



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MARCADORES
MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS PARA DETERMINAR LA
VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL AVE SURI (*Rhea pennata*)**

TESIS

PRESENTADA POR:

LUZGARDA FLORES SANCHEZ

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO – PERÚ

2024



LUZGARDA FLORES SANCHEZ

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MARCADORES MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS PARA DETERMINAR LA VA...

 Universidad Nacional del Altiplano

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::8254:416906397

Fecha de entrega

17 dic 2024, 10:01 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

17 dic 2024, 10:05 a.m. GMT-5

Nombre de archivo

tesis PREGRADO Luzgarda FLORES SANCHEZ_v7.3.pdf

Tamaño de archivo

3.4 MB

71 Páginas

10,660 Palabras

59,266 Caracteres





9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 20 palabras)

Fuentes principales

- 8% Fuentes de Internet
- 1% Publicaciones
- 4% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ HUANCA Francisco
Hualey FAU 20145496170 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.12.2024 10:08:19 -05:00



Firmado digitalmente por RUELAS
CALLCAPAZA Domingo Alberto FAU
20145496170 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.12.2024 13:10:50 -05:00





DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mis difuntos padres que han sido mi guía e inspiración en todo este proceso porque sé que siempre estuvieron ahí nunca me sentí abandonada hasta ahora por ellos.

A mi asesor de tesis Mg. Francisco Halley Rodriguez Huanca por la gran paciencia y ayuda que me dio, al Lic. Angel Solis Gozar por la guiarme y apoyarme en este proyecto.

A mis hermanos Pedro, Noemy, Miguel, por apoyarme y animarme moralmente en los momentos más difíciles.

A mis amigos de la universidad “LOS PONYS” porque con ellos compartí momentos gratos.

Luzgarda Flores Sanchez.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a Dios seguidamente a mi Asesor de tesis, el Dr. Halley y al Lic. Angel, cuyas experiencias, paciencia y apoyo constante fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Su guía no solo me proporcionó claridad académica, sino también motivación en momentos de duda. Su confianza en mí me impulsó a seguir adelante y superar los desafíos.

Al Proyecto Binacional Lago Titicaca (PEBLT) y el personal del centro de conservación del Suri quienes están a cargo del manejo de los Suris.

Al Dr. Jose Luis Vilca quien apoyo con su predisposición para la realización de este trabajo de investigación.

A mi familia, su fe en mí ha sido el motor que me permitió completar este camino. A mis hermanos, por sus palabras de aliento.

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno mi alma mater, gracias por brindarme la oportunidad de crecer académica y profesionalmente. Mi gratitud también va al Departamento de Investigación Maga laboratorio área de BIOLOGIA MOLECULAR, cuyo apoyo y disposición fueron esenciales para la culminación de esta tesis. Aprecié profundamente su confianza en mi trabajo y el ambiente de aprendizaje que me ofrecieron.

A mis amigos y compañeros, gracias por su compañía y apoyo en los momentos de estrés y alegría. Ustedes fueron mi red de contención y su amistad me ayudó a mantener el ánimo en los momentos más duros. Cada uno de ustedes contribuyó a que este proceso fuera más llevadero y significativo.

A todos, gracias por ser parte de este viaje.

Luzgarda Flores Sanchez.



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
INDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
ACRÓNIMOS	
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
1.1.1. Objetivo general	17
1.1.2. Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II	
REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. MARCO TEÓRICO	19
2.1.1. Rhea pennata - Suri	19
2.1.1.1. Marcadores moleculares	21
2.1.1.2. Microsatélites	22
2.1.2. Técnicas moleculares para análisis de ADN	22
2.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
2.1.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida para ADN	23



2.1.3.	Variabilidad genética	24
2.1.3.1.	Deriva genética	24
2.1.3.2.	Cuello de botella genético.....	25
2.1.3.3.	Endogamia	25
2.2.	ANTECEDENTES.....	26
2.2.1.	Análisis de la variabilidad genética en <i>Rhea</i>	26
2.2.2.	Análisis de la variabilidad genética en Ratites.....	28
CAPÍTULO III		
MATERIALES Y MÉTODOS		
3.1.	LUGAR DE ESTUDIO.....	31
3.2.	MATERIAL EXPERIMENTAL	31
3.2.1.	Tamaño de muestra	31
3.2.2.	Materiales y equipos utilizados	31
3.3.	METODOLOGÍA	33
3.3.1.	Muestreo de plumas de suri.....	33
3.3.2.	Extracción de ADN en pluma	33
3.3.3.	Concentración del ADN.....	36
3.3.4.	Calidad del ADN.....	36
3.3.5.	Integridad del ADN.....	37
3.3.6.	PCR	38
3.3.7.	Electroforesis en desnaturalizante en geles de acrilamida	38
3.3.8.	Análisis de los geles de electroforesis.....	39
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZAR POLIMORFISMOS DE MICROSATÉLITE PARA EL AVE SURI (<i>Rhea pennata</i>) POR MEDIO DE GELES DE POLIACRILAMIDA.....	41
4.2. DETERMINAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL AVE SURI (<i>Rhea pennata</i>) CON EL USO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS MICROSATÉLITES	43
4.2.1. Determinación de las frecuencias de homocigotos y heterocigotos.....	43
4.2.2. Determinación de las frecuencias alélicas.....	45
4.2.3. Índices de diversidad genética (GST)	46
V. CONCLUSIONES.....	47
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	55

Área: Genética y Mejoramiento Animal.

Tema: Diversidad Genética en Suris *Rhea Pennata*.

Fecha de sustentación: 20 de diciembre del 2024.



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Reactivos usados para la solución de digestión	34
Tabla 2 Componentes del kit de PCR	38
Tabla 3 Componentes del gel de poliacrilamida al 20 %	39
Tabla 4 Frecuencias de homocigotos y heterocigotos	44
Tabla 5 Determinación frecuencias alélicas.....	45



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Caracterización del microsatélite RAM 14	41
Figura 2 Caracterización del microsatélite RAM 30	42
Figura 3 Caracterización del microsatélite CA5	43
Figura 4 Manejo de las plumas de Rhea Pennata	55
Figura 5 Incubación en calor a los cálamos de la pluma	56
Figura 6 Extracción de ADN mediante microcentrifugación	57
Figura 7 Evaluación de la calidad y concentración del ADN	58
Figura 8 Preparación de la poliacrilamida.	59
Figura 9 Realización del PCR para los 3 microsatélites	60
Figura 10 Electroforesis horizontal de los productos de PCR	61



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 Álbum fotográfico	55
ANEXO 2 Data obtenida del PCR	62
ANEXO 3 Marcadores microsatélites para <i>Rhea pennata</i>	65
ANEXO 4 Kit de extracción de ADN Promega (2020)	66
ANEXO 5 Declaración jurada de autenticidad de tesis.....	70
ANEXO 6 Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio institucional.....	71



ACRÓNIMOS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE:	Tris Borato EDTA.
APS:	Persulfato de amonio.
PEBLT:	Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca
SERFOR:	Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre
MMA:	Ministerio de medio ambiente de Chile
UV:	Ultravioleta
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
VNTR:	Tándem de Número Variable
SSR:	Tándem de Número Variable
STR:	Repeticiones Cortas en Tándem
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
CE:	Electroforesis Capilar



RESUMEN

El Suri, que es el ave de mayor tamaño en la región de los Andes pertenece a familia Rheidae, la cual es endémica de los Neotrópicos. El nombre científico es *Rhea pennata*. Esta se halla en una situación de grave riesgo de desaparición, además, los microsatélites son un fragmento de ADN en el que se repiten determinados motivos de ADN. Estos marcadores son muy importantes para evaluar la diversidad de poblaciones. El objetivo del presente trabajo es determinar la variabilidad genética del ave Suri (*Rhea pennata*) por medio de marcadores polimórficos microsatélites. Para ello, se recolectaron muestras de plumas en el centro de conservación del Proyecto Binacional Lago Titicaca (PELBT). En el laboratorio de Biología Molecular de la UNA Puno, se extrajo el ADN de los cálamos de las plumas. Además, la prueba de PCR para los microsatélites RAM 14, RAM 30 y CA5. Se determinó la caracterización de los polimorfismos de cada microsatélite por medio de geles de poliacrilamida al 20%. Se halló la frecuencia de heterocigotos que fue de 0.67, 0.83 y 0.95, respectivamente para los microsatélites RAM 14, RAM 30 y CA5. El índice de diversidad genética fue de 0.07, determinando que la población estudiada de 36 suris no posee una gran variabilidad genética, proponiendo que pudiera ser debido a que son poblaciones jóvenes de suris, que no hace mucho han estado en dicho hábitat. Por ello, se concluye que microsatélites RAM 14 y RAM 30 determinan en suri una diversidad genética aceptable; no obstante, el marcador CA5, tiende a determinar casi en un 100 % de heterocigotos, siendo un marcador poco confiable.

Palabras clave: *Rhea pennata*, PELBT, Microsatélites, Polimorfismos, Diversidad genética.



ABSTRACT

The Suri, which is the largest bird in the Andes region. The Rheidae family, which is endemic to the Neotropics, includes this species. The scientific name is *Rhea pennata*. The *Rhea pennata* species is in serious danger of extinction. Microsatellites are a DNA fragment in which certain DNA motifs are repeated. These markers are very important to evaluate the diversity of populations. The objective of this work is to determine the genetic variability of the Suri bird (*Rhea pennata*) by means of polymorphic microsatellite markers. For this purpose, samples of *Rhea pennata* feathers were collected from the Binational Lake Titicaca Project (PEBLT). DNA was extracted from the feather quills. PCR was carried out for the microsatellites RAM 14, RAM 30 and CA5. The characterization of the polymorphisms of each microsatellite was determined by means of 20% polyacrylamide gels. The frequency of heterozygotes was found to be 0.67, 0.83 and 0.95, respectively, for the microsatellites RAM 14, RAM 30 and CA5, values that have been corroborated with previous publications. The genetic diversity index was 0.07, determining that the studied population of 36 suris does not have a great genetic variability, suggesting that this could be due to the fact that they are young populations of suris, which have not been in this habitat for long.

Keywords: *Rhea pennata*, PEBLT, Microsatellites, Polymorphisms, Genetic diversity.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La división *Neornithes* incluye todas las aves vivas y se divide en dos subdivisiones, las paleognatas y las neognatas. El grupo paleognato incluye Tinamidae y Ratitae. Las ratites vivas incluyen el avestruz (*Struthio camelus*), el emú (*Dromaius novaehollandiae*), el rhea (*Rhea dimericana*), el kiwi (*Apteryx australis*), así como los casuarios (Casuarius). Tinamidae incluye 47 especies de Tinamous (Abbona et al., 2019; Livezey & Zusi, 2006; Sibley & Ahlquist, 1990).

