 1999, Núñez 2010).

4.1.1.3 Número de dedos

La presencia de dedos supernumerarios tampoco es una característica aceptada en el proceso de selección de reproductores si se desea mantener una estructura definida en la descendencia. En este estudio se alcanzó un 18,18 % de la población con presencia de dedos supernumerarios (cuadro 4.1). Sin embargo; la polidactilia es un carácter altamente heredable por tanto se debe poner atención al momento de la selección. Lo importante es que los cuyes siempre presenten simetría en el número de dedos. Por lo general esta simetría corresponde a 4 dedos en las manos y 3 en las patas (Benson Institute 2005, Núñez 2010).

Según Chauca *et al.* (2005), caracteres como el color rojo en los ojos y la presencia de dedos supernumerarios no tienen influencia en la ganancia de peso de los animales, sin embargo, no son admitidos en ninguna de las líneas Andina, Perú o Inti.

4.1.1.4 Color de orejas

Sobre el color de las orejas no se han registrado estudios, sin embargo en este ensayo se presenta una variabilidad del 27,28 % de la población (cuadro 4.1). Algunos autores señalan que los cuyes muestran orejas grandes y caídas a los costados (Chauca *et al.* 2005, Núñez 2010), como criterio favorable para la selección, pero ningún autor se pronuncia sobre el color de las mismas.

4.1.2 Medidas morfométricas

El análisis fenotípico cuantitativo establece como caracteres para la selección de reproductores a: Peso vivo (PV), Largo total (LT), Longitud cabeza-cuerpo (CC), Largo del rudimento caudal (LC), Largo de la oreja (LO), Largo de la pata (LP), Largo de la cabeza (Lca), Ancho de la cabeza (Aca) y Largo del pelo (Lp).

4.1.2.1 Peso vivo (PV)

El peso vivo es una característica altamente deseable dentro de los sistemas de producción, Esquivel (1994) menciona que la selección de reproductores se realiza por su precocidad en la ganancia de peso, por lo tanto es esencial es el manejo de registros.

Según Chauca, *et al.* (2005); se han registrado pesos de entre 1100 y 1350 gramos hasta las 9 semanas de edad en animales minuciosamente seleccionados a partir del nacimiento. Rico y Rivas (2003) señalan que para

la reproducción se seleccionan cuyes machos de aproximadamente 4 meses de edad y 600 gramos de peso; según Moncayo (1999) la selección se hace entre las 10 y 12 semanas, cuando los reproductores han alcanzado 1200 gramos de peso. Este último parámetro se confirma en este estudio con una media muestral de 1237,62 gramos a los 3 meses de edad (cuadro 4.2).

4.1.2.2 Largo total (LT)

Los datos registrados sobre esta y las demás variables morfométricas que se indican a continuación son limitados para la especie *Cavia porcellus*. Guzmán (2000) indica que las medidas tomadas para el largo total, en animales de 3 meses de edad y 600 gramos de peso, fueron de 289 mm para ejemplares de la línea Andina, y de 270 mm para cuyes de las líneas Inti y Perú. Las medidas presentadas por los animales muestreados en este experimento superaron a los datos mostrados en dicha investigación al encontrarse entre los 325 y 390 mm (cuadro 4.2).

4.1.2.3 Longitud cabeza-cuerpo (CC)

Las medidas que se registraron para la variable longitud cabeza-cuerpo, dentro de las tres líneas varían entre 317,50 y 383,30 mm. Guzmán (2000) por su parte registra datos como 281,0 mm para la línea Andina, 263,8 mm para la Inti, y 263,4 mm para la línea Perú. Estos parámetros son considerados como positivos en el proceso de selección ya que contribuyen con un tamaño de carcasas más deseable para el consumidor.

El grado de correlación entre las variables PV y CC fue del 54 %, cifra que demuestra una alta correlación positiva entre ambas variables, de tal forma que cuando se incrementa el peso vivo aumenta también la longitud cabeza-cuerpo (figura 4.1). Chauca (1999) muestra un 71 % de correlación entre la longitud del cuerpo y el peso a la saca en cuyes bolivianos.

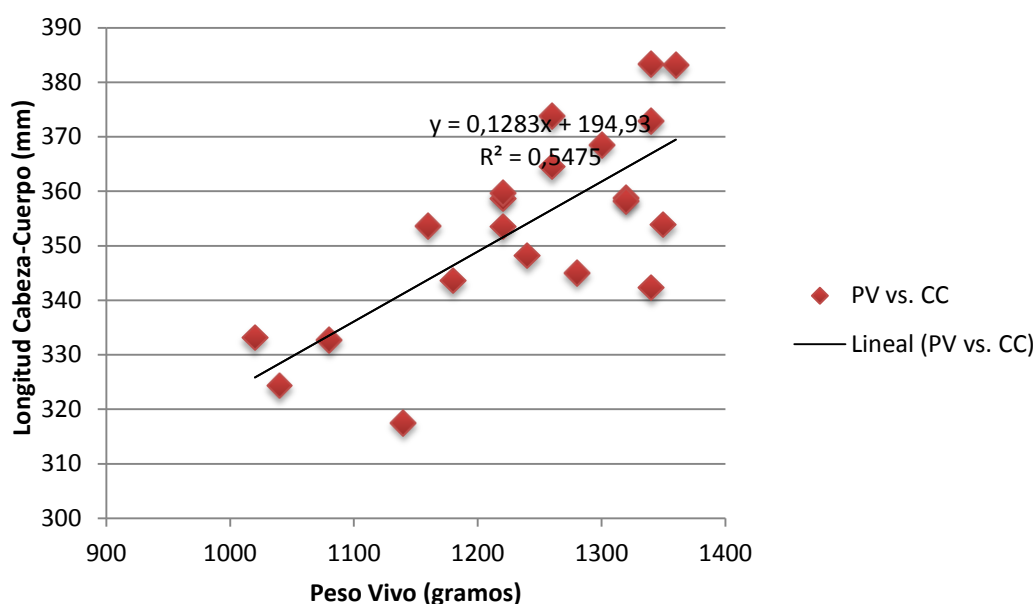


Figura. 4.1. Correlación entre Peso vivo (PV) y Longitud cabeza-cuerpo (CC) en cuyes de las líneas Andina, Perú e Inti de la Hda. El Prado (Díaz, 2012.).

4.1.2.4 Largo del rudimento caudal (LC)

La longitud del rudimento caudal fue de 8,0 mm para la línea Andina, 6,2 mm para la Inti y 6,6 mm para la línea Perú en el estudio realizado por Guzmán (2000). Estas medidas se asemejan a las registradas en este ensayo para las tres líneas. Aquí se obtuvo una variación entre 7,7 y 5 mm (cuadro 4.2).

Esta variable favorece a los animales que presentaron el rudimento caudal más corto, no es deseable para la producción la presencia de un rudimento caudal demasiado largo ya que desmerece la calidad de la canal.

4.1.2.5 Largo de la oreja (LO)

Según Samaniego (2004) en animales reproductores de tres meses de edad se han obteniendo promedios de 38,3; 47,0 y 37,7mm para cuyes de diferentes localidades en la provincia del Chimborazo. Guzmán (2000), por su parte obtuvo valores de 33,7; 34,0 y 32,0 mm para ejemplares de la misma edad, de las líneas Andina, Inti y Perú, respectivamente. Los valores encontrados en este ensayo para las tres líneas presentaron una media de 35,04mm con valores desde 31,4 a 39,2 mm (cuadro 4.2).

4.1.2.6 Largo de la pata (LP)

Los valores máximo y mínimo encontrados para la variable largo de la pata fueron de 62,9 y 56,1 mm, respectivamente (cuadro 4.2). Guzmán (2000); muestra valores bajos para esta variable, 50,0 mm para cuyes de la línea Andina, 45,0 mm para la línea Inti y 46,5 mm la línea Perú.

Esta variable se calificó con el valor máximo para los animales cuyas medidas se encontraron bajo la media muestral (59,39 mm), debido a que según Chauca, *et al.* (2005), tanto manos como patas son retiradas de la carcasa antes de su comercialización. En animales mejorados, la proporción

de las manos y patas en relación a la carcasa no supera el 2,8%, mientras que en cuyes criollos varía entre 3,0 y 4,0% (Chauca, *et al.* 2005).

4.1.2.7 Largo de la cabeza (Lca)

En este estudio, para la variable largo de la cabeza, se observaron medidas entre 80,0 y 87,3 mm con una media de 82,16mm (cuadro 4.2), mientras que Guzmán (2000) obtuvo valores de 62,5 mm, 62,5 mm y 64,0 mm para las tres líneas Andina, Inti y Perú, respectivamente. Samaniego (2004) registra valores que varían entre 82,7 mm y 95,0 mm para ejemplares de la provincia del Chimborazo.

