



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA CON MARCADORES MOLECULARES DE TIPO MICROSATELITE EN EL GANADO BOVINO DE LA REGION PUNO PROVINCIA DE AZANGARO.

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Genética y Mejoramiento Animal	Ciencia y Producción Animal	4.04.02

3. Duración del proyecto (meses)

12 meses

4. Tipo de proyecto

Individual	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input checked="" type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Titi Pacosoncco, Jesus Angel
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	948075670
Correo Electrónico	jtiti@unap.edu.pe

I. Título: Análisis de la diversidad genética con marcadores moleculares de tipo microsatélite en el ganado bovino de la región Puno provincia de Azángaro.

II. Resumen del Proyecto de Tesis

En el presente trabajo de investigación se realizará el análisis de la diversidad genética con marcadores moleculares de tipo micro satélite en el ganado bovino; el objetivo será determinar la diversidad genética con marcadores moleculares de tipo micro satélite en el ganado bovino de la región Puno provincia de Azángaro, donde se estimará la diversidad genética entre y dentro de los núcleos raciales del ganado Brown Swiss y Criollo. Para el análisis se utilizarán 15 marcadores de tipo micro satélite para determinar la diversidad genética en 138 bovinos de los cuales 69 vacas de la raza Brown Swiss y 69 criollo entre machos y hembras distribuidos en 15 distritos de la provincia de Azángaro; a partir de muestras de sangre donde



se determinarán muestras de ADN y se calcularán las frecuencias alélicas, parámetros genéticos poblacionales como prueba de heterocigosis, contenido de información polimórfica e índice de consanguinidad; además determinar la varianza molecular y distancia genética; los cuales serán utilizadas para estudios de diversidad, identificación individual de animales, verificación de parentesco, selección asistida por marcadores genéticos, estimar consanguinidad, determinación de especies y estudios de trazabilidad. Los diferentes estadísticos serán desarrollados con software transiluminador invitrogen y los resultados de mucha importancia para generar programas de mejoramiento genético en vacunos.

- III. Palabras claves (Keywords): ADN; Brown swiss; Criollo; Marcadores moleculares; Diversidad genética.

IV. Justificación del proyecto

La variabilidad genética animal es indispensable cuando se pretende realizar la conservación de los recursos zoo genéticos, el cual constituye como base para los procesos de selección y mejora genética (Bejarano et al. 2012). en bovinos, la pérdida de esta diversidad también pone en riesgo la desaparición de ciertas razas y limita el progreso genético a futuro (Pizarro et al. 2009) reduciendo la posibilidad para hacer frente a nuevas condiciones ambientales. de manera que existe un consenso en la conservación de ciertas razas domésticas explicado por el acervo genético contenido en aquellas introducidas décadas atrás y que cumplen un proceso de adaptación en su ecosistema (Barker 2001).

En el Perú en los últimos 50 años el Registro Genealógico y Zootécnico del Perú, ha realizado un trabajo superficial sin realizar un seguimiento riguroso del árbol genealógico del bovino de la raza Brown swiss; además en la Región Puno se ha formado la competencia con la creación de la Asociación de Criadores Ganado Registrado (ASCRIGAR) de forma similar otorga registros genealógicos dudosos; con esta información y a la aplicación de técnicas reproductivas sin llevar registros reproductivos y productivos es posible que el ganado bovino tiende a obtener una alta consanguinidad, bajos índices productivos y reproductivos, finalmente posibles aberraciones genéticas. Sin embargo, el acervo genético del ganado criollo ha disminuido por efecto de selección artificial de cruzamientos dirigidos con fines productivos, hecho que conlleva a pérdida de rasgos adaptativos propios del ganado criollo. En el Perú y específicamente en la Región Puno los estudios con marcadores de ADN en ganado bovino son pocos y se han realizado con muestras de tamaño reducido por lo que no refleja la diversidad genética de la población bovina por ello con el presente estudio se calcularán las frecuencias alélicas, parámetros genéticos poblacionales como prueba de heterocigosis, contenido de información polimórfica e índice de consanguinidad; además determinar la varianza molecular y distancia genética; los cuales serán utilizadas para estudios de diversidad, identificación individual de animales, verificación de parentesco, selección asistida por marcadores genéticos, estimar consanguinidad, determinación de especies y estudios de trazabilidad.