Estas dos subdivisiones Tinamidae y Ratitae se clasificaron en un subgrupo separado según su morfología distintiva del paladar. Las Ratitae no tienen quilla en el esternón (esternón plano), alas reducidas y no pueden volar (Kummrow, 2015; Livezey, 1990).

La divergencia más temprana en las ratites se produjo entre el grupo avestruz-ñandú y el grupo casuario-emú-kiwi hace 80-81 millones de años. Sin embargo, esto no fue consistente con el momento de la desintegración de la masa terrestre de América del Sur, la Antártida y Australia, que fue alrededor de 90 millones de años. Se estimó que el kiwi se separó de la rama casuario-emú alrededor de 40-45 millones de años. La dicotomía entre el ñandú y el avestruz se amplió durante 80 millones de años basándose en la separación de África de América del Sur (J. V. Smith et al., 2013; Sibley & Ahlquist, 1990).

Se utilizaron los genes ribosómicos mitocondriales completos (2,8 kb) de representantes de Ratitae. Aunque el intervalo genómico es menor a lo reportado previamente, los resultados fueron similares: sumaron el factor de la tectónica de placas



y la biogeografía de los progenitores *Ratitae*. En el momento en cuestión (alrededor de 90 millones de años) se produjeron importantes movimientos tectónicos que podrían ayudar a limitar las posibles soluciones. América del Sur y África se separaron hace aproximadamente 100 millones de años y una sugerencia reciente propone que América del Sur permaneció en contacto con Australia a través de la Antártida durante 30 a 40 millones de años más (Coldiron, 2023; Härlid et al., 1997; Smith et al., 2004; Van Tuinen et al., 1998).

Se propusieron dos alternativas para la dispersión de *Ratitae*. El primero sugiere una hipótesis de origen africano. *Ratitae* existió en los continentes africano y sudamericano y por la separación de los continentes se estableció el linaje *Tinamidae* en Sudamérica. En los siguientes 30 millones de años, las ratites se trasladaron a Laurasia y dejando en África los linajes *Struthio*. El linaje *Rhea* probablemente se estableció después de la migración desde Asia a través de América del Norte hasta América del Sur. El linaje australiano sería producto de la migración de *Rhea* a través del puente terrestre de la Antártida (Mitchell et al., 2014; Van Tuinen et al., 1998).

La segunda explicación sugiere un origen sudamericano tras la separación de África, dejando atrás el linaje *Tinamidae*, los linajes *Struthio* podrían trasladarse a Asia a través de América del Norte. Finalmente, los linajes *Struthio* llegaron a África desde Asia. Una segunda ola de migración desde América establecería el linaje australiano. Estas dos explicaciones se basan en la dispersión por puentes terrestres y la falta de capacidad de vuelo. Son posibles otras explicaciones, pero estos dos modelos se ajustan a los datos moleculares con respecto a la filogenia problemática de las ratitas (Mitchell et al., 2014; Van Tuinen et al., 1998).



Hasta ahora, la datación de la divergencia entre neognatos y paleognatos sigue siendo una cuestión de ambigüedad y se requiere un examen más detenido. En el futuro, se necesitarían genes nucleares adicionales para resolver la discusión. Para resolver la cuestión filogenética a través del genoma nuclear se debe identificar una gran cantidad de genes neutros para reducir la perplejidad causada por los eventos de recombinación que ocurren en los genes nucleares (Yonezawa et al., 2017; Van Tuinen et al., 1998).

Además, los cariotipos de las ratites (avestruz, emú y rhea) son notablemente similares. El avestruz tiene $2N=80$, el emú $2N=80$ y el *rhea* $2N=82$. Además, se encontraron similitudes significativas en las longitudes relativas de cada uno de los cromosomas en todas estas especies en los cromosomas correspondientes (Setti et al., 2024; Takagi et al., 1972).

En este sentido, la presente investigación determinó la variabilidad genética del ave Suri (*Rhea pennata*) por medio de marcadores polimórficos microsatélites. Para ello, se extrajeron muestras de ADN de los cálamos de la pluma de suri, se realizó el PCR para los microsatélites RAM 14, RAM 30, y CA5; y se obtuvo los índices de endogamia del Suri.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Objetivo general

- Determinar la variabilidad genética del ave Suri (*Rhea pennata*) por medio de marcadores polimórficos microsatélites.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar polimorfismos de microsatélite para el ave Suri (*Rhea pennata*) por medio de geles de poliacrilamida.



- Determinar la variabilidad genética del ave Suri (*Rhea pennata*) con el uso de marcadores polimórficos microsátélites.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. *Rhea pennata* - Suri

En el altiplano, sur peruano, se denomina al ave como "suri", término de origen aimara que se traduce como "colgado", haciendo referencia a la peculiaridad de su plumaje. Es el que comúnmente se emplea en el contexto peruano. El Suri, que es el ave de mayor tamaño en la región de los Andes, puede alcanzar una altura de hasta 1,40 metros y superar los 20 kilogramos de peso. La familia Rheidae, la cual es endémica de los Neotrópicos, incluye a esta especie. El nombre científico es *Rhea pennata*, la cual se compone de tres subespecies que habitan en distintas regiones de Sudamérica. La subespecie *R. p. garleppi* se encuentra en el sur de Perú, el suroeste de Bolivia y el noroeste de Argentina. Por otro lado, la subespecie *R. p. pennata* habita en el sur de Chile, así como en el centro-oeste y sur de Argentina. Finalmente, la subespecie *R. p. tarapacensis* tiene una distribución que abarca el norte de Chile (Abbona et al., 2019; Folch, 1992; Cajal, 1988).

Se caracterizan por poseer un esternón en forma de escudo o disco, el cual carece de quilla, lo que las hace incapaces de volar. La designación de las aves ratite se deriva etimológicamente de la morfología de su esternón, el cual carece de quilla y presenta una forma plana similar a una balsa, término que en latín se traduce como "ratis". La anatomía de los suris se distingue por su altura de 1.5 a 1.7 metros y un peso cercano a los 25 kilogramos. El cuerpo de este animal guarda



similitudes con el del avestruz, presentando un plumaje de tono gris con áreas oscuras en la cabeza, cuello y entre los hombros, así como una región blanca en la parte inferior (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, 2022; Fowler, 1991; Cho et al., 1984).

El ADN mitocondrial del Suri consta de 16,710 nucleótidos. Se plantea que la especie en cuestión se separó de la línea evolutiva del avestruz hace alrededor de 51 millones de años, y del Emú hace 45 millones de años. No obstante, según otros autores, la separación entre los suris y los avestruces ocurrió hace aproximadamente 75 a 80 millones de años. Además, se ha observado que varios cebadores diseñados para la amplificación de microsatélites en avestruces y emús también resultan efectivos para la amplificación en suries. La secuencia de aminoácidos de la hemoglobina en *Rhea* muestra una estrecha relación con la hemoglobina de los Tinamús. La naturaleza de la divergencia basal de las aves ratites sigue siendo poco clara y sin resolver debido a la escasez de datos secuenciados hasta la fecha (García-Rodríguez et al., 2020; Sales, 2006; Haddrath & Baker, 2001; Cooper et al., 2001; Kimwele et al., 1998; y Taylor et al., 1999).

La especie *Rhea pennata* se halla en una situación de grave riesgo de desaparición. Según los censos realizados, la población de esta especie, conocida como Suri, no supera los cuatrocientos individuos, de los cuales alrededor de cien se encuentran en la región de Puno. En Sudamérica, se observan diferencias significativas en las densidades de población del Suri. Por ejemplo, Chile cuenta con una población de más de cinco mil ejemplares, según los censos realizados en el país sureño. La caza y la recolección de huevos son los factores principales que inciden en la subespecie de esta ave ratite, utilizados como medios de subsistencia



por la población local (SERFOR, 2015; Hernandez, 2011; y Ministerio de Media Ambiente, 2015).

2.1.1.1. Marcadores moleculares

Un marcador molecular se define como cualquier secuencia de ADN que muestra polimorfismo y puede detectarse mediante una técnica molecular. Es uno de los métodos más útiles para la cría y las selecciones moleculares asociadas basadas en marcadores. Aunque hay menos información sobre el genoma de referencia, los marcadores moleculares son herramientas indispensables para la determinación de la variación genética y la identificación de especies con altos niveles de precisión y reproducibilidad (Jo et al., 2017).

Permiten la detección de variaciones o polimorfismos que existen entre los individuos de la población para regiones específicas del ADN. Los marcadores moleculares tienen tres aplicaciones en el mapeo genético: (1) Un marcador permite la identificación directa del gen de interés en lugar del producto génico y, en consecuencia, sirve como una herramienta útil para el cribado de híbridos de células somáticas; (2) Utilizado en varias sondas de ADN y técnicas fáciles de cribar, un marcador también ayuda en el mapeo físico de los genes mediante hibridación in situ. (3) Los marcadores moleculares proporcionan marcadores suficientes para la construcción de mapas genéticos mediante análisis de ligamiento (Marwal & Gaur, 2020).

Existen varios métodos moleculares apropiados para medir la variación dentro de una población. Estos métodos se basan en el



polimorfismo del ADN y, por lo tanto, pueden brindar predicciones precisas sobre la generación futura. El método molecular más importante es el polimorfismo de ADN microsatélite.

2.1.1.2. Microsatélites

Una repetición simple de secuencia o microsatélite es un fragmento de ADN repetitivo en el que se repiten determinados motivos de ADN, cuya longitud oscila entre 1 y 6 pb o más, normalmente entre 5 y 50 veces. Los microsatélites son un tipo de Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTR), además de los minisatélites. Los microsatélites también se conocen como Repeticiones de Secuencia Simple (SSR) en plantas y Repeticiones Cortas en Tándem (STR) en animales. Se basan en una amplificación estándar por PCR con cebadores específicos. De esta forma, el ADN se aísla y se amplifica, siendo posteriormente detectado por PAGE u otras metodologías como la Electroforesis Capilar (CE) y la detección fluorescente en secuenciadores de ADN estándar (Dorado et al., 2017).

2.1.2. Técnicas moleculares para análisis de ADN

El análisis molecular del ADN se refiere al proceso de identificar con precisión diferentes aspectos del genoma mediante el análisis del ADN presente en muestras biológicas. Implica varios pasos como la recolección de muestras, la conservación, el análisis de laboratorio, la interpretación de los resultados y la gestión de los datos. El análisis del ADN es crucial para la identificación de restos fragmentados y ADN degradado, amplificar secuencias de interés mediante PCR, observar el ADN amplificado mediante electroforesis y secuenciarlo por medio



de Nueva Generación de Secuenciamiento o Sanger (Silva et al., 2022; Budowle et al., 2005).