4.1.2.8 Altura de la cabeza (Aca)

Según Esquivel (1994), un animal de tipo brevilineo con buena capacidad para la producción de carne posee una cabeza pequeña menos alargada que un cuy del tipo longilineo cuyas aptitudes para la producción de carne son reducidas. Chauca, *et al.* (2005) señala que la cabeza comprende entre el 16 y 18% de la carcasa, porcentaje que varía según la edad y el tamaño del animal, pero que por lo general suele ser retirado de la carcasa para su comercialización.

Al igual que el largo de la cabeza, la altura, es una característica poco aceptable. En este ensayo se presentaron valores entre 45,4 y 35,9 mm para esta variable.

4.1.2.9 Largo del pelo (Lp)

Los cuyes que presentan pelo corto son más aceptados para la producción de carne por su facilidad al momento de pelar y por la pérdida mínima de peso que se logra en la carcasa. Chauca, *et al*; (2005) registran que un animal vivo de aproximadamente 1012 gramos de peso presenta un promedio de 76 gramos de pelo, alrededor del 8% de su peso, el mismo que se perderá en el proceso del sacrificio.

Las líneas analizadas por Samaniego (2004); presentan valores promedio para la variable largo del pelo de 24,8 y 24,6mm; a diferencia de los registrados en este ensayo que alcanzaron un valor promedio de 31,30mm (cuadro 4.2).

4.1.3 Variable sintética

La calificación de la variable sintética clasificó a toda la muestra en 3 grupos según el puntaje total adquirido (cuadro 4.2). Del total, 10 puntos correspondieron a caracteres cualitativos y 22 a caracteres cuantitativos.

4.1.3.1 Grupo 1

El primer grupo reúne a 4 animales, dos de los cuales corresponden a la línea Inti, uno a la línea Perú y uno a la línea Andina (cuadro 4.2). Estos animales lograron los mejores puntajes superando a la media de 17,95 puntos, con alrededor de 2,05 y 6,05 puntos.

Este grupo fue bastante heterogéneo en cuanto a las medidas morfométricas. En caracteres cualitativos fue poco variable. Fenotípicamente los puntajes negativos para este grupo fueron para el color de las orejas y el número de dedos en cuyes de las líneas Perú e Inti.

El representante de la línea Andina en este grupo mostró una alta calificación para las variables PV, LC, LP, Lca y Aca, y no superó significativamente a la media en las variables LT, CC, LO y Lp.

Los ejemplares de la línea Perú presentaron calificaciones favorables para las variables PV, LT, CC, LO y Lca, aceptables para las variables Aca y Lp; y desfavorables para las variables LC y LP.

Las variables que favorecieron la calificación de los cuyes de la línea Inti dentro del primer grupo, fueron LT, LC, CC, LP, Lca y Aca. Las variables LO y Lp fueron aceptables en su calificación, y la variable PV fue poco favorable para esta línea.

Estas características son indispensables para la selección objetiva de un buen reproductor, sin embargo; al encontrar que no todos los cuyes cumplen a plenitud con todas las características, se hace necesario seleccionar aquellos ejemplares que cumplan al menos con los caracteres más relevantes. Estos caracteres garantizarán cierto grado de mejoramiento de la especie en la siguiente generación, tomando en cuenta, que hay características que pueden ser corregidas más fácilmente que otras.

Considerando que las características fenotípicas fueron bastante favorables para todos los ejemplares del grupo 1, se evaluó en forma objetiva los parámetros cuantitativos para hacer una selección de reproductores, con lo que se encontró las mejores características en los ejemplares P2 e I3, de las líneas Perú e Inti, respectivamente.

4.1.3.2 Grupo 2

El grupo de animales cuyos puntajes finales se encontraron entre 17 y 19 puntos fue de 9 animales (cuadro 4.2), de los cuales; 5 pertenecen a la línea Perú, 2 a la línea Andina y 2 a la línea Inti.

En este grupo, la variabilidad fenotípica se presentó en los caracteres color de orejas y número de dedos, especialmente en los representantes de la línea Perú. Las variables cuantitativas mejor calificadas para los cuyes de la línea Andina fueron Lca, Aca y Lp. Todas las demás variables no fueron representativas para esta línea.

Los ejemplares de la línea Perú alcanzaron buena calificación para las variables PV, LT, CC, LC y LO. Las variables restantes, LP, Lca, Aca y Lp, fueron menos aceptables en la calificación de este grupo.

Los cuyes de la línea Inti que se ajustaron al segundo grupo obtuvieron los mejores puntajes para las variables LP y Lca. Puntajes menos considerables fueron para el resto de las variables.

4.1.3.3 Grupo 3

Los representantes del tercer grupo fueron cuatro ejemplares de la línea Andina, A1, A2, A6 y A7, y un ejemplar de la línea Inti, I4 (cuadro 4.2); cuyos puntajes finales se encontraron aproximadamente entre el 46 y 57 % de los 28 puntos considerados para el puntaje total.

La variabilidad en la parte fenotípica de este grupo se manifestó en el color de las orejas y de los ojos en ejemplares de la línea Andina. Las variables LP y Aca fueron las mejores calificadas de esta línea, las variables PV, LO y Lp obtuvieron valores menos aceptables. Las demás variables fueron calificadas en forma negativa.

El representante de la línea Inti fue calificado positivamente para las variables PV, LT, CC y Aca, y en forma desfavorable para las variables LC, LO, LP, Lca y Lp.

Cuadro. 4.2. Calificación de la variable sintética

| Línea | Código | PV | | LT | | CC | | LC | | LO | |
|-------------------|--------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|------|---------|-------|---------|
| | | gramos | Puntaje | mm | Puntaje | mm | Puntaje | mm | Puntaje | mm | Puntaje |
| ANDINA | A1 | 1280 | 1 | 350 | 0 | 345 | 0 | 5 | 2 | 33,5 | 2 |
| | A2 | 1080 | 0 | 340 | 0 | 332,7 | 0 | 7,3 | 0 | 36,2 | 0 |
| | A3 | 1040 | 0 | 330 | 0 | 324,3 | 0 | 5,7 | 2 | 34,3 | 1 |
| | A4 | 1020 | 0 | 340 | 0 | 333,1 | 0 | 6,9 | 0 | 36,2 | 0 |
| | A5 | 1350 | 2 | 360 | 1 | 353,9 | 1 | 6,1 | 2 | 34,4 | 1 |
| | A6 | 1140 | 0 | 325 | 0 | 317,5 | 0 | 7,5 | 0 | 36,9 | 0 |
| | A7 | 1340 | 2 | 350 | 0 | 342,3 | 0 | 7,7 | 0 | 34,7 | 1 |
| PERÚ | P1 | 1240 | 1 | 355 | 1 | 348,2 | 1 | 6,8 | 1 | 37,3 | 0 |
| | P2 | 1360 | 2 | 390 | 2 | 383,1 | 2 | 6,9 | 0 | 33,3 | 2 |
| | P3 | 1220 | 1 | 360 | 1 | 353,5 | 1 | 6,5 | 1 | 32,2 | 2 |
| | P4 | 1260 | 1 | 370 | 2 | 364,5 | 2 | 5,5 | 2 | 33 | 2 |
| | P5 | 1320 | 2 | 365 | 1 | 358,7 | 1 | 6,3 | 1 | 33,5 | 2 |
| | P6 | 1340 | 2 | 390 | 2 | 383,3 | 2 | 6,7 | 1 | 31,4 | 2 |
| | P7 | 1220 | 1 | 365 | 1 | 358,6 | 1 | 6,4 | 1 | 34,5 | 1 |
| INTI | I1 | 1220 | 1 | 365 | 1 | 359,6 | 1 | 5,4 | 2 | 39,2 | 0 |
| | I2 | 1180 | 0 | 350 | 0 | 343,6 | 0 | 6,4 | 1 | 35,3 | 1 |
| | I3 | 1300 | 2 | 375 | 2 | 368,4 | 2 | 6,6 | 1 | 34,1 | 1 |
| | I4 | 1340 | 2 | 380 | 2 | 372,9 | 2 | 7,1 | 0 | 37,3 | 0 |
| | I5 | 1320 | 2 | 365 | 1 | 358,2 | 1 | 6,8 | 1 | 38,9 | 0 |
| | I6 | 1260 | 1 | 380 | 2 | 373,8 | 2 | 6,2 | 1 | 35,9 | 1 |
| | I7 | 1160 | 0 | 360 | 1 | 353,6 | 1 | 6,4 | 1 | 33,8 | 2 |
| Media | (X) | 1237,62 | | 360,24 | | 353,75 | | 6,49 | | 35,04 | |
| Desv. Est. | (S) | 102,56 | | 17,71 | | 17,79 | | 0,69 | | 2,08 | |

Fuente: Díaz, 2012.