V. Antecedentes del proyecto.

(Piñero, Barahona, Eguiarte, Rocha-Olivares, & Lizana, 2008). Estudios reportan sobre la diversidad genética de las poblaciones bovinas, las cuales son caracterizadas fenotípica y genéticamente por lo general, tienen como objetivo estimar parámetros que permitan analizar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, logrado a través de la determinación de las frecuencias alélicas por población y por *locus*, el cálculo de la heterocigosidad observada y esperada, la determinación de las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos y los análisis de estructura de la población.

(Southey, Heyen, & Lewin, 2002) Menciona que los primeros marcadores desarrollados fue en la década finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas (antígenos e isoenzimas), con ello se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, razas y poblaciones de distinto origen geográfico permitiendo la realización de estudios para detectar hibridación de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

(Animali, Pariset, Savarese, Cappuccio, & Valentini, 2006) determinan los marcadores moleculares se utilizan en trabajos muy diversos como en la caracterización racial estableciendo relaciones entre diversas razas bovinas, consanguinidad, migración, filogenia; y estudios relacionados con el tamaño efectivo de las poblaciones. También han resultado muy útiles en la selección asistida por marcadores y la generación de mapas cromosómicos.

(MacHugh, Shriver, Loftus, Cunningham, & Bradley, 1997) analizaron 20 microsatélites en diferentes poblaciones bovinas africanas, europeas y asiáticas, y encontró que 10 de esos marcadores evaluados presentaron diferente distribución alélica cuando fueron analizados en poblaciones de raza cebú y taurus, mostrando alelos únicos presentes en diferentes frecuencias, en estas dos poblaciones. La presencia de alelos cebú específicos, refleja una amplia diferencia entre poblaciones taurinas y cebuínas, lo que confirmó la hipótesis del origen separado de domesticación para estos dos grupos.

(Cervini, Henrique-Silva, Mortari, & Matheucci, 2006) realizaron un estudio sobre la variabilidad genética con 10 marcadores microsatélites para la caracterización de una raza brasilera de *Bos indicus*. Donde las frecuencias alélicas revelaron que no fueron igualmente polimórficos y las probabilidades de exclusión y el contenido de información polimórfica en el mismo *loci* en esta raza fueron menores que en las razas de *Bos taurus*. Se destacan además significativas desviaciones del equilibrio Hardy–Weinberg para seis *loci*, causada por la deficiencia de heterocigotos, hecho que responde a diferentes factores, incluyendo alelos nulos, apareamiento selectivo, efecto Wahlund, selección en contra de los heterocigotos, endogamia o una combinación de estos.



(Bejarano, Pedraza, M-Rocha, & Martínez, 2012) determinaron la variabilidad genética de la raza Romosinuano distribuida en diferentes zonas geográficas de Colombia analizando 12 marcadores microsatélites donde los índices de fijación indicaron un déficit de heterocigotos. En general se encontró que existe una alta variabilidad genética entre las poblaciones, pero valores moderados de homocigosidad dentro de ellas, por lo que indican que es necesario dar más relevancia al manejo de este flujo genético para reducir la consanguinidad.

(Mejía, Hernández, Rosero, & Solarte, 2015) en cinco razas de ganado bovino del trópico alto de Nariño en Colombia usaron once loci microsatélites en las razas Holstein, Jersey, Normando, Pardo suizo y el ganado Criollo. La diversidad genética reflejada en el número de alelos por locus ($NPA = 10$) y la heterocigosidad observada ($H_o = 0.7$) fue alta, siendo mayor para la raza Criolla. El AMOVA, evidenció una baja diferenciación genética ($F_{ST} = 0.0663$) para la población total, con una pequeña diferenciación entre Criollo y Holstein (0.006), también determinaron el grado de absorción del núcleo Criollo del 56% por la raza Holstein. La alta diversidad, supone procesos de adaptación a diferentes ambientes y mezcla de razas, facilitando un continuo flujo genético.