2.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica de biología molecular que consiste en la amplificación de fragmentos de ADN in vitro mediante la acción de una enzima de replicación. El procedimiento básico de la PCR implica los siguientes pasos: (a) desnaturalización del ADN bicatenario mediante exposición a alta temperatura (normalmente de 92 a 95 °C), separándolo en cadenas simples que servirán como moldes para la amplificación; (b) hibridación de un pequeño fragmento de ADN monocatenario, llamado cebador, con el molde (la hibridación se produce debido a la presencia de una secuencia de bases complementaria); (c) síntesis de una segunda cadena complementaria al molde de ADN por la enzima ADN polimerasa; (d) desnaturalización del fragmento de ADN bicatenario formado; y (e) inicio de un nuevo ciclo. El ciclo se repite hasta que se forman millones de nuevas moléculas de ADN (Caixeta et al., 2014).

2.1.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida para ADN

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica que se utiliza en biología y química para separar y analizar fragmentos de ADN de distintos tamaños mediante la aplicación de un campo eléctrico a una matriz de gel. Un método para detectar productos de amplificación de marcadores microsatélites es la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante. Este sistema es capaz de separar fragmentos de ADN que



difieren en tan solo dos pares de bases. La unidad de electroforesis contiene dos geles verticales de 10 muestras cada una que permiten analizar productos amplificados por PCR de 96 pocillos. Las muestras de ADN se tiñen durante la electroforesis con un intercalante (bromuro de etidio, entre otros) en el buffer de corrida. Luego se observa en un transiluminador, de modo que los geles se pueden fotografiar inmediatamente después de la electroforesis (Green & Sambrook, 2020; Wang et al., 2003).

2.1.3. Variabilidad genética

La variación genética es la cantidad y distancia en la que los genes difieren de un organismo a otro dentro del mismo acervo genético. La varianza genética de una especie contiene la diversidad dentro de las poblaciones y entre poblaciones. La variación genética surge debido a mutaciones en el genoma. Además, la recombinación y la distribución independiente durante la formación de los gametos producen una variedad infinita de combinaciones a partir del genoma parental. La reducción de la variación genética resulta de la deriva genética, el cuello de botella genético y la endogamia que, a su vez, se ven afectados por el tamaño efectivo de la población (Charlesworth & Jensen, 2021; Meffe & Carroll, 1987; Shorrocks, 1979).

2.1.3.1. Deriva genética

La deriva genética es el cambio aleatorio en la frecuencia de genes causado por errores de muestreo en poblaciones pequeñas. Ocurre siempre que la población no es de tamaño infinito y se observa de manera más radical en poblaciones muy pequeñas. Una "población pequeña" es una



población en la que, al ser una muestra pequeña de la población total, la frecuencia de los alelos puede variar a un valor diferente o desaparecer por completo. En una muestra lo suficientemente grande que se está separando de la población total, la deriva genética probablemente no ocurriría y puede ignorarse (Reusch et al. 2021).

Por tanto, la frecuencia de los alelos depende del tamaño de la población y del número de generaciones desde la separación. Numéricamente, una población con un rango de tamaño poblacional efectivo de 10 a 100 se considera pequeña, mientras que 1000 se considera grande. Asimismo, en poblaciones domesticadas, la deriva genética da como resultado una reducción de la proporción de polimorfismo al elevar la posibilidad de fijación de un alelo en un locus. Esto da como resultado una reducción de la variación genética a menos que se reintroduzca mediante mutación o inmigración (Reusch et al. 2021; Hill, 1986).

2.1.3.2. Cuello de botella genético

Un cuello de botella genético es el resultado de una reducción grave y temporal del tamaño de la población. El cambio en la variación genética en este caso depende de la variación alélica inicial y las frecuencias en la población original. Además, también depende de la duración del cuello de botella y del grado en que los alelos supervivientes se aleatorizan respecto de la frecuencia total (Martin et al. 2023; Frankel & Soulé, 1981).

2.1.3.3. Endogamia

La endogamia se define como el apareamiento entre parientes. La endogamia aumenta la homocigosidad de la población en todo el genoma.



El efecto de la endogamia se mide generalmente a través del coeficiente de endogamia (F). El coeficiente de endogamia es la probabilidad de que dos alelos en un locus de un individuo sean idénticos por descendencia. Un efecto perjudicial de la endogamia es la depresión endogámica. La depresión endogámica es causada por la acumulación de alelos recesivos dañinos. La endogamia y su efecto La depresión endogámica puede surgir en los casos de disminución catastrófica en el número (cuello de botella genético) y deriva genética en poblaciones pequeñas cuando se fundan nuevas colonias con un pequeño número de individuos (Emeterio-Lara et al., 2018; Greenwood, 1989).

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. Análisis de la variabilidad genética en *Rhea*

En un estudio de investigación se llevó a cabo un análisis de la variabilidad genética de las poblaciones cautivas del suri en la región de Lambayeque, Perú. Se realizaron análisis con un total de 67 especímenes provenientes de los centros de rescate Sumac Kantati y PELT. Se llevó a cabo un análisis del nivel de variabilidad genética utilizando tres loci microsatélites SSR (Repetición Corta en Tándem) denominados Ram 30, Ram14 y Emu33. Los resultados obtenidos revelan la presencia de dos alelos para Ram30 y Ram14, mientras que únicamente se identificó un alelo para Emu33. El análisis de las poblaciones en cautiverio reveló un valor de 0.349 para la heterocigosidad observada (H_o) y de 0.223 para la heterocigosidad esperada (H_e). En la muestra total, se observó que los individuos Ram14 y Emu33 presentaron una alta frecuencia de homocigotos, alcanzando un 79% y un 100% respectivamente. Por otro lado, Ram30 mostró una



alta frecuencia de heterocigotos, llegando al 82.5%. En las poblaciones cautivas, se ha comprobado que hay una baja diferenciación genética en las frecuencias alélicas. A pesar de tener niveles reducidos de heterocigosidad (Bazán & Esquén, 2018).

El ñandú mayor (*Rhea americana*) es una especie aviar distintiva que habita en la región de la pampa argentina. En un estudio realizado por Alonso Roldán et al. (2011) reveló que las poblaciones en cautiverio de esta especie de ave, establecidas con ejemplares del centro de Argentina, mantienen la mayor parte de la diversidad genética encontrada en las poblaciones silvestres de la misma zona. Se trabajó con un total de siete poblaciones, cinco de ellas silvestres agrupadas como un conjunto, y los dos restantes cautivos también consideradas como una sola entidad. Los análisis realizados frente a una base de 22 bandas de microsatélites polimórficas revelaron que las poblaciones cautivas de ñandú mayor presentaban valores de índice de diversidad aparentemente inferiores a los de las poblaciones silvestres. Se encontró que los loci eran polimórficos en un 12,22% y un 13,33% de los casos. Finalmente, se señaló que las poblaciones en cautiverio no presentan diferencias significativas en comparación con las poblaciones silvestres analizadas.

Chiappero y Martella (2012) por medio de un estudio por marcadores dominantes, sugirieron que su sistema de apareamiento, que combina poliginia con poliandria y promiscuidad secuencial y simultánea, puede preservar la variabilidad genética. Se desarrollaron 8 loci de marcadores microsatélites que presentaron de 3 a 8 alelos por locus y heterocigosidades medias observadas de 0,3 a 0,9, lo que proporcionará marcadores adecuados para probar hipótesis sobre la estructura genética y el sistema de apareamiento en el ñandú. Siete loci se



amplificaron de forma cruzada con éxito en el ñandú chico (*R. pennata*), de los cuales 28 tres fueron polimórficos.

2.2.2. Análisis de la variabilidad genética en Ratites

Se llevó a cabo un estudio de investigación con emús (*Dromaius novaehollandiae*) en el cual se identificaron y clasificaron 10 microsatélites (Dn01, Dn02, Dn03, Dn06, Dn08, Dn10, Dn13, Dn15, Dn22, Dn28, Dn35) que fueron polimórficos y específicos para esta especie a partir de secuencias de acceso público. El polimorfismo fue inspeccionado en 22 individuos de dos poblaciones distintas en cautiverio. En este estudio se identificaron 11 alelos por locus, y la heterocigosidad observada varió entre 0,05 y 0,85, lo cual concuerda con las expectativas. Estas herramientas serán utilizadas para la identificación de los niveles de variación genética (Yanez et al., 2008).

Del mismo modo, Taylor et al. (1999) investigó al emú (*Dromaius novaehollandiae*). Se analizaron 6 loci microsatélites (emu5, emu18, emu33, emu49, emu50, emu63) los cuales amplificaron también para kiwi, avestruz y suri. Para emús se obtuvo 65 polimorfismos, respecto al kiwi los microsatélites obtuvieron 7 polimorfismos, para avestruz fueron 10 polimorfismos, por último para suri se obtuvo 6 polimorfismos.

Kawka et al. (2012) realizaron un análisis genético en avestruces polacas, se tomaron en consideración tres razas principales de avestruces. El análisis se centró en dos métodos moleculares: las huellas de ADN y los microsatélites. Para las huellas de ADN, se emplearon las enzimas de restricción HinfI y Jeffrey's, mientras que para los microsatélites se utilizó la técnica de PCR con cinco cebadores. Los productos de PCR resultantes se separaron mediante el uso de gel



de Poliacrilamida. Se llevó a cabo un análisis de la variabilidad genética y la evaluación de la distancia genética entre las tres razas de avestruces. Los resultados obtenidos mediante ambos métodos revelaron una notable concordancia, especialmente en lo que respecta a la relación entre las razas. En las poblaciones de avestruces, el análisis de las huellas dactilares de ADN reveló una baja variabilidad. Por otro lado, en los tricocéfalos de cuello negro se observó una mayor variabilidad, alcanzando un 29.04%. La heterocigosidad media fue de 0.30, siendo la más baja en los tricocéfalos de cuello rojo. Se determinó que la mayor disparidad genética se observó entre los cuellos negro y rojo. Por lo tanto, se infiere que la utilización de estas razas en cruzamientos debería resultar en un mayor efecto heterocigoto.