Calificación de la variable sintética (Continuación)

| Línea | Código | LP | | Lca | | Aca | | Lp | | Fenotipo | |
|---------------------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-----------|---------------|
| | | mm | Puntaje | mm | Puntaje | mm | Puntaje | mm | Puntaje | Sub Total | Puntaje Total |
| ANDINA | A1 | 60,8 | 0 | 86,0 | 0 | 38,5 | 2 | 40,2 | 0 | 8 | 15 |
| | A2 | 59,1 | 1 | 86,8 | 0 | 42,2 | 0 | 27,7 | 2 | 10 | 13 |
| | A3 | 60,7 | 0 | 81,2 | 1 | 38,5 | 2 | 27,6 | 2 | 10 | 18 |
| | A4 | 59,7 | 1 | 77,4 | 2 | 35,9 | 2 | 27,1 | 2 | 10 | 17 |
| | A5 | 57,0 | 2 | 80,0 | 2 | 39,4 | 2 | 30,3 | 1 | 10 | 24 |
| | A6 | 56,8 | 2 | 77,8 | 2 | 39,9 | 1 | 30,6 | 1 | 7 | 13 |
| | A7 | 58,1 | 2 | 85,5 | 0 | 40,1 | 1 | 35,7 | 0 | 10 | 16 |
| PERÚ | P1 | 60,1 | 1 | 81,1 | 1 | 42,9 | 0 | 24,8 | 2 | 9 | 17 |
| | P2 | 62,9 | 0 | 80,2 | 2 | 41,8 | 1 | 31,4 | 1 | 8 | 20 |
| | P3 | 59,2 | 1 | 82,4 | 1 | 39,7 | 1 | 32,1 | 1 | 10 | 20 |
| | P4 | 59,4 | 1 | 85,4 | 0 | 45,4 | 0 | 34,1 | 0 | 8 | 18 |
| | P5 | 60,8 | 0 | 81,8 | 1 | 42,1 | 1 | 36,6 | 0 | 9 | 18 |
| | P6 | 60,6 | 0 | 84,2 | 0 | 45,2 | 0 | 28,4 | 2 | 6 | 17 |
| | P7 | 56,1 | 2 | 87,3 | 0 | 39,7 | 1 | 32,7 | 1 | 8 | 17 |
| INTI | I1 | 62,3 | 0 | 78,3 | 2 | 41,3 | 1 | 28,9 | 2 | 10 | 20 |
| | I2 | 59,9 | 1 | 80,4 | 2 | 44,5 | 0 | 24,6 | 2 | 10 | 17 |
| | I3 | 58,4 | 2 | 79,7 | 2 | 41,8 | 1 | 31,4 | 1 | 8 | 22 |
| | I4 | 61,4 | 0 | 84,5 | 0 | 38,6 | 2 | 34,4 | 0 | 8 | 16 |
| | I5 | 57,7 | 2 | 83,6 | 1 | 41,9 | 1 | 34,5 | 0 | 10 | 19 |
| | I6 | 58,3 | 2 | 78,5 | 2 | 41,8 | 1 | 30,5 | 1 | 7 | 20 |
| | I7 | 57,9 | 2 | 83,3 | 1 | 37,6 | 2 | 33,6 | 0 | 10 | 20 |
| Media | (X) | 59,39 | | 82,16 | | 40,90 | | 31,30 | | | 17,95 |
| Desv. Estan. | (S) | 1,80 | | 3,06 | | 2,47 | | 3,94 | | | 2,69 |

Fuente: Díaz, 2012.

Cuadro. 4.3. Significado de acrónimos del cuadro 4.2.

| SIGLA | NOMBRE | SIGLA | NOMBRE | COLORES | PUNTAJE |
|-------|-------------------------------------|-------|---------------------|---------|-----------------|
| LT | Largo total | LP | Largo de la pata | ■ | Grupo 1 > 21 |
| CC | Longitud cabeza - cuerpo | Lca | Largo de la Cabeza | ■ | Grupo 2 21 - 18 |
| LC | Largo de la cola (rudimento caudal) | Aca | Altura de la Cabeza | ■ | Grupo 3 < 18 |
| LO | Largo de la oreja | Lp | Largo del pelo | | |

Fuente: Díaz, 2012.

4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

4.2.1 Extracción de ADN

El ADN de mejor calidad se obtuvo en la fracción C. En las fracciones A y B se obtuvo gran cantidad de arrastre de impurezas (figura 4.2).

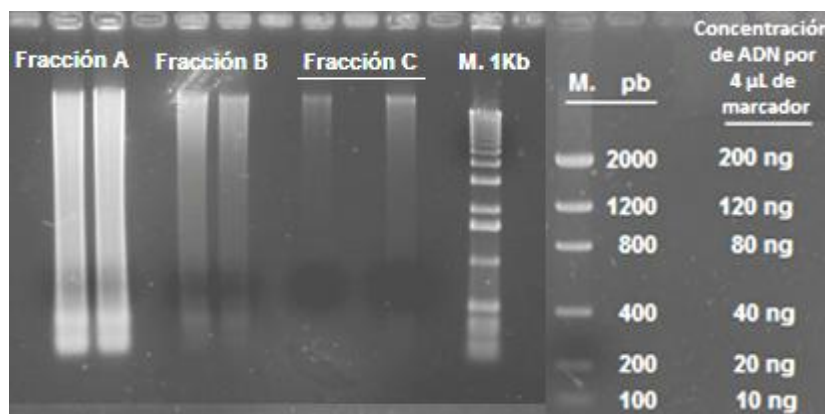


Figura. 4.2. Visualización de ADN en gel de agarosa al 0.8% (Díaz, 2012).

El ADN colectado en la fracción C alcanzó una concentración de ADN de entre 10 y 50 ng por µL de muestra (cuadro 4.4 y anexo 8).

4.2.2 Caracterización de ADN mitocondrial amplificado

El tamaño de los fragmentos amplificados mediante la técnica PCR fue variable para las distintas muestras. Se encontraron fragmentos incompletos de 400 a 800 pb en ejemplares de las tres líneas, cuyas concentraciones estuvieron entorno a los 10 y 20 ng. Los fragmentos amplificados de ADN genómico de mayor tamaño y concentración fueron los obtenidos de 10 animales, cuatro de la línea Andina, dos de la línea Perú y 4 de la línea Inti; los cuales presentaron fragmentos de 1200 pb y 30ng de concentración (cuadro 4.4).

4.2.1 Caracterización de ADN mitocondrial secuenciado

Según Solarte *et al.* (2005), los productos de la amplificación vía PCR para el gen mitocondrial citocromo b se encontraron entre los 1125 y 1140 pb en animales de la especie *Cavia porcellus*. Guevara (2004) asegura también que en roedores, la longitud de este gen es de alrededor de 1140 nt (nucleótidos). En este estudio las secuencias completas alcanzaron entre 1170 y 1200 pb, y las incompletas se ubicaron entre 245 y 890 pb (cuadro 4.5).

El ADN secuenciado en el laboratorio de Operon (Alabama-USA) redujo la concentración inicial del producto PCR en el 59,09 % de la muestra luego de la purificación. Además incrementó la concentración de ADN para el 36,4 % de la población muestreada, dentro del cual se encontraron tres ejemplares de la línea Perú y uno de la línea Inka (anexo 30) con un incremento

significativo de la concentración, la misma que inicialmente se encontraba entre 400 y 800 pares de bases y que alcanzó más de 1170 pb y una concentración aproximada de 30 ng/ml (cuadro 4.5). Se obtuvo además una muestra sin ADN luego de la secuenciación que corresponde al 4,51 % de la población muestral, lo que significa que el ADN de esta muestra no se ensambló a la secuencia del primer inicial F78 por lo que en el cromatograma se evidenció la presencia de contaminación y una baja intensidad de los picos fluorescentes en cada reacción (anexo 16).