(Uffo et al., 2006) en un estudio presenta la estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano: Criollo de Cuba, Cebú Cubano y Siboney de Cuba, para los loci de seis proteínas lácteas (CASA1, CASAB, CASA2, CASK, LAA y LGB). Analizaron 150 bovinos, mediante análisis de ADN por PCR-RFLP. Donde calculan las frecuencias alélicas para cada locus así como condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg e identifican los alelos CASA1C y LAAA como evidencia de la presencia de genes de *Bos indicus* en las tres poblaciones cubanas y comprueba la existencia de elevada variabilidad en cada población y recomienda estos resultados para trazar estrategias de mejoramiento y conservación genética.

(R. D. Martínez, E.N. Fernández, A.M. Bróccoli, & Delgado, 2005) Realizaron la genotipificación de treinta y seis bovinos criollos de origen patagónico en Argentina en diecisiete microsatélites donde calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, el contenido de información polimórfica (PIC), el estadístico FIS, el número de alelos (n_a), la heterocigosidad observada (h_o) y la heterocigosidad esperada (h_e). Los resultados fueron: n_a , 4,88; H_o : 0,6050, H_e : 0,6222, Fis : 0,0135 y PIC : 0,60. Las mayores heterocigosidades medias esperadas (h_e) se encontraron en los loci CSSM66 (0,7948) y TGLA227 (0,7878).

(Aquino, Veli, & Seoane, 2008) Analizaron un total de 326 bovinos Criollos procedentes de las regiones de Puno, Ayacucho y Junín, con el objetivo de conocer la variabilidad genética de estas poblaciones y utilizaron cinco marcadores microsatélites: BM1818, BM1824, ETH225, ILSTS005 e ILSTS006; identificándose un total de 27 alelos. La heterocigosidad esperada



total fue de 0,7; se reportan los de resultados del análisis de frecuencias alélicas y diferenciación genética.

(Vallejo, Risco, Yalta, & Veli, 2014) en un estudio sobre la diversidad genética mitocondrial de 510 bovinos criollos de 46 localidades en 7 regiones del país (Ancash, La Libertad, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac y Puno), fue analizada un total de 26 haplotipos fueron identificados con 27 sitios polimórficos; los niveles de diversidad genética (π) y haplotípica (h) fueron altos para todas las regiones estudiadas, especialmente Ancash y Apurímac, y con niveles más bajos en la región de Junín. La diferenciación genética fue muy baja entre regiones y el test de Mantel no arrojó ningún tipo de correlación espacial.

(Condori Y. 2011) Realizo un estudio de diversidad genética de los bovinos cebú y cebuizados de la Estación Experimental Agropecuaria Satipo, mediante la técnica RAPD, donde encontro 37 polimórficas y 14 monomórficas; el coeficiente de endogamia fue $\Delta F = 0.009$; la Heterocigocidad esperada $H_e = h^* = 0.2110$ teniendo un índice de diversidad genética $h^* = 0.2076$, y para los fenotipos raciales: Nellore un índice de diversidad genética $h^* = 0.2146$, para Brown Swiss/Nellore tenemos un $h^* = 0.2063$, para Brown Swiss se obtiene un $h^* = 0.1348$, para Brown Swiss/Gyr un $h^* = 0.1440$, para Nellore/Simmenthal encontramos un $h^* = 0.1888$ y para Simmenthal un $h^* = 0.1521$.

VI. Hipótesis del trabajo (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

La población bovina de la Región Puno provincia de Azángaro, será polimórfica para los microsatélites amplificados y presentaran un PIC superior a 0.5 y la diversidad será alta en las razas, medida en el número de alelos y la heterocigosidad observada, estará similar a la encontrada para razas de *Bos taurus* en América Latina. Por su parte, la raza criolla presentara la heterocigosidad y el número de alelos más alta de las razas Brown swiss y al estimar el índice FST indicaran que las razas presentaran una moderada diferenciación genética con los análisis de agrupamiento e indicaran una mezcla genética entre las razas. Además, se observarán la presencia de dos poblaciones genéticas, con un claro agrupamiento de las razas Brown Swiss y criolla. Donde el núcleo racial criollo presenta un alto nivel de absorción por parte de la raza Brown Swiss