También Kawka et al. (2012) en un estudio realizado en la Universidad Agrícola de China, se investigaron polimorfismos utilizando marcadores microsatélites específicos para los avestruces. Se analizaron 30 marcadores de microsatélites en un estudio que involucró a 150 avestruces (*Struthio camelus*). Fueron analizados los 30 loci de microsatélites con nomenclatura inicial de "CAU", encontrándose un total de 343 alelos. El número de alelos en un solo locus varió desde 5 en el locus del microsatélite CAU78 hasta 34 en el locus del microsatélite CAU85. Los valores de heterocigosidad observada (H_o) oscilaron entre 0,467 (locus CAU78) y 0,993 (locus CAU16). La heterocigosidad esperada (H_e) varía desde 0,510 en el locus CAU78 hasta 0,953 en el locus CAU85. Al analizar los loci individuales, se observó que los valores más altos de Índice de Polimorfismo de la Información (PIC), superiores a 0,7, correspondieron a los loci CAU85 (0,932), CAU64 (0,861) y CAU32, 75 (0,852), respectivamente. En nuestro estudio, los marcadores de microsatélites empleados mostraron un alto



grado de polimorfismo, lo cual se evidencia por la diversidad de alelos identificados y las elevadas tasas de heterocigosidad, así como de los índices PIC y PE. Los marcadores de microsatélites analizados pueden contribuir al mapeo de ligamiento genético del avestruz.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

La recolección de muestras de plumas de *Rhea pennata* tuvo lugar en el centro de conservación del Proyecto Binacional Lago Titicaca (PEBLT), localizado en el Distrito de Mazocruz, Provincia de El Collao, Departamento de Puno, a una altitud de 4500 metros sobre el nivel del mar, en las coordenadas geográficas 16° 44'40" de latitud sur y 69° 42'50" de longitud oeste de Greenwich (Almirón, 2023).

El análisis molecular fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Megalaboratorio de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Tamaño de muestra

Debido a las políticas laborales establecidas por el PEBLT. Dado que el suri se encuentra en peligro de extinción. Se llevó a cabo una recolección de muestras de tipo no probabilístico, la cual fue determinada exclusivamente por la elección de los trabajadores del PEBLT. Se recolectaron muestras de plumas de un total de 36 individuos para su posterior análisis en el estudio.

3.2.2. Materiales y equipos utilizados

- Laminas cubre objeto.
- Bisturís.
- Bolsas Ziploc.
- Agua destilada.



- Kit de extracción de ADN para pluma: Wizard SV Genomic DNA Purification System.
- Cámara de flujo laminar, marca JSR, modelo JSCB 1200SL.
- Bloque de calor baño seco.
- Microcentrífuga Bio-Rad, modelo 16K a 14,000 RPM.
- Vortex Bio-Rad, modelo BR-2000.
- Balanza analítica.
- Horno Microondas.
- Buffer Tris Borato EDTA (TBE).
- Papel aluminio.
- Matraz.
- Termociclador Biometra Tone de Analytik Jena
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Refrigeradora a -80 °C.
- Espectrofotómetro UV PCR Max, modelo Lambda.
- Micropipetas y tips de 1, 10, 100 y 1000 μ l.
- Cámara electroforética tipo vertical.
- Fuente de poder Bio-Rad.
- Acrilamida.
- Bis-Acrilamida.
- TEMED.
- Persulfato de amonio.
- Úrea.
- Buffer de carga, código SafeGreen.
- Marcador de ADN, marca Applied Biological Materials Inc.



- Transiluminador marca Life Technologies, E-gel Imager.
- Computadora.
- Cuaderno.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Muestreo de plumas de suri

Se recolectaron 36 muestras de suris, de las cuales se obtuvieron 5 plumas por ejemplar. Estas plumas fueron almacenadas individualmente en bolsas ziploc con cierre y conservadas en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la extracción de ADN. El tamaño de la muestra se calculó utilizando un método no probabilístico.

3.3.2. Extracción de ADN en pluma

Se llevó a cabo empleando un kit de extracción denominado Wizard SV Genomic DNA Purification System. En primer lugar, se procedió a realizar cortes en pequeños fragmentos en el extremo inferior de las plumas mediante el uso de una lámina cubre objeto y un bisturí.

Para la preparación de la Solución de Digestión por cada muestra de tejido, se combinaron los reactivos especificados en la Tabla 1 en un tubo Eppendorf de 2 ml.



Tabla 1

Reactivos usados para la solución de digestión

Solución de Digestión	Volumen por muestra	Volumen por N muestras
Solución lisis del núcleo	200 μ l	(N + 1) x 200 μ l
0.5M EDTA (pH 8.0)	50 μ l	(N + 1) x 50 μ l
Proteinasa K, 20 mg/ml	20 μ l	(N + 1) x 20 μ l
Solución RNasa A	5 μ l	(N + 1) x 5 μ l
Volumen Total	275 μ l	(N + 1) x 275 μ l

Nota: Obtenido del kit de extracción Promega (2020).

Como se utilizó un kit de extracción nuevo, se añadió etanol al 95 % a la Solución de Lavado de Columna, siguiendo las instrucciones de la etiqueta de la botella. La botella fue marcada con una etiqueta para señalar la adición de etanol. La solución de lavado de columna fue sellada meticulosamente y almacenada a temperatura ambiente.

El procedimiento consistió en la preparación del ombligo inferior del cálamo de la pluma y el lisado del tejido. En cada individuo, se realizó un corte de entre 0,5 y 1,2 cm en el extremo inferior del raquis de las cinco plumas. Un fragmento de tejido del ombligo inferior que mide 1,2 cm tiene un peso estimado de alrededor de 20 mg. La muestra fue introducida en un tubo de microcentrífuga con capacidad de 1,5 ml. A cada tubo de muestra se le añadieron 275 μ l de la solución de digestión preparada. Garantizando la total cobertura de la muestra con la solución de digestión maestra. En caso de que los cortes de los ombligos inferiores no sean sumergidos en la solución de digestión de la mezcla maestra, se procederá a fragmentar el tejido en piezas de menor tamaño. Las muestras fueron incubadas durante la noche, con una duración de 16 a 18 horas, en un bloque térmico o baño seco a una temperatura de 55 °C. A cada muestra se le añadieron



250 µl de Buffer de Lisis Wizard® SV. Se realizará un vortex de 10 segundos para que se realice el lisado de la muestra, y se mantuvo en el bloque de calor a 55 °C para pasar de inmediato al proceso de purificación. Los lisados que no pudieron ser procesados de inmediato fueron almacenados a una temperatura de -80 °C. Antes de continuar con el proceso de purificación, los lisados congelados fueron calentados a 55 °C durante una hora para su reutilización.

Para llevar a cabo la purificación del ADN genómico del lisado mediante una microcentrífuga, el procedimiento consistió en transferir la totalidad del lisado de la muestra desde el tubo de la microcentrífuga de 1,5 ml a una minicolumna de ensamblaje Wizard® SV. La minicolumna Wizard® SV, que contiene el lisado de muestra, fue colocada en una microcentrífuga y centrifugada a 13,000 rpm durante 3 minutos con el fin de unir el ADN genómico a la minicolumna Wizard®. En caso de que haya quedado residuo de lisado en la columna tras el primer proceso de centrifugado, se procedió a realizar una segunda centrifugación por un minuto a una velocidad de 13 000 revoluciones por minuto. El líquido fue desechado en el tubo de recolección al retirar la minicolumna Wizard® SV del ensamblaje de la minicolumna. La minicolumna Wizard® SV fue nuevamente colocada en el tubo de recolección. A cada ensamblaje de minicolumna Wizard® SV se le añadieron 650 µl de solución de lavado de columna. Se realizó una centrifugación a una velocidad de 13.000 revoluciones por minuto durante un minuto. El líquido del tubo de recolección fue descartado y la minicolumna Wizard® SV fue reintegrada en el tubo de recolección vacío. Los pasos de lavado se repitieron tres veces, lo que resultó en un total de cuatro lavados de la minicolumna Wizard® SV. Tras el ciclo de lavado previo, se procedió a vaciar el tubo de recolección y a reensamblar la minicolumna Wizard® SV. La matriz de



unión se secó mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 2 minutos. Se retiró la minicolumna Wizard® SV y se procedió a colocar un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml etiquetado para la elución, el cual no está incluido. A la minicolumna Wizard® SV se añadieron 250 µl de agua libre de enzimas nucleasas a temperatura ambiente. La muestra fue incubada a temperatura ambiente durante un periodo de 2 minutos.

Para mejorar el rendimiento del ADN, se optó por calentar el agua a 65 °C antes de incorporarla a la columna destinada a la elución. El conjunto de minicolumna/tubo de elución Wizard® SV fue colocado en la centrífuga y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto. El volumen total de elución fue de alrededor de 250 microlitros. La minicolumna Wizard® SV fue retirada y eliminada. El tubo que contiene el ADN genómico purificado se obstruyó y se almacenó a una temperatura de -80 °C.

3.3.3. Concentración del ADN

La lectura de la muestra de ADN se realizó mediante un espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max), utilizando 1 µl de muestra. Las muestras de ADN extraídas de plumas fue sometida a un proceso de blanqueo utilizando los buffers de elución proporcionados por el kit Wizard SV Genomic DNA Purification System. Los resultados fueron obtenidos utilizando la unidad de concentración de microgramos por mililitro.

3.3.4. Calidad del ADN

Asimismo, se llevó a cabo la medición a través del espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max). Las muestras de ADN extraídas de plumas fueron sometida a un proceso de blanqueo utilizando los buffers de



elución proporcionados por los kits Wizard SV Genomic DNA Purification System e innuPREP Blood DNA Mini, respectivamente. Se empleó una cantidad de 1.5 μ l de muestra de ADN. Se procedió a la evaluación de la relación entre las absorbancias medidas a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm.

3.3.5. Integridad del ADN

La determinación de la integridad del ADN extraído se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1% de concentración. Se empleará una cantidad de 0.5 gramos de agarosa disuelta en 49 mililitros de agua destilada, a la cual se le añadirá 1 mililitro de buffer TAE (Tris Acetato EDTA) con una concentración 50 veces mayor. La solución fue calentada hasta alcanzar el punto de ebullición y luego fue transferida a la cámara electroforética horizontal, la cual estaba equipada con el peine y los bloques correspondientes. Se permitió que el objeto se enfriara durante un periodo de 30 minutos. Posteriormente, se procederá a llenar la cámara electroforética con un tampón de corrida TAE a una concentración de 1x. Se procederá a cargar 20 ng de ADN extraído de las 36 muestras de pluma. Este paso final completará el proceso de preparación de las muestras para su análisis. Las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel a una intensidad de 100V durante 25 minutos. Posteriormente, las bandas resultantes fueron analizadas utilizando el transiluminador de la marca Life Technologies, E-gel Imager, con el fin de determinar la integridad del ADN.

3.3.6. PCR

En el estudio, se empleó el kit de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) GoTaq® Green Master Mix (M712) de la marca Promega, año 2021. Con los elementos presentados en la Tabla 2.