Cuadro. 4.4. Tamaño y concentración del ADN mitocondrial amplificado vía PCR.

| Línea | Cód. | No. Muestra | Tamaño | Concentración |
|--------|------|-------------|---------------------|-----------------|
| | | | pb (pares de bases) | ng (nanogramos) |
| ANDINA | A1 | 1 | 1200 pb | 30 ng |
| | A2 | 2 | 800 pb | 20 ng |
| | A3 | 3 | 1200 pb | 30 ng |
| | A4 | 4 | 400 pb | 10 ng |
| | A5 | 5 | 800 pb | 20 ng |
| | A6 | 6 | 1200 pb | 30 ng |
| | A7 | 7 | 1200 pb | 50 ng |
| PERÚ | P1 | 8 | 800 pb | 20 ng |
| | P2 | 9 | 400 pb | 20 ng |
| | P3 | 10 | 1200 pb | 30 ng |
| | P4 | 11 | 1200 pb | 50 ng |
| | P5 | 12 | 800 pb | 20 ng |
| | P6 | 13 | 400 pb | 10 ng |
| | P7 | 14 | 800 pb | 20 ng |
| INTI | I1 | 15 | 1200 pb | 30 ng |
| | I2 | 16 | 1200 pb | 30 ng |
| | I3 | 17 | 1200 pb | 30 ng |
| | I4 | 18 | 800 pb | 20 ng |
| | I5 | 19 | 1200 pb | 30 ng |
| | I6 | 20 | 800 pb | 20 ng |
| | I7 | 21 | 800 pb | 20 ng |
| INKA | K1 | 22 | 800 pb | 20 ng |

Fuente: Díaz, 2012.

Cuadro. 4.5. Tamaño y concentración del ADN mitocondrial citocromo b secuenciado.

| Línea | Cód. | No. Muestra | Tamaño | Concentración |
|--------|------|-------------|---------------------|-----------------|
| | | | pb (pares de bases) | ng (nanogramos) |
| ANDINA | A1 | 1 | 1180 pb | 29,50 ng |
| | A2 | 2 | 887 pb | 22,18 ng |
| | A3 | 3 | 1184 pb | 29,60 ng |
| | A4 | 4 | 245 pb | 6,13 ng |
| | A5 | 5 | 890 pb | 22,25 ng |
| | A6 | 6 | 1186 pb | 29,65 ng |
| | A7 | 7 | 1181 pb | 29,53 ng |
| PERÚ | P1 | 8 | 0 pb | 0,00 ng |
| | P2 | 9 | 1179 pb | 29,48 ng |
| | P3 | 10 | 1171 pb | 29,28 ng |
| | P4 | 11 | 482 pb | 12,05 ng |
| | P5 | 12 | 1175 pb | 29,38 ng |
| | P6 | 13 | 1179 pb | 29,48 ng |
| | P7 | 14 | 648 pb | 16,20 ng |
| INTI | I1 | 15 | 1188 pb | 29,70 ng |
| | I2 | 16 | 1171 pb | 29,28 ng |
| | I3 | 17 | 879 pb | 21,98 ng |
| | I4 | 18 | 520 pb | 13,00 ng |
| | I5 | 19 | 1204 pb | 30,10 ng |
| | I6 | 20 | 365 pb | 9,13 ng |
| | I7 | 21 | 893 pb | 22,33 ng |
| INKA | K1 | 22 | 1185 pb | 29,63 ng |

Fuente: Díaz, 2012; Eurofins MWG Operon (USA).

4.2.2 Caracterización del gen citocromo b

4.2.2.1 Análisis de secuencias completas

A partir de las secuencias del gen citocromo b de 25 individuos *Cavia porcellus*, 11 procedentes del GenBank y 12 del criadero del IASA; se obtuvo un promedio de 1120,8 nucleótidos que se traducen en 334,8 aminoácidos. El promedio de nucleótidos de las secuencias completas de la Hda. El Prado

fue de 1101,5 nt ó 331,9 aminoácidos, que corresponden al 98,27 % del promedio del gen completo en esta especie.

Una vez alineadas las secuencias se encontraron 1082,8 pares de nucleótidos intra-específicos y 1084,6 pares de nucleótidos intra-genéricos. El 98,08 % de los pares intra-específicos son pares idénticos y el 1,92 % son pares divergentes por transición y transversión (cuadro 4.6).

Cuadro. 4.6. Porcentaje de pares idénticos, en transición y en transversión de las secuencias completas del gen mitocondrial citocromo b.

| Especies | Idénticos | | Transiciones (TS) | | Transversión (TV) | | Tasa TS/TV |
|---|-----------|-------|-------------------|------|-------------------|------|------------|
| | No. Pares | % | No. Pares | % | No. Pares | % | |
| <i>Cavia porcellus</i> | 1062 | 98,08 | 12 | 1,11 | 9 | 0,83 | 1,33 |
| <i>Cavia porcellus vs. Dolichotis patagonum</i> | 1048 | 96,63 | 22 | 2,03 | 15 | 1,38 | 1,47 |

Fuente: Díaz, 2012; Software Mega 4.0.

Se analizaron además 1228 sitios correspondientes a las secuencias completas de ejemplares *C. porcellus*, de los cuales 1050 (85,50 %) fueron sitios conservados y 155 (14,50 %) fueron variables. De estos últimos, 86 sitios fueron parsimoniosos informativos, que representan el 55,48 % de los sitios variables. El bajo porcentaje de variabilidad entre las secuencias de la especie *C. porcellus* demuestra la presencia de caracteres heredables altamente similares, como se demuestra en el dendrograma elaborado para la especie (figura 4.3).

El dendrograma para los ejemplares *C. porcellus* de secuencias completas se subdivide en dos cluster. El grupo más pequeño es el más distante en

base a las distancias genéticas (figura 4.4). Presentó la misma topología el 92 % de las repeticiones bajo una frecuencia de análisis de 1000 réplicas. Está formado de cuatro ejemplares procedentes del GenBank y tres cuyes del criadero de la Hda. “El Prado”; de estos últimos, dos son de la línea Inti y uno de la Andina (figura 4.3).

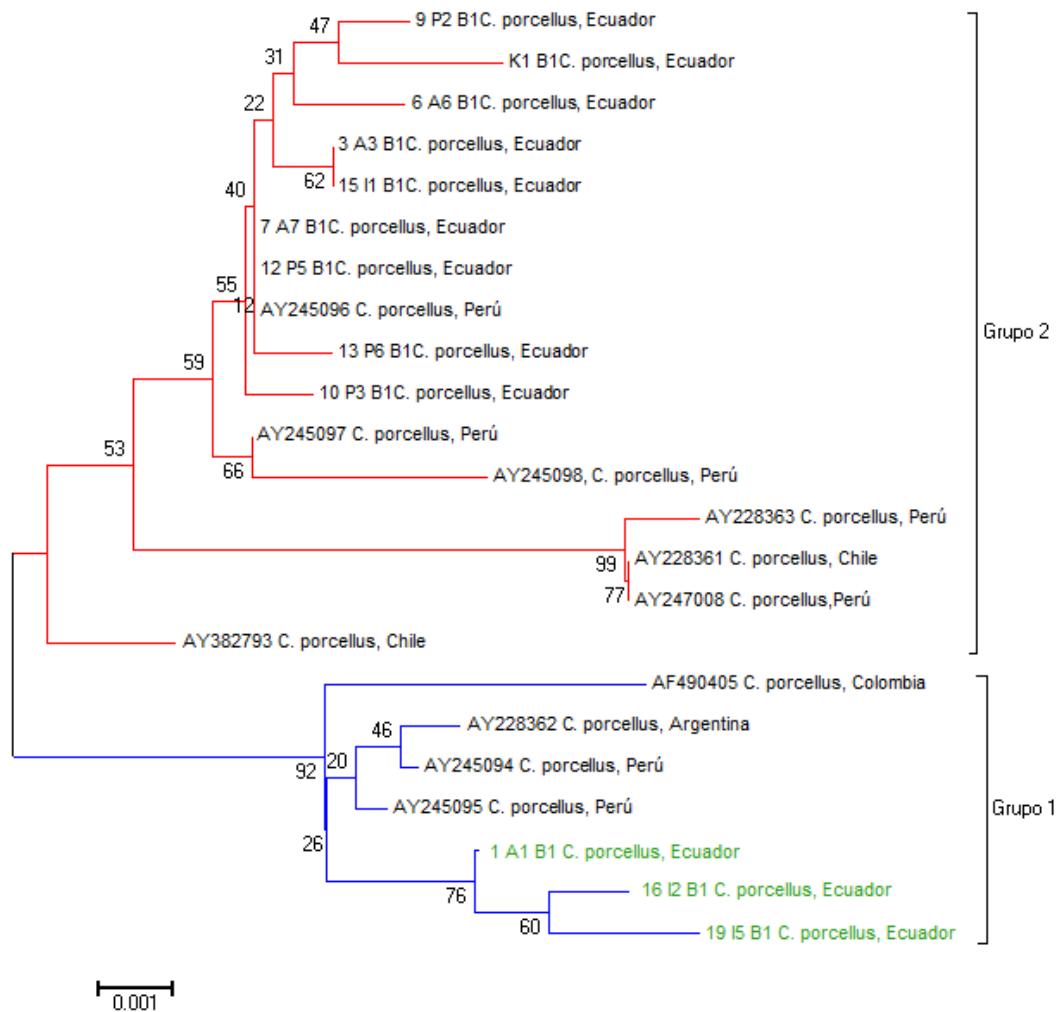


Figura. 4.3. Dedrograma de secuencias completas del gen mitocondrial citocromo b de especímenes de la especie *C. porcellus*⁴ (Díaz, 2012).