VII. Objetivo general

Determinar la diversidad genética con marcadores moleculares de tipo microsatélite en el ganado bovino región Puno provincia de Azángaro

VIII. Objetivos específicos

- Estimar la diversidad genética entre y dentro de los núcleos raciales Brown Swiss y Criollo de la región Puno provincia de Azángaro.
- Establecer el grado de absorción del núcleo criollo de la región Puno



IX. Metodología de investigación

9.1. Tipo y Diseño de la Investigación

9.1.1. Tipo de estudio.

La investigación será de tipo experimental, consistirá en determinar la diversidad genética en bovinos de la raza brown swiss y criollo a través de la determinación de las frecuencias alélicas, parámetros genéticos poblacionales como prueba de heterocigosis, contenido de información polimórfica e índice de consanguinidad; además determinar la varianza molecular y distancia genética de los animales estudiados.

9.1.2. Diseño de estudio.

A partir de muestras sanguíneas se extraerán el ADN el cual se realizara en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Sao Paulo – Invitrogen Brasil Lima según el procedimiento descrito por Cordero et ál. 2013. Se analizara de 18 marcadores, entre ellos 15 de los recomendados por FAO/ISAG (FAO 2011) para uso en bovinos: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, BM1818, CSRM60, CSSM66 y ILSTS006, más otros 3 marcadores adicionales: SPS113, RM067 y MGTG4B. Los productos de la amplificación fueron sometidos a electroforesis capilar según el procedimiento descrito por Cordero et ál. (2013). Los polimorfismos de los microsatélites serán discriminados de acuerdo con sus patrones de fluorescencia y tamaño. Los datos se procesarán mediante el software Genepop v 4.7.0 (Raymond & Rousset, 1995).

El cálculo de parámetros de diversidad genética por subgrupo racial con base en la información obtenida de los análisis de ADN se estimaran los siguientes parámetros genéticos por subgrupo racial: el número total de alelos (N_a) observados; el número efectivo (N_e) de alelos, obtenido como $N_e = 1/\sum p^2$ con p = frecuencias alélicas por marcador microsatélite; el nivel de Heterocigosis observada (H_o), obtenido como la proporción observada de individuos heterocigóticos; el nivel de Heterocigosis esperada (H_e), obtenido como $(CIP = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2)$ donde $p_i \dots p_n$ son las frecuencias de los n alelos; el Contenido de Información Polimórfica y el Coeficiente de

Consanguinidad $(F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e})$. Además se comparan las frecuencias alélicas observadas contra las frecuencias alélicas esperadas bajo equilibrio Hardy-Weinberg por medio de la prueba Chi cuadrado donde χ^2 = estadístico de prueba; f_o = frecuencias observadas y f_e = frecuencias esperadas. Los cálculos anteriores se realizaron mediante el software especializado CERVUS v.3.0 (Kalinowski et.al. 2007) y Fstat (Goudet 1995).

El Análisis de estructura genética se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA, Excoffier et ál. 1992) mediante el programa Cervus v 3.0 (Kalinowski et.al. 2007) con el fin de evaluar la existencia de diferenciación genética significativa entre las subpoblaciones bovinas formadas por los distintos grupos raciales identificados. Mediante este análisis se obtuvieron estimados de las varianzas genéticas entre razas (V_{ER}), entre individuos (V_{EI}) e intra-individuos (V_{II}). A partir de estos se calcularon los estadísticos F (Wright 1950), específicamente, $F_{ST} = V_{ER} / (V_{II} + V_{EI} + V_{ER})$, $F_{IS} = V_{EI} / (V_{II} + V_{EI})$ y $F_{IT} = (V_{EI} + V_{ER}) / (V_{II} + V_{EI} + V_{ER})$, para los cuales se obtuvo un estimado de significancia estadística mediante análisis de remuestreo (Felsenstein 1985) con 1000 permutaciones aleatorias.