Tabla 2

Componentes del kit de PCR

Componente	Volumen	Concentración final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12,5 µl	1X
Primer forward, 10 µM	0,25–2,5 µl	0,1–1,0 µM
Primer reverse, 10 µM	0,25–2,5 µl	0,1–1,0 µM
Muestra de ADN	1–5 µl	<250 ng
Agua libre de nucleasas hasta	25 µl	---
Volumen Total	25 µl	1X

Nota: Obtenido del kit de extracción Promega (2021).

Los componentes fueron homogenizados en un tubo de PCR de 100 µl y la amplificación se llevó a cabo en el termociclador Biometra Tone de Analytik Jena

3.3.7. Electroforesis en desnaturizante en geles de acrilamida

Los productos de PCR obtenidos fueron evaluados en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Para ello se separa 12 µl con 2.4 µl de Safe green y en tubo agregar marcador de peso molecular. Los geles a utilizar fueron a una concentración del 20 %. En cada carril se puso el marcador de peso molecular de 100 pb y 9 muestras de PCR. Los componentes para la preparación del gel de poliacrilamida se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3*Componentes del gel de poliacrilamida al 20 %*

Componente	Volumen
Poliacrilamida 40% (39:1)	8 ml
Urea	0.5 g
Agua destilada	11.2 ml
TBE 10X	1.2 ml
APS 30%	200 μ l
TEMED	10 μ l
Volumen Total	20.61 ml

Nota: Elaboración propia.

Primero se agregó todos los componentes menos los polimerizantes (APS 10% y el TEMED). Se llevó al horno microondas por 6 segundos para que se pueda diluir la urea. Seguido de ello se agregó el APS 30% y el TEMED. De inmediato se aplicó aproximadamente 4 ml en placas de vidrio para geles de electroforesis vertical de grosos de 0.75 mm, seguido de ellos, se puso su respectivo peine para obtener los carriles donde aplicar la muestra. Se esperó 30 minutos a que los geles polimericen. Después, se puso los geles en la cámara de electroforesis vertical. Se llenó la cámara con buffer de corrida TBE 1X. Luego, se removió los peines y se aplicó 10 μ l de producto de PCR por cada carril. Después de ello, se realizó la electroforesis por 2 horas a 100 voltios.

3.3.8. Análisis de los geles de electroforesis

Las muestras amplificadas fueron fotografiadas utilizando un transiluminador de la marca Life Technologies, E-gel Imager, para visualizar los geles.

Se llevó a cabo el análisis de las bandas obtenidas en los geles utilizando el programa Gel Quant Express de Life Technologies. Determinando los pesos moleculares de las bandas, y el número de polimorfismos.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el software de Arlequín en la versión 3.5. para el cálculo de los índices de diversidad genética, además la frecuencia alélica se obtuvo por medio de la fórmula:

$$\text{Frecuencia alélica} = \frac{\# \text{ de repeticiones del alelo}}{\# \text{ de todos los alelos en el locus}}$$

Los primers RAM14, RAM30 y CA5 se utilizan para caracterizar y analizar la diversidad genética del ave Suri (*Rhea pennata*) mediante marcadores microsatélites. El marcador RAM14 identifica alelos polimórficos con un peso molecular aproximado de 141 pares de bases y una repetición de (CT)₉, siendo útil para distinguir heterocigotos y homocigotos y aportando información sobre una diversidad genética aceptable. Por su parte, RAM30 se caracteriza por un peso molecular de 119 pares de bases con una repetición de (AC)₁₂, mostrando una alta frecuencia de heterocigotos y siendo confiable para el análisis genético de esta especie. Finalmente, el marcador CA5, con un peso molecular de aproximadamente 201 pares de bases y una repetición de (CA)₁₅, también se enfoca en detectar polimorfismos, pero su alta frecuencia de heterocigotos (cercana al 95%) puede limitar su confiabilidad en algunos contextos, al generar resultados más homogéneos. En conjunto, estos marcadores permiten evaluar la variabilidad genética del Suri, facilitando el entendimiento de la estructura genética de una especie en peligro de extinción.

CAPÍTULO IV

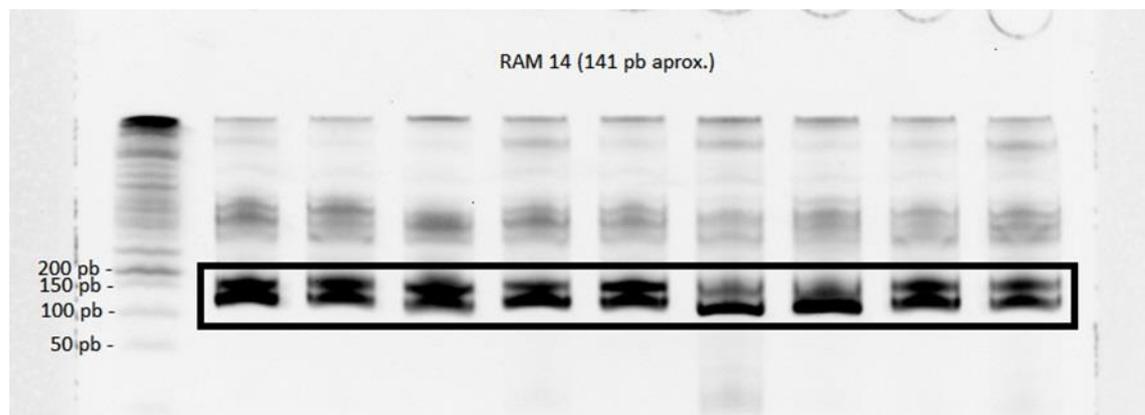
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZAR POLIMORFISMOS DE MICROSATÉLITE PARA EL AVE SURI (*Rhea pennata*) POR MEDIO DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Se caracterizó los polimorfismos para 3 microsátélites: RAM 14, RAM 30 y CA5; como se observa en las Figuras 1, 2, y 3; respectivamente.

Figura 1

Caracterización del microsátélite RAM 14



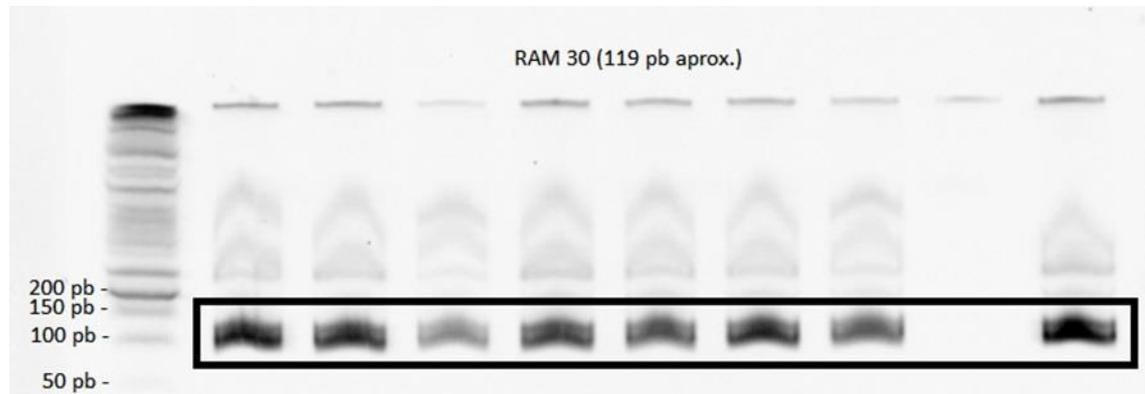
Nota: Se observa alelos polimórficos heterocigotos en un peso molecular aproximado de 130 a 140 pb.

Los resultados obtenidos para caracterizar el microsátélite RAM 14. Comprueba el peso molecular teórico de 141 pares de bases aproximadamente. También, se pudo determinar heterocigotos como homocigotos. El microsátélite posee una repetición de (CT)₉.

Estos resultados se corroboran con Chiappero & Martella (2012), el cual caracteriza a RAM 14 con dicho peso molecular. Permitiendo a la presente investigación tener la certeza de trabajar con dicho marcador.

Figura 2

Caracterización del microsatélite RAM 30



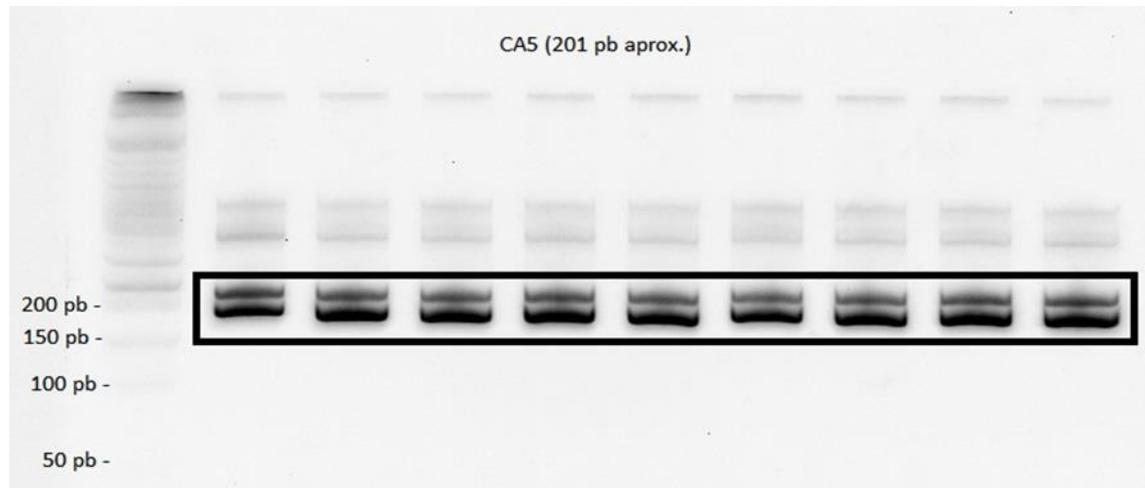
Nota: Se observa alelos polimórficos heterocigotos en un peso molecular aproximado de 100 a 115 pb.

Del mismo modo, caracterizar el microsatélite RAM 30 en geles de poliacrilamida al 20 % permitió determinar su peso de 119 pares de base aproximadamente, así como se pudo ver alelos tanto homocigotos como heterocigotos. Cabe resaltar que este es el microsatélite de menor tamaño y con una repetición (AC)¹².

Asimismo, Chiappero & Martella (2012) caracterizaron RAM 30 con el mismo peso molecular, los autores trabajaron en ratites con ese marcador y se comprueba que es totalmente utilizable con el género *Rhea*.

Figura 3

Caracterización del microsatélite CA5



Nota: Se observa alelos polimórficos heterocigotos en un peso molecular aproximado de 190 a 210 pb.