⁴ La historia evolutiva se infiere utilizando el método de agrupamiento de vecinos. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud. Los valores de remuestreo (Bootstap test de 1000 réplicas) se ubican sobre cada nodo.

El segundo cluster presentó la misma topología el 53% de las repeticiones bajo la misma frecuencia de análisis (1000 réplicas). Es un cluster es de mayor tamaño y está formado por 7 ejemplares del GenBank y 9 secuencias del criadero del IASA, de las líneas Perú, Andina e Inti (figura 4.3).

La anidación de las muestras en el cluster determina las distancias genéticas y la variabilidad intra-especie. El grupo más distante de los ejemplares provenientes de la Hda. El Prado lo establecieron las muestras A1_B1, I2_B1 e I5_B1 (figura 4.4).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| 1. 1 A1 B1 | | | | | | | | | | | | |
| 2. 3 A3 B1 | 0.0096 | | | | | | | | | | | |
| 3. 6 A6 B1 | 0.0096 | 0.0021 | | | | | | | | | | |
| 4. 7 A7 B1 | 0.0096 | 0.0011 | 0.0021 | | | | | | | | | |
| 5. 9 P2 B1 | 0.0117 | 0.0032 | 0.0021 | 0.0021 | | | | | | | | |
| 6. 10 P3 B1 | 0.0106 | 0.0021 | 0.0032 | 0.0011 | 0.0032 | | | | | | | |
| 7. 12 P5 B1 | 0.0096 | 0.0011 | 0.0021 | 0.0000 | 0.0021 | 0.0011 | | | | | | |
| 8. 13 P6 B1 | 0.0106 | 0.0021 | 0.0032 | 0.0011 | 0.0032 | 0.0021 | 0.0011 | | | | | |
| 9. 15 I1 B1 | 0.0096 | 0.0000 | 0.0021 | 0.0011 | 0.0032 | 0.0021 | 0.0011 | 0.0021 | | | | |
| 10. 16 I2 B1 | 0.0021 | 0.0117 | 0.0117 | 0.0117 | 0.0139 | 0.0128 | 0.0117 | 0.0128 | 0.0117 | | | |
| 11. 19 I5 B1 | 0.0032 | 0.0128 | 0.0128 | 0.0128 | 0.0149 | 0.0139 | 0.0128 | 0.0139 | 0.0128 | 0.0032 | | |
| 12. K1 B1 | 0.0128 | 0.0042 | 0.0053 | 0.0032 | 0.0032 | 0.0042 | 0.0032 | 0.0042 | 0.0042 | 0.0128 | 0.0160 | |

Figura. 4.4. Matriz de distancias genéticas de secuencias completas del gen citocromo b en cuyes de las líneas Andina, Perú e Inti (Díaz, 2012; Mega 4.0.).

Las disimilitudes intra-especie se localizaron en 86 sitios a lo largo de las secuencias completas del gen mitocondrial citocromo b, las mismas que se ubicaron a partir de la posición 58 hasta la 1215. Las muestras más distantes en el dendrograma mostraron mayor variabilidad genética en comparación con las muestras más homólogas del criadero de la hacienda A7_B1, P5_B1 e I1_B1, y las accesiones del GenBank (figura 4.5).

La muestra I5_B1 fue la que presentó mayor cantidad de disimilitudes en su secuencia. En la posición 364 se localizó una divergencia por sustitución transicional de una Guanina (G) por una Adenina (A) (figura 4.5). En la posición 805 se presenta una disimilitud por sustitución transversional de una Adenina (A) por una Timina (T), seguida por dos inserciones nucleotídicas en las posiciones 808 y 809 (figura 4.6).

| CÓDIGO | #Sitio: 354 | | | | | | | | | 364 | | | | | | | | | 374 | | |
|----------------------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|
| 7 A7 B1 | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| 12 P5 B1 | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| 15 I1 B1 | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| AF490405 <i>Cavia porcellus</i> | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| AY228383 <i>Cavia porcellus</i> | T | C | T | T | C | T | G | C | T | T | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| AY382793 <i>Cavia porcellus</i> | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| 1 A1 B1 | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| 16 I2 B1 | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | G | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |
| 19 I5 B1 | T | C | T | T | C | T | G | T | T | C | A | C | A | G | T | T | A | T | G | G | C |

Figura. 4.5. Sitios de divergencia transicional entre secuencias del gen mitocondrial citocromo b (Díaz, 2012; Mega 4.0.).

| CÓDIGO | #Sitio: 795 | | | | | | | | | | 805 | 808 | 809 | | | | | | | 815 | |
|----------------------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|-----|---|
| 7 A7 B1 | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| 12 P5 B1 | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| 15 I1 B1 | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| AF490405 <i>Cavia porcellus</i> | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| AY228383 <i>Cavia porcellus</i> | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| AY382793 <i>Cavia porcellus</i> | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| 1 A1 B1 | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| 16 I2 B1 | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | A | A | A | - | - | C | C | A | G | A | G |
| 19 I5 B1 | A | C | C | A | C | A | C | A | T | T | T | A | A | A | C | C | C | A | G | A | G |

Figura. 4.6. Sitios de divergencia transversional entre secuencias del gen mitocondrial citocromo b (Díaz, 2012; Software Mega 4.0.).

Los sitios más representativos de divergencia para la muestra I5_B1 se ubicaron en las posiciones 364 y 805.

Cuadro. 4.7. Fragmentos de mayor divergencia genética en la secuencia del gen mitocondrial citocromo b de la muestra I5.

| LÍNEA | MUESTRA | POSICIÓN | SECUENCIA NUCLEOTÍDICA |
|-------|----------|-----------|------------------------------|
| INTI | 19_I5_B1 | 354 - 374 | 5'- TCTTCTGTTACAGTTATGGC -3' |
| | | 795 - 815 | 5'-ACCACACATTTAAACCCAGAG-3' |

Fuente: Díaz; 2012.

4.2.2.2 Selección de reproductores

Genotípicamente los ejemplares de la Hda. El Prado, que presentaron mayor variabilidad, fueron los cuyes de la línea Inti I2 e I5. Ambos ejemplares obtuvieron distancias genéticas de 0,0021 a 0,0139 centimorgans (cM) con relación al resto de individuos muestreados. Las muestras, I2 e I5, analizadas a través de la interfaz web BLAST⁵ alcanzaron una similitud máxima del 97%, que está dada por la identidad de 1025 nucleótidos de los 1053 nt que constituyeron las secuencias (Zheng *et al.* 2000).

Según la caracterización fenotípica cualitativa ambos ejemplares de la línea Inti (I2 e I5) presentaron excelentes calificaciones. En base a la caracterización fenotípica cuantitativa se ubicaron en el grupo 2 por sus calificaciones favorables en las variables de rendimiento productivo Lca (largo de la cabeza) y PV (peso vivo), en las muestras I2 e I5,

⁵ BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

respectivamente. La divergencia genética de estos individuos con el resto de la población del IASA les da la posibilidad de mejorar sus caracteres fenotípicos cuantitativos y reducir el nivel de consanguinidad de la población en las generaciones futuras.

4.2.3 Análisis de secuencias incompletas

Las secuencias incompletas amplificadas del gen mitocondrial citocromo b para la población en estudio fueron de 245 a 893 pb (pares de bases). Las muestras de 245 y 365 pares de bases, de las líneas Andina e Inti, respectivamente; alcanzaron menos del 34 % de las secuencias completas por lo que no fueron utilizadas en el análisis. Las secuencias de 879 a 890 pb, fueron cortadas a 697 pb para obtener un 62,54 % de las secuencias completas y ser comparables con las secuencias más cortas encontradas en el GenBank para este gen que fueron de 490 a 678 pares de bases.

En promedio se encontraron 570,6 nucleótidos o 183,9 aminoácidos; es decir aproximadamente el 51,80 % de las secuencias completas de 1101,5 nucleótidos. De los fragmentos alineados se evaluaron 697 sitios, de los que se encontró 31 variables y 664 conservados. Las secuencias difieren en aproximadamente el 4,44 %, situación que se evidencia en el porcentaje de mutaciones transicionales y transversionales (cuadro 4.8).

Cuadro. 4.8. Porcentaje de pares idénticos, en transición y en transversión de las secuencias semi-completas del gen mitocondrial citocromo b.

| Especie | Idénticos | | Transiciones (TS) | | Transversión (TV) | | Tasa (TS/TV) |
|------------------------|-----------|-------|-------------------|------|-------------------|------|--------------|
| | No. Pares | % | No. Pares | % | No. Pares | % | |
| <i>Cavia porcellus</i> | 489 | 98,86 | 2 | 0,40 | 3 | 0,60 | 0,62 |

Fuente: Díaz, 2012; Software Mega 4.0.