Se calcularon además las distancias genéticas entre todos los pares de razas con 2 métodos diferentes: la distancia estándar (DS) de Nei (Nei 1972), calculada como $(\frac{1}{2} \sqrt{2P_x - 2P_y})$ donde P_x y P_y son las homocigosis medias sobre loci en la población X e Y, respectivamente; y los estimados de diferenciación genética R_{ST} (Slatkin 1995), que se obtuvieron mediante la fórmula: $(R_{ST} = \frac{V_{ER}}{(V_{II} + V_{EI} + V_{ER})})$, donde V_{ER} = varianza entre razas, V_{II} = varianza intra-individuos y V_{EI} = varianza entre individuos. Ambos estimados de distancia genética se calcularon mediante el programa Cervus 3.0 (Kalinowski et.al. 2007).

Para visualizar las relaciones genéticas entre las distintas subpoblaciones raciales, se construirá un dendrograma según el algoritmo Neighbor Joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) con la medida de distancia estándar de Nei, según se implementa en el programa Poptree2 (Takezaki et ál. 2010).

9.2. Unidad de Análisis



La unidad de análisis para el presente estudio son los bovinos de la raza Brown swiss y criollos de la provincia de Azángaro con una unidad de 138 cabezas.

9.2.1. Población de Estudio

La población total de estudio son los bovinos de las razas Brown swiss y criollo los cuales son tomados de la Dirección regional Agraria Puno del Ministerio de Agricultura y Riego que son un total de 111,050 cabezas.

9.2.2. Tamaño de Muestra

El tamaño de la muestra se estima considerando de acorde con lo indicado por Chakraborty para organismos, se estima que usualmente de 100 a 150 individuos pueden proveer un muestreo adecuado para un *locus* genético, esto sobre la base del criterio de la frecuencia mínima alélica (Chakraborty, 1996). De igual manera se considera el siguiente estadístico para definir el tamaño de la muestra (Solarte *et al.*, 2003).

$$n = \frac{Z^2 P (1-P) N}{E^2 N + Z^2 P (1-P)}$$

n = Tamaño de la muestra

Z = Grado de confiabilidad del 95%

N = Población o universo

E = Margen de error máximo admisible del 5%

P = Proporción de la población 0,9%

Teniendo como base una población total de 111,050 cabezas de bovinos en la provincia de Azangaro y sus 15 distritos los cuales procederan de las diferentes unidades operativas. Para el muestreo de los bovinos de la raza Brown swiss se tomara en cuenta los registros genealogicos del Peru y ASCRIGAR-Melgar y para la muestra de bovinos criollo se coordinara con propietarios de bovinos donde el tamaño de la muestra es equivalente a 138 cabezas, número que se encuentra dentro del tamaño considerado por Chakraborty.

9.2.3. Selección de la Muestra

La selección de la muestra se realizaran en los 15 distritos de la provincia de Azangaro Region Puno los cuales se observan en la cuadro 1



Poblacion de Ganado Bovino Provincia de Azangaro

Distrito	Total UO	Porcentaje	vacuno (cbzs)	Porcentaje	Tamaño de Muestra
Azángaro	433,865	16.01	22,130	20	27
Achaya	60,805	2.24	3,950	4	5
Arapa	155,54	5.74	9,450	8	12
Asillo	222,525	8.21	11,170	10	14
Caminaca	69,145	2.55	4,550	4	6
Chupa	103,695	3.83	6,750	6	8
JD Choquehuanca	50,345	1.86	2,250	2	3
Muñani	400,165	14.77	9,840	9	12
Potoni	247,195	9.12	5,580	5	7
Samán	107,84	3.98	7,540	7	9
San Antón	288,955	10.67	3,670	3	5
San José	268,565	9.91	10,270	9	13
S. J. Salinas	58,495	2.16	2,810	3	3
Stgo.de Pupuja	122,3	4.51	6,450	6	8
Tirapata	120,78	4.46	4,860	4	6
Total	2'710,215	1	111,270	100	138

Fuente: Direccion Regional Agraria Puno-MINAGRI-2016

9.2.4. Analisis e interpretacion de la informacion

El análisis e interpretación de datos del estudio de diversidad genética de la población de bovinos de la provincia de Azángaro región Puno que de acuerdo a las relaciones genéticas entre diferentes subpoblaciones se pueden inferir a partir de los datos de las frecuencias de los alelos. Recientemente, los datos del ADN de microsatélites son ampliamente utilizados para los estudios de genética de poblaciones en diversos organismos, debido a su alto grado de polimorfismo genético (Estoup et ál. 2002).