El microsatélite CA5 se logró caracterizar en geles de poliacrilamida al 20%, este marcador presenta una gran cantidad de heterocigotos. Del mismo modo se puede observar que tiene un peso molecular de 201 pares de bases aproximadamente. Y posee un motivo de repetición de (CA)15.

Los resultados corroboran lo publicado por Taylor et al. (1999). El cual le da un peso aproximado de 200 pb. Los autores lo proponen como un marcador en aves Ratites. Del mismo modo a los anteriores microsatélites, se determina que también el microsatélite también es aplicable para *Rhea pennata*.

4.2. DETERMINAR LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL AVE SURI (*Rhea pennata*) CON EL USO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS MICROSATÉLITES

4.2.1. Determinación de las frecuencias de homocigotos y heterocigotos

Se obtuvo las frecuencias de homocigotos y heterocigotos de RAM 14, RAM 30 y CA5. Los cuales están representados en la Tabla 4.



Tabla 4

Frecuencias de homocigotos y heterocigotos

Marcador	Homo/Heterocigotos	Genotipo	N°	Frecuencias
RAM 14	Homocigotos	149/149	12	0.33
	Heterocigotos	149/124	24	0.67
RAM 30	Homocigotos	101/101	6	0.17
	Heterocigotos	122/101	30	0.83
CA5	Homocigotos	218/218	2	0.05
	Heterocigotos	218/200	34	0.95

Nota: Elaboración propia.

Se obtuvo los resultados respecto a las frecuencias de homocigotos y heterocigotos. Los resultados obtenidos para RAM 14 de una frecuencia de homocigotos de 0.33 y heterocigotos de 0.67 difieren con lo encontrado por Bazán & Esquen (2018), quienes determinaron una frecuencia de 0.75 de homocigotos y 0.25 de heterocigotos. No obstante, si se asemeja lo encontrado en el presente trabajo para RAM 30, con frecuencias de homocigotos y heterocigotos de 0.17 y 0.83, respectivamente a lo encontrado por Bazán & Esquen (2018), quienes reportaron unas frecuencias de 0.125 y 0.875. La frecuencia de homocigotos y heterocigotos de 0.05 y 0.95, es un interesante hallazgo que permite proponer a CA5 como un marcador estable con una alta recurrencia en alelos heterocigotos. Este resultado se condice con lo obtenido por Taylor et al. (1999), los autores nombran a CA5 como emu5; no obstante, las regiones se amplifican con las mismas secuencias de primers. La frecuencia de heterocigotos para CA5 respecto a lo visto por Taylor et al. (1999) fue de 0.87, muy similar a lo reportado en la presente investigación.



4.2.2. Determinación de las frecuencias alélicas

Del mismo modo se obtuvo las frecuencias alélicas para los 3 microsatélites usados en la presente investigación lo cual se representa en la Tabla 5.

Tabla 5

Determinación frecuencias alélicas

	Alelo	N°	Frecuencias
RAM 14	124	48	0.67
	149	24	0.33
RAM 30	101	42	0.58
	122	30	0.42
CA5	200	34	0.47
	218	39	0.53

Nota: Elaboración propia.

De acorde a lo obtenido en las frecuencias alélicas. Para el marcador RAM 14, el alelo de menor tamaño de 124 pares de bases posee una frecuencia de 0.67. Este resultado se asemeja lo visto por Bazán & Esquen (2018), que determinaron para el alelo de RAM 14 de 147 pares de bases, el cual es el alelo de menor tamaño obtuvieron una frecuencia de 0.897. Del mismo modo, el alelo de mayor tamaño en la presente investigación de 149 pares de bases, la frecuencia fue de 0.33. También los resultados pueden corroborarse con Bazán & Esquen (2018) quienes para el alelo mayor de RAM 14, reportan la frecuencia alélica de 0.103.

Sobre el marcador RAM 30, el alelo de menor tamaño de 101 pares de bases, el presente trabajo reporta una frecuencia alélica de 0.58. Este resultado es muy similar a lo reportado por Bazán & Esquen (2018), donde el alelo de menor tamaño de 135 pares de bases para RAM 30, la frecuencia de dicho alelo fue de

0.59. Adicionalmente, el alelo de mayor tamaño en el presente estudio presentó una frecuencia de 0.41; en este sentido, Bazán & Esquen (2018), también reporta una frecuencia de 0.42. De esta manera, respecto al marcador RAM 30, presenta universalidad en los resultados en la especie de *Rhea pennata*, independientemente de la localidad donde se presente.

No existen trabajos que hayan determinado la frecuencia alélica del microsatélite CA5, por ello, la presente investigación es la primera referencia en ello.

4.2.3. Índices de diversidad genética (GST)

Se determinó la H_T : Heterocigosidad total, H_s : Heterocigosidad media esperada por población, D_s : Diversidad genética entre los 36 ejemplares utilizados en el presente estudio.

Tabla 6

Índices de diversidad genética

Índices de diversidad	H_T	H_s	D_{ST}	G_{ST}
36 ejemplares de suri	0.32	0.30	0.003	0.007

Nota: Elaboración propia.

El índice de diversidad genética fue de 0.007. En este sentido expone un poco de diversidad. Entre los motivos de esto es haber muestreado a aves de una misma población; además, es importante considerar el tiempo que los animales están presentes en la zona de Mazocruz. A un menor tiempo, las poblaciones tienden a mantenerse homogéneas. No obstante, estos resultados son altamente similares a lo visto por Bazán & Esquen (2018); quienes reportan un índice de diversidad genética de 0.08.



V. CONCLUSIONES

- Respecto a la caracterización de los microsatélites para usarse como marcadores moleculares para evaluar la diversidad genética de *Rhea pennata*. Se concluye que RAM 14, RAM 30 y CA5 son compatibles con dicha especie, y pueden ser utilizados para este tipo de estudios.
- De acorde a la evaluación de la diversidad genética de *Rhea pennata*, se llega a la conclusión que los microsatélites RAM 14 y RAM 30 nos demuestra que posee una diversidad aceptable y se condice con diversos autores. No obstante, el marcador CA5, tiende a determinar casi en un 100 % muestras de heterocigotos, siendo un marcador poco confiable para este análisis.



VI. RECOMENDACIONES

- Secuenciar los productos de PCR obtenidos, de este modo corroborar bioinformáticamente los resultados de esta información.
- Analizar más microsátélites que sean compatibles con otras aves ratites, de este modo poder tener mayor probabilidad de trabajar con mejores marcadores moleculares.
- Utilizar otras tecnologías como el análisis de fragmentos de ADN, RFLP, entre otros.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbona, C. C., Johnson, J. A., Giardina, M., Otaola, C., Neme, G. A., & Wolverton, S. (2024). Ancient DNA reveals population trends of Lesser Rhea (*Rhea pennata*) in Northwestern Patagonia. *International Journal of Osteoarchaeology*, 34(5), e3336.
- Almirón, A. (2023). El sistema integrado de gestión administrativa y su influencia en el control de bienes patrimoniales en el proyecto Especial Binacional Lago Titicaca, 2022.
- Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., ... & Broad, T. (2005). Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine*, 119, 295-302.
- Charlesworth, B., & Jensen, J. D. (2021). Effects of selection at linked sites on patterns of genetic variability. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 52(1), 177-197.
- Chiappero, M., & Martella, M. B. (2012) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the greater rhea (*Rhea americana*) and cross-amplification in the lesser rhea (*R. pennata*). *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES*. 12, 779-781.
- Cho, P., Brown, R., & Anderson, M. (1984). Comparative gross anatomy of ratites. *Zoo Biology*, 3(2), 133-144.
- Caixeta, E. T., Ferrão, L. F. V., Maciel-Zambolim, E., & Zambolim, L. (2014). Molecular markers. *Biotechnology and plant breeding: applications and approaches for developing improved cultivars*. San Diego, US: Elsevier, 19-45.
- Cajal, J. L. (1988). The Lesser Rhea in the Argentine Puna region: present situation. *Biological Conservation*, 45(2), 81-91.
- Coldiron, R. W. (2023). Ratite phylogeny and distribution with comments on evolutionary processes. *Open Science Journal*, 8(1).



- Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J., & Ward, R. (2001). Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature*, 409(6821), 704-707.
- Doums, C. (1999). Characterization of microsatellite loci in the queenless Ponerine ant *Diacamma cyaneiventre*. *Molecular Ecology*, 8(11), 1957-1959.
- Dorado, G., Unver, T., Budak, H., & Hernández Molina, P. (2017). Molecular markers.
- Emeterio-Lara, A., García-Franco, J. G., Hernández-Apolinar, M., Mora-Herrera, M. E., Toledo-Hernández, V. H., Valencia-Díaz, S., & Flores-Palacios, A. (2018). Endogamy costs and reproductive biology of *Laelia autumnalis*, an endemic orchid of Mexico. *Plant Ecology*, 219, 1423-1434.
- Folch, A. (1992). Order Struthioniformes. *Handbook of the birds of the world*, 1, 75-110.
- Fowler, M. E. (1991). Comparative clinical anatomy of ratites. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 204-227.
- Frankel, O. H., Soulé, M. E. (1981). *Conservation and Evolution*.
- García-Rodríguez, J. J., Martínez-Díaz, R. A., Martella, M., Navarro, J. L., & Ponce-Gordo, F. (2020). Genetic identification of the ciliates from greater rheas (*Rhea americana*) and lesser rheas (*Rhea pennata*) as *Balantioides coli*. *Parasitology research*, 119(2), 755-758.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(12), pdb-prot100412.
- Greenwood, P. J. (1989). Inbreeding, philopatry and optimal outbreeding in birds. *Avian genetics*, 207-222.
- Haddrath, O., & Baker, A. J. (2001). Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1470), 939-945.



- Härlid, A., Janke, A., & Arnason, U. (1997). The mtDNA sequence of the ostrich and the divergence between paleognathous and neognathous birds. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 754–761. <https://academic.oup.com/mbe/article/14/7/754/1119800>.
- Hernandez J.H. (2011). Percepción por parte de los pobladores en la zona de influencia de la reserva de Biósfera San Guillermo (San Juan) acerca de aspectos relacionados con la fauna silvestres y su manejo. Tesina de grado. Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina.
- Hill, W. G. (1986). Population size and design of breeding programmes. 3rd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, Nebraska, USA, July 16-22, 1986. XII. Biotechnology, Selection Experiments, Parameter Estimation, Design of Breeding Systems, Management of Genetic Resources., 245–256.
- Jo, I. H., Kim, Y. C., Kim, D. H., Kim, K. H., Hyun, T. K., Ryu, H., & Bang, K. H. (2017). Applications of molecular markers in the discrimination of Panax species and Korean ginseng cultivars (*Panax ginseng*). *Journal of Ginseng Research*, 41(4), 444-449.
- Kawka, M., Parada, R., Jaszczak, K., & Horbańczuk, J. O. (2012). The use of microsatellite polymorphism in genetic mapping of the ostrich (*Struthio camelus*). *Molecular Biology Reports*, 39, 3369-3374.
- Kimwele, C. N., Graves, J. A., Burke, T., & Hanotte, O. (1998). Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks in the ostrich *Struthio camelus*.
- Kummrow, M. S. (2015). Ratites or Struthioniformes: Struthiones, Rheae, Cassuarii, Apteryges (ostriches, rheas, emus, cassowaries, and kiwis), and Tinamiformes (tinamous). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, 8(75).
- Livezey, B. C. (1990). Paleognathous Birds from the Early Tertiary of the Northern Hemisphere. *The Auk*, 107(2), 455–456.