4.2.4 Análisis filogenético

Las topologías obtenidas para la secuencia del gen mitocondrial citocromo b ubican a individuos de los géneros *Cavia* y *Microcavia* en dos subgrupos monofiléticos (que comparten caracteres heredados) dentro de un mismo cluster, y a los ejemplares menos divergentes del grupo externo (outgroup), AY382787 *Dolichotis patagonum*, en un cluster diferente. De tal forma que el dendrograma quedó dividido en tres cluster (figura 4.8).

Al comparar las secuencias del gen citocromo b de las secuencias de la especie *Cavia porcellus* provenientes del IASA con las secuencias del GenBank de la misma especie, se encontró que todas pertenecen al mismo grupo monofilético y que comparten, en menor grado, ciertos caracteres heredados con el grupo parafilético de ejemplares *C. tschudii* y *C. aperea*.

Los ejemplares 16_I2_B1 y 19_I5_B1 comparten el mismo subnivel jerárquico; y estos a su vez, tienen alto grado de similitud con su grupo hermano de origen colombiano AF490405, lo que concuerda con el bajo porcentaje de divergencia nucleotídica (figura 4.9). A su vez, estas secuencias forman un grupo hermano con AY228363 y AY382793,

procedentes de Perú y Chile, respectivamente; y ambos grupos se encuentran estrechamente relacionados con AY245099 *Cavia tschudii*.

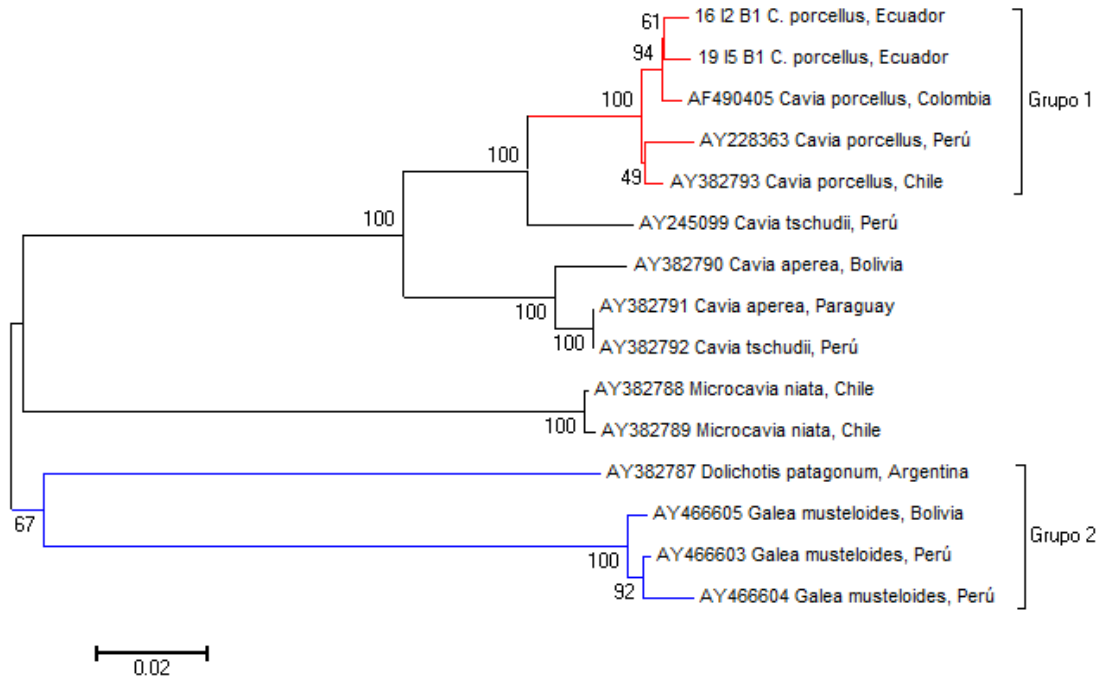


Figura. 4.7.Árbol de distancias genéticas a partir de secuencias mitocondriales del gen para citocromo b de especímenes de la Familia Caviidae⁶ (Díaz, 2012).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1. AF490405] Cavia porcellus | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. AY228363] Cavia porcellus | 0.0174 | | | | | | | | | | | | | |
| 3. AY245099] Cavia tschudii | 0.0494 | 0.0494 | | | | | | | | | | | | |
| 4. AY382787] Dolichotis patagonum | 0.2182 | 0.2169 | 0.2042 | | | | | | | | | | | |
| 5. AY382788] Microcavia niata | 0.2143 | 0.2182 | 0.2055 | 0.2118 | | | | | | | | | | |
| 6. AY382789] Microcavia niata | 0.2169 | 0.2207 | 0.2080 | 0.2131 | 0.0029 | | | | | | | | | |
| 7. AY382790] Cavia aperea | 0.0903 | 0.0925 | 0.0892 | 0.2143 | 0.2042 | 0.2055 | | | | | | | | |
| 8. AY382791] Cavia aperea | 0.0828 | 0.0871 | 0.0807 | 0.2182 | 0.2055 | 0.2067 | 0.0204 | | | | | | | |
| 9. AY382792] Cavia tschudii | 0.0828 | 0.0871 | 0.0807 | 0.2182 | 0.2055 | 0.2067 | 0.0204 | 0.0000 | | | | | | |
| 10. AY382793] Cavia porcellus | 0.0106 | 0.0125 | 0.0423 | 0.2169 | 0.2143 | 0.2169 | 0.0914 | 0.0839 | 0.0839 | | | | | |
| 11. AY466603] Galea musteloides | 0.2350 | 0.2389 | 0.2143 | 0.2042 | 0.2093 | 0.2080 | 0.2105 | 0.2093 | 0.2093 | 0.2311 | | | | |
| 12. AY466604] Galea musteloides | 0.2429 | 0.2468 | 0.2233 | 0.2131 | 0.2169 | 0.2156 | 0.2182 | 0.2143 | 0.2143 | 0.2402 | 0.0106 | | | |
| 13. AY466605] Galea musteloides | 0.2337 | 0.2389 | 0.2156 | 0.2030 | 0.2105 | 0.2093 | 0.2105 | 0.2093 | 0.2093 | 0.2311 | 0.0087 | 0.0155 | | |
| 14. 16 I2 B1 | 0.0087 | 0.0184 | 0.0484 | 0.2169 | 0.2169 | 0.2194 | 0.0914 | 0.0828 | 0.0828 | 0.0135 | 0.2363 | 0.2442 | 0.2350 | |
| 15. 19 I5 B1 | 0.0087 | 0.0184 | 0.0504 | 0.2233 | 0.2169 | 0.2194 | 0.0914 | 0.0839 | 0.0839 | 0.0135 | 0.2350 | 0.2429 | 0.2337 | 0.0096 |

Figura. 4.8. Matriz de distancias genéticas de especímenes de la Familia Caviidae (Díaz, 2012).

⁶ La historia evolutiva se infiere utilizando el método de agrupamiento de vecinos. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud. Los valores de remuestreo (1000 réplicas) se ubican sobre cada nodo.

Por otro lado, los ejemplares AY382791, *C. aperea* y AY382792, *C. tschudii*; se encuentran estrechamente relacionados formando un grupo que lo comparten con AY382790 de la especie *C. aperea*. Este grupo monofilético se encuentra compartiendo caracteres heredados con los ejemplares *C. porcellus*, por lo que se deduce que interviene en la historia evolutiva de esta especie.

Varios investigadores señalan a *C. tschudii* como la especie más cercanamente relacionada a *C. porcellus* (Spotorno *et al.* 2006). Según Spotorno *et al.* (2004), todos los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud agrupan a ejemplares *C. porcellus* con *C. tschudii* por su similitud en las secuencias del gen mitocondrial citocromo b. Al comparar a *C. porcellus* con *C. aperea* los resultados son menos consistentes a pesar de presentar similitud entre *C. aperea* y *C. tschudii*. Spotorno *et al.* (2004), señalan además que la mayor diversidad en la especie *Cavia porcellus* se ubica en Sudamérica en los ejemplares llamados “criollos” por los criadores locales.

CONCLUSIONES

Los caracteres fenotípicos cualitativos que permiten una adecuada selección de reproductores de las líneas Perú, Andina e Inti son el color del pelo, de las orejas y de los ojos, y el número de dedos en las patas anteriores y posteriores.

Las variables morfométricas que favorecen la selección de reproductores en las líneas Perú, Andina e Inti son: Peso vivo (PV), Largo total (LT), Longitud cabeza-cuerpo (CC), Largo del rudimento caudal (LC), Largo de la oreja (LO), Largo de la pata (LP), Largo de la cabeza (Lca), Ancho de la cabeza (Aca) y Largo del pelo (Lp).