Para comparar la diferenciación existente entre subpoblaciones raciales entre el Brown swiss se utilizaran índices de distancia genética tales como los estadísticos *F* (Wright 1965, Nei 1977, Weir y Cockerham 1984), que permiten establecer comparaciones, determinar relaciones filogenéticas y analizar la estructura de la población

9.3. METODOS Y TECNICAS

9.3.1. Toma de muestras

Se tomaran 5 ml de sangre de cada individuo mediante punción en la vena coccígea, y seran almacenados en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante. Las muestras se transportaron en nevera con hielo seco hasta el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Cayetano Heredia Lima, donde se almacenaran a una temperatura promedio de 4°C hasta realizar la extracción de ADN.

9.3.2. Extracción de ADN

La obtención de ADN se realizara mediante el método *Salting Out* descrito por Sambrook y Rusell (2001) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Sao Paulo – Invitrogen Brasil. La cuantificación de ADN se llevara por un espectrofotómetro (Jenway, Génova), por medio de la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm y además por comparación visual con una muestra control de concentraciones conocidas y equivalentes a 100 ng/pl y 10 ng/ pl (Biorad). La extracción de ADN a partir de muestras de sangre conservadas en tarjetas FTA, se realizó usando el kit FTA® de Whatman Bioscience. El ADN contenido en cuatro discos de 1.2mL fue obtenido por calentamiento a 95°C durante 30 minutos, en 30 pl de agua ultrapura libre de nucleasas.

9.3.3. PCR loci microsatélites

De acuerdo a lo recomendado por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) y la FAO, se Utilizaran 15 microsatélites para ser analizados usando el Kit *Stockmarks for Cattle Bovine Ge-notyping* (Applied Biosystems, División Perkin-Elmer, Foster City, CA), descritos en la acontinuacion:

Para uso en bovinos: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, BM1818, CSRM60, CSSM66 y ILSTS006, más otros 3 marcadores adicionales: SPS113, RM067 y MGTG4B. Los productos de la amplificación serán sometidos a electroforesis capilar según el procedimiento descrito por Cordero et ál. (2013)

La reacción de amplificación se llevara en el termociclador Mycler de Biorad™, usando una fase de denaturalización inicial de 15 min a 95°C, seguido por 31 ciclos de 45" a 94°C, 45" a 61°C y 1 min a 72°C para la hibridización. Una extensión final fue programada a 72°C por 1 h y luego a 25°C por 2 h. Los productos amplificados serán visualizados en geles de agarosa al 2% y



posteriormente identificados por detección de fluorescencia, mediante electroforesis capilar en secuenciador automático.

X. Referencias

Alderson, L. (2003). Criteria for the recognition and prioritisation of breeds of special genetic importance. *Agri*, 33, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S101423390000537X>

Animali, P., Pariset, B. L., Savarese, M. C., Cappuccio, I., & Valentini, A. (2006). Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy, *120*(2003), 425–432.

Aquino, Y. N., Veli, E. A., & Seoane, E. R. (2008). Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites, 3–6.

Barker, J. S. F. (2001). Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. *Canadian Journal of Forest Research*, 31(4), 588–595. <https://doi.org/10.1139/cjfr-31-4-588>

Bejarano, D., Pedraza, A., M-Rocha, J. F., & Martínez, R. (2012). Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(1), 97–107.

Bustinza, V. 2001,a. La alpaca: Conocimiento del gran potencial andino. Libro 1. Publicación del IIPC-FMVZ UNA Puno, Perú.

Caravaca, F. M. Castle, L. Guzmán, M. Delgado, Y, Merca, M. Alcalde y P.

Gonzales; 2005. Bases de la Producción Animal. UN Córdoba, UN Sevilla y U de Andes. Sevilla España.