- Livezey, B. C., & Zusi. (2006). PHYLOGENY OF NEORNITHES. *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History*, 37, 1–544. [https://doi.org/10.2992/0145-9058\(2006\)37\[1:pon\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2992/0145-9058(2006)37[1:pon]2.0.co;2)
- Martin, C. A., Sheppard, E. C., Illera, J. C., Suh, A., Nadachowska-Brzyska, K., Spurgin, L. G., & Richardson, D. S. (2023). Runs of homozygosity reveal past bottlenecks and contemporary inbreeding across diverging populations of an Island-colonizing bird. *Molecular Ecology*, 32(8), 1972-1989.
- Marwal, A., & Gaur, R. K. (2020). Molecular markers: tool for genetic analysis. In *Animal biotechnology* (pp. 353-372). Academic Press.
- Meffe, G.K. & Carroll, R.C. (1994). *Principles of Conservation Biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (2022). *Conservación del Suri Rhea pennata, avances y logros*.
- Mitchell, K. J., Llamas, B., Soubrier, J., Rawlence, N. J., Worthy, T. H., Wood, J., Lee, M. S. Y., & Cooper, A. (2014). Ancient DNA reveals elephant birds and kiwi are sister taxa and clarifies ratite bird evolution. *Science*, 344(6186), 898–900. <https://doi.org/10.1126/science.1251981>.
- Ministerio de Medio Ambiente (2015). *Plan nacional de conservación del Suri (Pterocnemia pennata tarapacensis, Chubb, 1913)*. Ministerio de Medio Ambiente de Chile.
- Promega (2020). *Wizard® SV Genomic DNA Purification System*
- Promega (2021). *GoTaq® Green Master Mix (M712)*. www.promega.com/biomath/
- Reusch, T. B., Baums, I. B., & Werner, B. (2021). Evolution via somatic genetic variation in modular species. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(12), 1083-1092.
- Sales, J. (2006). The rhea, a ratite native to South America. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 17(4), 105-124.



- SERFOR (2015). Plan nacional para la conservación del suri (*Rhea pennata*). Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre. Lima, Perú.
- Setti, P. G., Deon, G. A., Zeni dos Santos, R., Goes, C. A. G., Garneró, A. D. V., Gunski, R. J., ... & de Bello Cioffi, M. (2024). Evolution of bird sex chromosomes: a cytogenomic approach in Palaeognathae species. *BMC Ecology and Evolution*, 24(1), 51.
- Sibley, C. G., & Ahlquist, J. E. (1990). Phylogeny and Classification of the Birds. In *Phylogeny and Classification of the Birds*. Yale University Press. <https://doi.org/10.2307/J.CTT1XP3V3R>
- Silva, D. A., de Oliveira, V. M., de Almeida, D., de Sousa Pinto, J., Succo, P. A., Seixas, G. H. F., & Alves, M. A. S. (2022). Standardization of molecular analysis techniques for DNA identification of bird species of the Psittacidae family. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 8, 105-107.
- Smith, A. G. (Alan G., Smith, D. G. (David G., & Funnell, B. M. (2004). Atlas of Mesozoic and Cenozoic Coastlines. In *amcc*. Cambridge University Press. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2004amcc.book.....S/abstract>
- Smith, J. V., Braun, E. L., & Kimball, R. T. (2013). Ratite nonmonophyly: Independent evidence from 40 novel loci. *Systematic Biology*, 62(1), 35–49. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys067>
- Shorrocks, Bryan. (1979). The genesis of diversity.
- Takagi, N., Itoh, M., & Sasaki, M. (1972). Chromosome studies in four species of Ratitae (Aves). *Chromosoma (Berl.)*, 36(3), 281–291.
- Taylor, E. L., Vercoe, P., Cockrem, J., Groth, D., Wetherall, J. D., & Martin, G. B. (1999). Isolation and characterization of microsatellite loci in the emu, *Dromaius novaehollandiae*, and cross-species amplification within Ratitae. *Molecular Ecology*, 8(11), 1963-1964.



- Van Tuinen, M., Sibley, C. G., & Hedges, S. B. (1998). Phylogeny and Biogeography of Ratite Birds Inferred from DNA Sequences of the Mitochondrial Ribosomal Genes. *Mol. Biol. Evol.*, 15(4), 370–376.
- Wang, D., Shi, J., Carlson, S. R., Cregan, P. B., Ward, R. W., & Diers, B. W. (2003). A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop science*, 43(5), 1828-1832.
- Yanez, J. M., Gonzalez, R., Angulo, J., Vidal, R., Santos, J. L., & Martinez, V. (2008). Characterization of new microsatellite markers derived from sequence databases for the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Molecular ecology resources*, 8(6), 1442-1444.
- Yonezawa, T., Segawa, T., Mori, H., Campos, P. F., Hongoh, Y., Endo, H., Akiyoshi, A., Kohno, N., Nishida, S., Wu, J., Jin, H., Adachi, J., Kishino, H., Kurokawa, K., Nogi, Y., Tanabe, H., Mukoyama, H., Yoshida, K., Rasoamiaramanana, A., ... Hasegawa, M. (2017). Phylogenomics and Morphology of Extinct Paleognaths Reveal the Origin and Evolution of the Ratites. *Current Biology*, 27(1), 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.029>

ANEXOS

ANEXO 1. Álbum fotográfico

Figura 4

Manejo de las plumas de Rhea Pennata



Se observa la manipulación de las plumas en *Rhea pennata* para poder extraer el cálamo.

Figura 5

Incubación en calor a los cálamos de la pluma



Al ser el cálamos de las plumas un tejido muy queratinoso, se incubó toda la noche a 60 °C con buffer de lisis.

Figura 6

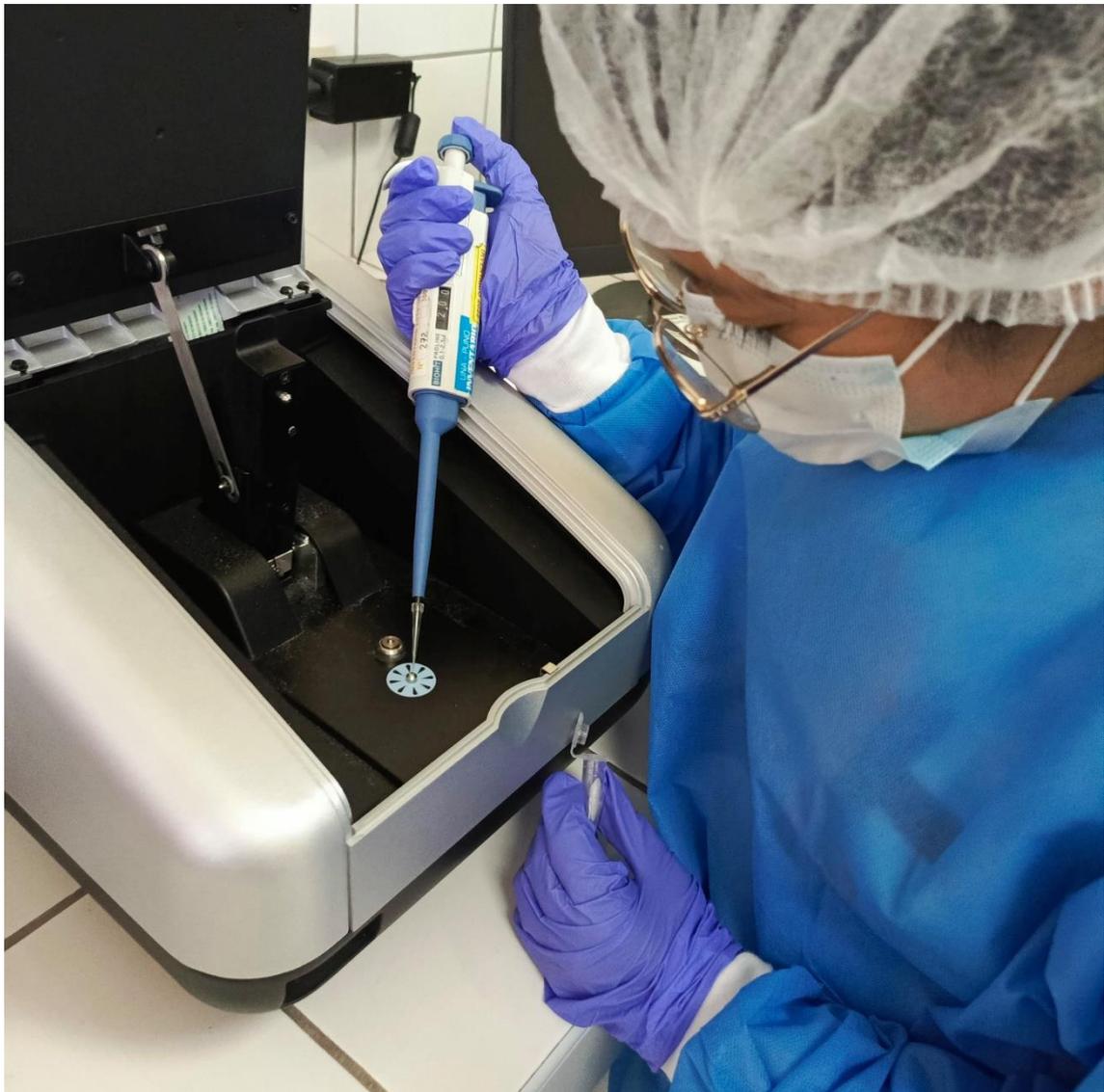
Extracción de ADN mediante microcentrifugación



El protocolo requiere de centrifugar por múltiples ocasiones.

Figura 7

Evaluación de la calidad y concentración del ADN



Se usó 1 μ l de muestra para evaluar el ADN extraído por medio de un espectrofotómetro

Figura 8

Preparación de la poliacrilamida.