Las secuencias completas del gen mitocondrial citocromo b de las líneas Andia, Perú e Inti tienen un promedio de 1101,5 nucleótidos que se traducen en 331,9 aminoácidos y son similares en un 98,08 %.

Las secuencias completas del gen mitocondrial citocromo b de las líneas Andia, Perú e Inti presentaron 1082,8 pares de nucleótidos intra-específicos de los cuales 1062 pares (98,08 %) son idénticos y 21 (1,92 %) son divergentes por transición (12 pares) y transversión (9 pares).

Los ejemplares de la línea Inti, I2 e I5 poseen mayor variabilidad genética y se encuentran más distantes del resto de la población del IASA.

Ambos individuos presentaron la misma topología el 60 % de las repeticiones bajo una frecuencia de remuestreo de 1000 réplicas.

Los fragmentos de mayor variabilidad se encontraron en la secuencia de la muestra I5 representante de la línea Inti. Estos fragmentos se ubicaron desde la posición 354 a la 374, y desde la posición 795 hasta la 815, lugares donde se encontraron las secuencias más divergentes 5'-TCTTCTGTTACAGTTATGGC-3' y 5'ACCACACATTTAAACCCAGAG-3', respectivamente.

Se seleccionó como reproductor al ejemplar I5, de la línea Inti, por presentar excelentes caracteres fenotípicos cualitativos, buen peso vivo en edad reproductiva y mayor variabilidad genética intra poblacional.

El análisis filogenético muestra que las secuencias de la especie *Cavia porcellus* provenientes del IASA con las secuencias del GenBank de la misma especie, pertenecen al mismo grupo monofilético y que comparten caracteres heredados con el grupo parafilético de ejemplares *C. tschudii* y *C. aperea*.

Las especies silvestres como *Cavia tschudii* y *Cavia aperea* se encuentran distanciadas genéticamente de *Cavia porcellus* pero comparten secuencias genéticas heredadas por lo que se confirma la descendencia de *Cavia porcellus* a partir de *Cavia tschudii*.

RECOMENDACIONES

Hacer una evaluación exhaustiva fenotípica y genotípica de la descendencia del reproductor seleccionado en base a las técnicas moleculares de este estudio para certificar la selección de reproductores por este método.

Adquirir reproductores de diferentes criaderos con el fin de reducir la homogeneidad de los caracteres moleculares e incrementar la variabilidad genética de la especie dentro del criadero de la Hda. "El Prado".

Utilizar fragmentos del gen mitocondrial citocromo b de mayor divergencia para la elaboración de primers que permitan investigar más profundamente el uso del gen citocromo b en la selección de reproductores.

Evaluar molecularmente a cuyes silvestres y criollos del país para identificar caracteres morfológicos, de comportamiento y particularmente moleculares que ayuden a incrementar la variabilidad genética en cuyes mejorados y permitan conservar material genético para análisis futuros.

Aplicar esta técnica a otros sistemas de explotación a fin de comprobar su eficiencia en la selección de reproductores y su aporte en la aplicación de programas para mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

Benson Institute. 2005. Como seleccionar animales. Benson Agriculture & Food institute & Corporation. [En línea]. Utah, USA. Pp.:19. Consultado 17 de enero de 2012. Disponible en: <http://www.bensoninstitute.org/publication/lessons/SP/Animal/pdf/Seleccionar.PDF>

BROWN, T. A. 2008. Genomas. 3ra edición. Traducido por Editorial Médica panamericana. [En línea]. Buenos Aires, Argentina. Pp.:760. Consultado 18 de diciembre de 2011. Disponible en: <http://books.google.com.ec/books?id=4tYlcMOdsBwC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

BURGOS, P. W, ROSERO, C. G, CÁRDENAS, H. H y SOLARTE, P. C. 2007. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® para la especie *Cavia porcellus* Lin. (Rodentia: Caviidae). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. [En línea]. 20 (1): 67 – 72. Consultado 12 de agosto de 2010. Disponible en: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/259/257>

BURGOS, P. W, CERÓN, M. y MORENO, O. M. 2010. Comparación de métodos para la extracción de ADN en cuyes (*Cavia porcellus* Rodentia, caviidae). *Livestock Research for Rural Development* 22(4). Consultado en 22 de julio de 2010. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd22/4/burg22081.htm>

CASALLA, D. R. 2003. Medición de distancias genéticas en poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la costa ecuatoriana. [CD-Rom]. Tesis (Magister en Ciencias). Guayaquil - Ecuador. Escuela Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Consultado 2 de agosto de 2010. 68 p.

CHAUCA, L. 1997. Producción de Cuyes (*Cavia porcellus*). Estudio de la FAO Producción y Sanidad Animal. [En línea]. La Molina – Perú. 77 p. Consultado 21 de julio de 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s.htm#TopOfPage>

_____. 1999. Importancia de la crianza de cuyes en Latinoamérica y sistemas de producción. [En línea]: In Memorias del V Curso y Congreso Latinoamericano de Cuyecultura y Mesa Redonda sobre Cuyecultura Perubiana. Ed. FUDECI. Puerto Ayacucho, Venezuela. 159 p. Consultado 21 de julio de 2010. Disponible en: <http://www.fudeci.org.ve/adds/congreso.pdf>

CHAUCA, L. MUSCARI, J. y HIGAONNA, R. 2005. Informe final – Sub Proyecto: “Generación de líneas mejoradas de cuyes de alta productividad”. INIA – INCAGRO. [En línea]. Perú. 165 p. Consultado el 02 de mayo de 2011. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/documentos/INIA-INCAGRO2005.pdf>

CHAUCA, L. 2007. Realidad y retrospectiva de la crianza de cuyes en los países andinos. [En línea]: In Archivo Latinoamericano de Producción animal. Vol. 15 (Supl. 1). XX Reunión ALFA. XXX Reunión APPA. Cusco - Perú. Consultado el 02 de mayo de 2011. Disponible en: http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/s_cuyes.pdf

CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F. Pp.: 18

DI FINIZIO, A. y GIGLIANO, S. 1999. The Cannabis sativa L. fingerprint as a tool in forensic investigations. Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Napoli Federico II. [En línea]. Naples – Italia. Consultado el 23 de mayo de 2011. Disponible en: http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1997-01-01_1_page007.html

EGUIARTE, L. SOUZA, V. y AGUIRRE, X. comps. 2007. Ecología Molecular. Primera edición. SEMARNAT, CONABIO. [En línea]. México, D.F. 608 p. Consultado el 17 de mayo de 2011. Disponible en:

http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/dinamica_de_poblaciones/gente_dinapob/meli/papers_pdf/libro_ecologia_molecular.pdf

- ESQUIVEL, J. 1994. Criemos Cuyes. Cuenca – Ecuador. IDIS. 212 p.
- FALCONER, D. S. y MACKAY, T. 2006. Introducción a la Genética Cuantitativa. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza – España. 469 p.
- GONZALES, C. F. 2007. Máxima parsimonia en la inferencia filogenética de ADN. [En línea]. CEAMISH – UAEM, México. Consultado 14 de septiembre de 2010. Disponible: http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Cursos2RMBF/PDFs/C1/Tema6_parsimonia.pdf
- GONZALEZ, D. O, PALACIOS, N. y TOHME, J. 1995. Protocolos para Marcadores Moleculares. [En línea]. CIAT. Cali – Colombia. 78 p. Consultado 2 de agosto de 2010. Disponible en: http://books.google.com.ec/books?id=2nyMXGvboDcC&pg=PA31&dq=marcadores+moleculares&hl=es&ei=ZVJWTLeYI4H88AbG_4y0BA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CCsQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false
- GUEVARA, L. 2004. Evaluación de algunas regiones del ADNmt para analizar relaciones filogenéticas y variabilidad genética en *Cynomys mexicanus* y *Spermophilus spilosoma* (Rodentia: Sciuridae). [En línea]. Tesis Maestro en Biología. Iztapalapa - México, Universidad Autónoma

Metropolitana. 129 p. Consultado 14 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://148.206.53.231/UAMI10876.pdf>

GUIYOU, H.R. 2006. Selección de reproductores bovinos. [En línea]. 6ta Jornadas Nacionales Cría Bovina Intensiva. Argentina. 12p. Consultado 21 de octubre de 2011. Disponible: http://www.produccion-animal.com.ar/genetica_seleccion_cruzamientos/deps/10-reproductores.pdf

GUZMÁN, C. 2000. Caracterización de fenotipo y genotipo de cuyes *Cavia porcellus* para la determinación de razas o tipos. Tesis Ingeniero Agropecuario. Sangolquí – Ecuador, Escuela Politécnica del Ejército. 129 p.