Cervini, M., Henrique-Silva, F., Mortari, N., & Matheucci, E. (2006). Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nellore cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular Biology*, 29(3), 486–490. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000300015>

Condori Y. (2011). USO DE MARCADORES MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN BOVINOS DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA SATIPO, 1–87.

Escurra, E. (2001). Situación de la ganadería lechera en Cajamarca. *Rev. Inv. Vet. Perú* Vol 12(2): 21-26.

FAO. (2010). *LA SITUACIÓN DE LOS RECURSOS ZOOGENÉTICOS*



Flórez, A. M. (2001). Producción lechera en la irrigación de Majes-Arequipa. Un sistema de alimentación para vacas lecheras en áreas de irrigación. *Rev. Inv. Vet. Perú*; 12(2):14 -20 pág.

Holmes C, y G Wilson, 1989; Producción de Leche en Praderas. Editorial Acribia; España

IV CENAGRO. (2012). *IV CENAGRO. 2013. Resultados finales del IV Censo Nacional Agropecuario. INEI, Lima Perú.*

MacHugh, D. E., Shriver, M. D., Loftus, R. T., Cunningham, P., & Bradley, D. G. (1997). Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, 146(3), 1071–1086.

Martínez, R. A., García, D., Gallego, J. L., Onofre, G., Pérez, J., & Cañón, J. (2008). Genetic variability in Colombian Creole cattle populations estimated by pedigree information. *Journal of Animal Science*, 86(3), 545–552. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0175>

Martínez, R. D., E.N. Fernández, A.M. Bróccoli, & Delgado, J. V. (2005). Variabilidad Genética En El Ganado Bovino Criollo Argentino De Origen Patagónico. *Arch. Zootec.*, 54(January 2014), 415–421.

Mejía, L. G., Hernández, R. A., Rosero, C. Y., & Solarte, C. E. (2015). Análisis de la diversidad genética de ganado bovino lechero del trópico alto de Nariño mediante marcadores moleculares heterólogos de tipo microsatélite. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(3), 18–33. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v62n3.54938>

Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha-Olivares, A., & Lizana, R. S. (2008). El conocimiento de la variabilidad genética. *Capital Natural de México Vol I Conocimiento Actual de La Biodiversidad*, 415–435.

Quispe, J. (2016). The creole cattle of peruvian highlands : origin , production and perspectives. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 18, 257–270.

Rivas, E., Veli, E., Aquino, Y., Rivas, V., Pastor, S., & Estrada, R. (2007). Acciones para la caracterización y conservación del bovino criollo Peruano (*Bos taurus*). *Animal Genetic Resources Information*, 40, 33–42. <https://doi.org/10.1017/S1014233900002170>

Ruiz, L. (2010). Determinación de la variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de ganado criollo colombiano de raza romosinuano mediante marcadores moleculares tipo microsatélite, 1(2), 113.



Southey, B. R., Heyen, D. W., & Lewin, H. A. (2002). Detection of Quantitative Trait Loci Influencing Dairy Traits Using a Model for Longitudinal Data, 2681–2691.

Uffo, O., Martín, I., Martínez, S., Ronda, R., Osta, R., Rodellar, C., & Zaragoza, P. (2006). Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. *Agri*, 39(1), 15–24. <https://doi.org/10.1017/S1014233900002108>

Vallejo, A. R., Risco, R., Yalta, C., & Veli, E. (2014). Diversidad genética mitocondrial en poblaciones de bovinos criollos peruanos, 4, 68–70.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

Generar información para la construcción y conservación de especie vacuno de la región Puno. Además, para realizar pruebas de parentesco e identidad, determinara coeficiente de endogamia, pruebas de heterocigosis y diseñar un programa de mejoramiento genético.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