HIDALGO, V., MONTES, T., CABRERA, P., MORENO, A., 1999. Crianza de cuyes. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Zootecnia Lima – Perú. 80 p.

INVITROGEN. 2006. Low DNA mass ladder. Cat. No. 10068–013. [En línea]. 24 p. Consultado en 17 de noviembre de 2011. Disponible en: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/aflpi_man.pdf

LASLEY, J. F. 1987. Genética del Mejoramiento del Ganado. UTHEA NORIEGA EDITORES. México, D.F., 378 p.

LÓPEZ, C. E Y PÉREZ, S. G, 1999. Métodos de análisis en la Reconstrucción Filogenética. [En línea]. Bol. SEA, Sociedad Entomológica Aragonesa 26: 45 -56. Consultado 14 de septiembre del 2010. Disponible: <http://entomologia.rediris.es/sea/bol/vol26/s1/articulo/index.htm>

MAGAP. 2000. III Censo Nacional Agropecuario – Resultados Nacionales. Tabla 45: Número de UPAs por tamaños, según existencia de otras especies animales. [En línea]. Consultado el 02 de mayo de 2011. Disponible: <http://www.magap.gob.ec/sigagro/censo/resultados/nacional.htm>

MANTILLA, J. 2009. Mejoramiento Genético y Conservación de Cuyes Nativos en el Perú. Universidad Nacional de Cajamarca, Facultad de Medicina Veterinaria. [En línea]. Sirivs. Cajamarca – Perú. 5 p. Consultado en 22 de julio de 2010. Disponible en: http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/files/cuy_mantilla.pdf

MEDINA, M. Espectroscopía de emisión: Fluorescencia. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias. [En línea]. 21 p. Consultado en 18 de diciembre de 2011. Disponible en: <http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/Emi.pdf>

MENESES, A. 2010. Mitocondria. Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina. [En línea]. Medellín – Colombia. Consultado en 19 de julio de

2011. Disponible en: <http://andresbcdc.blogspot.com/2010/10/la-mitocondria-es-una-organela-celular.html>

MONCAYO, G. R. 1999. Crianza comercial de cuyes y costos de producción. [En línea]: In Memorias del V Curso y Congreso Latinoamericano de Cuyecultura y Mesa Redonda sobre Cuyecultura Perubiana. Ed. FUDECI. Puerto Ayacucho, Venezuela. 159 p. Consultado 21 de julio de 2010. Disponible en: <http://www.fudeci.org.ve/adds/congreso.pdf>

NICHOLAS, F. W. 1990. Genética Veterinaria. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza – España. 618 p.

NUÑEZ, M. 2010. Evaluación productiva de cuyes con polidactilia. Tesis Ingeniero Zootecnista. Riobamba – Ecuador, Escuela Politécnica de Chimborazo. 92 p. [En línea]. Consultado 13 de septiembre de 2011. Disponible:
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1186/1/17T0979.pdf>

OCHOA, L; ORTIZ, M. Y TINOCO, P. 2005. Mutaciones en el citocromo b que modifican la unión del ubiquinol entre el complejo del citocromo bc1 y confiere resistencia a drogas antimalariales en *Saccharomyces cerevisiae*. [En línea]. Consultado 13 de septiembre de 2011. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/6184587/Mutaciones-en-el-citocromo-b-que-modifican-la-union-del-ubiquinol-entre-el-complejo-del-citocromo-bc1-y-confiere-resistencia-a-drogas-antimalariale>

QUARIN, C. 2003. El genoma extranuclear. UNNE. Facultad de Ciencias Agrarias. [En línea]. Argentina. Consultado el 14 de julio de 2011. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/genetica/extranuclear.htm>

RICO, E. y RIVAS, C. 2003. Manual sobre el manejo de cuyes. Benson Agricultura & Food Institute. [En línea]. Utha – USA. Pp: 51. Consultado el 23 de enero de 2012. Disponible en: <http://bensoinstitute.org/Publication/Manuals/SP/manejodecuyes.pdf>

RIQUELME, A. 2001. Biosíntesis de las moléculas de la vida. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. [En línea]. Chile. 42 p. Consultado el 02 de mayo de 2011. Disponible en: http://www.google.com.ec/search?hl=es&rlz=1T4ADSA_enEC425EC432&biw=1345&bih=483&q=transcripcion+y+traduccion+de+ADN&oq=transcripcion+y+traduccion+de+ADN&aq=f&aql=&aql=&gs_sm=e&gs_upl=2510115132101551281010101010101

ROBAYO, J. 2008. Perfil del cuy. [En línea]. Ecuador. 21 p. Consultado el 02 de mayo de 2011. Disponible en: http://www.pab.ec/document/perfiles/PM_CUY.pdf

RODRIGUEZ, A. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum spp.*, asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. [En línea]. Tesis Microbiólogo Industrial. Bogotá – Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 126 p.

Consultado 14 de septiembre de 2010. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>

ROSALES, I. 2002. Diagnóstico de enfermedades en plantas: uso de herramientas moleculares. [En línea]. Unidad de Biotecnología INIA-CRI. Perú. 14 p. Consultado 12 de septiembre de 2010. Disponible en:
http://www.inia.cl/biotecnologia/news/Biotecnologia_en_diagnostico_enfermedades.pdf

ROSAS, C. 2009. Caracterización Morfológica y Molecular de Poblaciones de *Colletotrichum sp.* Asociadas con *Lupinus mutabilis* en Ecuador. Tesis Ingeniero Agropecuario. Sangolquí - Ecuador, ESPE. 120 p.

SAMANIEGO, V. 2004. Análisis de Fenotipo Cualitativo y Cuantitativo en Cuyes de Totoras, Santa Rosa y Ceballos, durante las Etapas de Gestación – Lactancia y Crecimiento – Engorde. Tesis Ingeniero Zootecnista. Riobamba - Ecuador, ESPOCH. 99 p.

SOLARTE, P. C. y ROSERO, G. C. 2008. Aplicaciones Actuales y Potenciales de Genética en Producción Animal. [En línea]. TENDENCIAS, Revista de la Facultad de Ciencias Económica y Administrativas Universidad de Nariño 9(2): 1 – 19. Consultado 2 de agosto de 2010. Disponible en:
<http://www.udenar.edu.co/general/tendencias/contenidos/Vol9.2/SOLARTE.pdf>

- SOLARTE, P. C, CÁRDENAS, H. H, ROSERO, G. C. y BURGOS, P. W. 2007. Caracterización Molecular de Tres Líneas de *Cavia porcellus* mediante la aplicación de AFLP. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. [En línea]. 20 (1): 49 – 58. Consultado 22 de julio de 2010. Disponible: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/viewFile/257/255>
- SPOTORNO, A. E., VALLADARES, J. P., MARIN, J. C., y ZEBALLOS, H. 2004. Molecular diversity among domestic guinea-pigs (*Cavia porcellus*) and their close phylogenetic relationship with the Andean wild species *Cavia tschudii*. [En línea]. Revista Chilena de Historia Natural 77: 243 – 250. Consultado 16 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rchnat/v77n2/art04.pdf>
- SPOTORNO, A. E., MARIN, J. C., MANRÍQUEZ, G., VALLADARES, J. P., RICO, E., y RIVAS, C., 2006. Ancient and modern steps during the domestication of guinea pigs (*Cavia porcellus* L.). [En línea]. JOURNAL OF ZOOLOGY 270 (1): 57-62. Consultado 09 de enero de 2012. Disponible en: http://200.89.70.78:8080/jspui/bitstream/2250/6266/1/Spotorno_AE.pdf
- TIRIRA, D. 2007. Mamíferos del Ecuador: Guía de campo. Ediciones Murciélago Blanco. Quito. Pp.: 30 - 31.
- VARGAS, A. F. 2005. Ventajas del uso de marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético en camarón. [En línea].

Panorama Acuícola No. 15-6. Consultado en 3 de septiembre de 2010.
Disponible:http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2005/01/01/ventajas_del_uso_de_marcadores_moleculares_en_los_programas_de_mejoramiento_genetico_en_camaron.html

VÁSCONEZ, C. y VÁSCONEZ, D. 2003. Curso de cuyecultura. Ministerio de Agricultura y Ganadería. [CD-Rom]. Quito – Ecuador. Consultado 21 de julio de 2010.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. y ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. [En línea]. Wageningen, The Netherlands. Nucleic acids Research. 23 (21): 4407 – 4414. Consultado 16 de agosto de 2010. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/pdf/nar00021-0189.pdf>

ZHENG Z., SCOTT S., LUKAS W., y WEBB M. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. [En línea]. J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14. Consultado 9 de febrero de 2012. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>