En la Región Puno, ubicado por encima de los 3 830 msnm, la ganadería bovina es uno de los pilares de la economía regional; y según el último censo posee 617,163 vacunos que representan el 12% de la población nacional; la misma que está conformada por animales de raza definida (Brown Swiss, 36,4%) y no definidas (Criollo y cruzados, 63,5%) (IV CENAGRO, 2012); la información de obtengamos de dicho trabajo de investigación sobre la variabilidad genética sirve para calcular las frecuencias alélicas, parámetros genéticos poblacionales como prueba de heterocigosis, contenido de información polimórfica e índice de consanguinidad; además determinar la varianza molecular y distancia genética; los cuales serán utilizadas para estudios de diversidad, identificación individual de animales, verificación de parentesco, selección asistida por marcadores genéticos, estimar consanguinidad, determinación de especies y estudios de trazabilidad esta información sirva para diseñar programas de mejoramiento genético.

ii. Impactos económicos

Con la disponibilidad de técnicas eficientes de análisis de ADN es posible medir con precisión el grado de variabilidad genética y consanguinidad en perspectiva de la productividad, existe la necesidad de caracterizar el comportamiento y la eficiencia productiva del bovino Criollo del Altiplano peruano; donde actualmente viene siendo remplazados por la raza Brown Swiss en la Región Puno provincia de Azángaro el conocimiento de coeficiente de consanguinidad y variabilidad de sus animales beneficiarían directamente a los pobladores para mejorar su



economía .

iii. Impactos sociales

La pérdida de esta diversidad no solo pone en riesgo la desaparición de ciertas razas, sino que también limita el progreso genético; por las razones descritas aún no se ha realizado estudios sobre diversidad genética de ganado bovino e inclusive a nivel nacional; tampoco existe información sobre la caracterización raciales, de esta manera mejorar la conservación de del ganado criollo y brown swiss en su medio natural.

iv. Impactos ambientales

La repoblación del ganado criollo, ayudará a generar un ecosistema sostenible junto a otras razas de ganado vacuno y especies alto andinas, generando así una fuente de alimentación ecológica.

XIII. Recursos necesarios

Servicios de procesamiento de muestra y secuenciamiento de ADN.

XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El presente trabajo se realizará en la provincia de Azángaro con 15 distritos como: Azángaro, Achaya, Arapa, Asillo, Caminaca, Chupa, José Domingo Choquehuanca, Muñani, Potoni, Samán, San Antón, San José, San Juan de Salinas, Santiago de Pupuja y Tirapata del departamento de Puno.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres												
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Elaboración y presentación del Proyecto	X												
Etapa de Ejecución													
Reunión de coordinación y sensibilización a productores	X	X											
Selección e identificación de animales		X	X										
Toma de muestras			X	X	X	X							
Envío de la Muestra			X	X	X	X							
Procesamiento de la muestra en laboratorio			X	X	X	X	X	X					
Procesamiento de datos					X	X	X	X	X	X	X		
Elaboración de informes			X		X	X		X	X		X	X	
Presentación de Informes FEDU			X			X			X				X



XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Materiales de Escritorio				
Cuaderno de campo	Unidad	1	15	15.00
Papel Bond 75gr	Millar	1	50	50.00
Lapicero	Unidad	12	2	24.00
Lapiz	Unidad	6	1	6.00
Materiales de Sujeción de Animales				
Soga x 8m	Unidad	4	8	32.00
Mocheta	Unidad	2	70	140.00
Pintura	Unidad	4	25	100.00
Materiales de Laboratorio				
Material para toma de muestra				
Tubo de ensayo descartable con EDTA x 5mLx 100unidades	Caja	2	120	240.00
Vacutainer x 100 unidades	Caja	2	100	200.00
Algodón x 500gr	Paquete	1	100	100.00
Aguja descartable N° 18	Caja	2	10	20.00
Guantes no esteriles x 100	Caja	2	50	100.00
Antiséptico alcohol a 70°C	Litro	2	20	40.00
Termo Transportador	Unidad	1	150	150.00
Gel Para refrigeración	Unidad	6	25	150.00
Marcadores microsatelite bovino	Unidad	120	100	12,000.00
Kit stockmarks para bovino	Unidad	120	18	2,160.00
Servicio de Laboratorio				
Procesamiento de muestra	Global	1	3500	3,500.00
Secuenciamiento de ADN	Global	1	18,000	18,000.00
Pasajes y viáticos	Global	15	400	6,000.00
Personal de apoyo técnico	Unidad	1	2000	2,000.00
Total				45,027.00