La preparación requiere homogenizar acrilamida y bis-acrilamida, y luego ser filtrada en papel Whatman.

Figura 9

Realización del PCR para los 3 microsátélites



Se realizó un PCR convencional para las 36 muestras y para los 3 microsátélites.

Figura 10

Electroforesis horizontal de los productos de PCR



Se realizó una electroforesis vertical, la cual nos permitirá determinar los alelos de cada microsatélite.

ANEXO 2. Data obtenida del PCR

Time of report 24/04/2024 11:24:16

GelQuant Express Report

Experiment CA5 1-9_24_04_2024 image



Image Parameters

Software	
Acquisition Date	
Exposure Time	

Band Detection Parameters

Background subtraction method	Rolling ball disk size :70
Band detection sensitivity	75
Molecular weight standard name	CA5 1-9
Molecular weight regression type	CubicSpline
Mass regression type	Linear
Mass regression formula	N/A
Mass regression R square	N/A

GelQuant Express Report

Experiment RAM14 1-9_24_04_2024 image

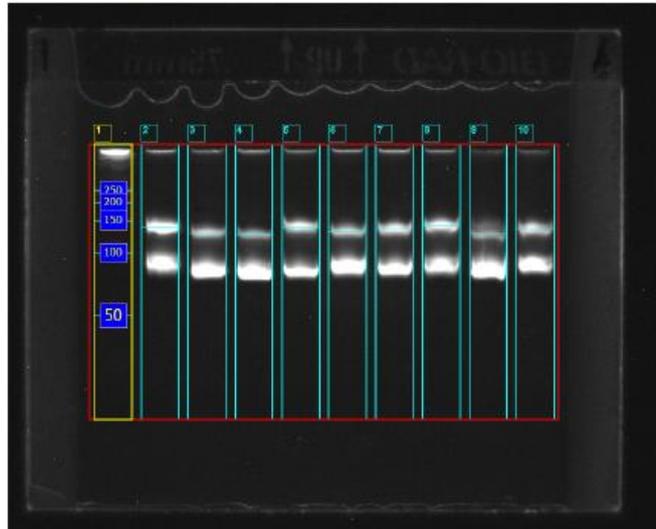


Image Parameters

Software	
Acquisition Date	24/05/2022 17:09:27
Exposure Time	0.36 sec

Band Detection Parameters

Background subtraction method	Rolling ball disk size :2
Band detection sensitivity	75
Molecular weight standard name	RAM14 1-9
Molecular weight regression type	CubicSpline
Mass regression type	Linear
Mass regression formula	N/A
Mass regression R square	N/A

GelQuant Express Report

Experiment RAM30 1-9_24_04_2024 image

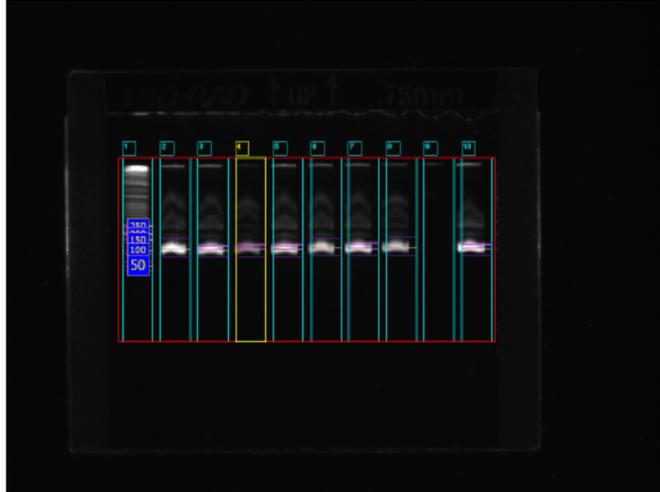


Image Parameters

Software	
Acquisition Date	12/07/2022 21:22:10
Exposure Time	0.16 sec

Band Detection Parameters

Background subtraction method	Rolling ball disk size :70
Band detection sensitivity	75
Molecular weight standard name	RAM14 1-9
Molecular weight regression type	CubicSpline
Mass regression type	Linear
Mass regression formula	N/A
Mass regression R square	N/A



ANEXO 3. Marcadores microsatélites para *Rhea pennata*

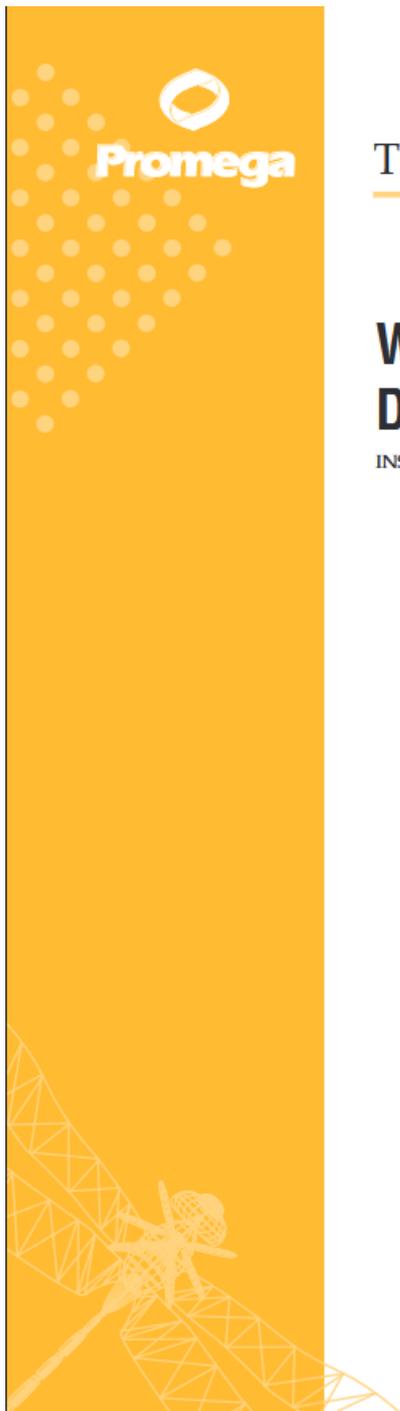
Microsatellite markers for Suri

Locus	GenBank accesión	Forward Primer 5' -3'	Reverse Primer 5' -3'	Repeat motif	Length of alleles (bp)	Reference
Ram 14	JQ067659	GTTGGATTATTTTAACCAATGCAGAT	CTGGCATTGATTCTAAGGAG	(CT) ₉	141	Chiappero & Martella (2012)
Ram30	JQ067664	TGCAATTCTTGCTTAATCTTAGAAGA	GTTTTCACCTGGACAGTTATTCC	(AC) ₁₂	119	Chiappero & Martella (2012)
CA5	AF147059	ACTTCCTCAAGGCTCACAAATCTG	CATGGCAGCAGCACATAAACTG	(CA) ₁₅	201	Taylor et al. (1999)

Nota: Información detallada de los primers utilizados en la presente investigación



ANEXO 4. Kit de extracción de ADN Promega (2020)



Technical Bulletin

Wizard® SV Genomic DNA Purification System

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A2360, A2361 AND A2365.

Digestion Solution: For every tissue sample, combine the following reagents in a tube and store on ice until use:

Digestion Solution Master Mix Components	Volume per Sample	Volume for N Samples
Nuclei Lysis Solution	200µl	(N + 1) × 200µl
0.5M EDTA (pH 8.0)	50µl	(N + 1) × 50µl
proteinase K, 20mg/ml	20µl	(N + 1) × 20µl
RNase A Solution	5µl	(N + 1) × 5µl
Total Volume	275µl	(N + 1) × 275µl

Column Wash Solution (CWA): Add 95% ethanol to the Column Wash Solution (CWA) bottle as directed on the bottle label. Label the bottle to indicate that ethanol has been added. Carefully seal the Column Wash Solution (CWA) and store at room temperature.

3.B. Preparation of Mouse Tail and Tissue Lysates

1. Cut between 0.5 and 1.2cm length of mouse tail from the tip. Alternatively, weigh **up to 20mg** of tissue sample. A 1.2cm mouse tail clipping usually weighs approximately 20mg. Cut the mouse tail clipping or tissue sample into two equally sized pieces and place them in a 1.5ml microcentrifuge tube.

! **Note:** Tissue mass cannot exceed the recommended amount, or columns will clog. Mouse tail clippings must be from within the terminal 2cm of the mouse tail. Samples further from the tip of the tail contain more cartilaginous material that will clog the minicolumn.

2. Add 275µl of the prepared Digestion Solution Master Mix to each sample tube. Be sure that the sample is completely covered with the Digestion Solution Master Mix. If the mouse tail clipping or tissue sample is not covered by the Digestion Solution Master Mix, cut the tissue into smaller pieces.
3. Incubate the sample tubes overnight (16–18 hours) in a 55°C heat block or water bath. It is not necessary to shake the tubes during incubation.
Note: Lysates must be warm for processing.
Optional: After overnight proteinase K digestion, centrifuge samples at 2000 × g to pellet any undigested hair or cartilage. Transfer supernatant to a new 1.5ml microcentrifuge tube.
4. Add 250µl of Wizard® SV Lysis Buffer to each sample. Vortex to mix.
5. Process the tissue lysate as soon as possible after the Wizard® SV Lysis Buffer has been added (lysate must remain warm). If the lysates cannot be processed immediately, they may be frozen at -70°C. However, frozen lysates must be thawed and warmed at 55°C for an hour before continuing with the purification.
6. For purification of genomic DNA using a spin protocol with a microcentrifuge, proceed to Section 3.C. For purification of genomic DNA using a Vac-Man® Vacuum Manifold, proceed to Section 3.D.



3.C. Purification of Genomic DNA from Lysates Using a Microcentrifuge

Prepare one Wizard® SV Minicolumn assembly for each lysate. Each minicolumn assembly consists of a Wizard® SV Minicolumn and a Collection Tube. Label the Collection Tube and place the Wizard® SV Minicolumn assembly in a microcentrifuge tube rack.

1. Transfer the entire sample lysate from the 1.5ml microcentrifuge tube to a Wizard® SV Minicolumn assembly.
2. Place the Wizard® SV Minicolumn assembly containing the sample lysate into a microcentrifuge and spin at $13,000 \times g$ for 3 minutes to bind the genomic DNA to the Wizard® Minicolumn. If some lysate remains on the column after the initial spin, spin again for 1 minute at $13,000 \times g$.
3. Remove the Wizard® SV Minicolumn from the Minicolumn assembly and discard the liquid in the Collection Tube. Replace the Wizard® SV Minicolumn into the Collection Tube.
4. Verify that ethanol has been added to the Column Wash Solution (CWA) as described in Section 3.A.
5. Add 650µl of Column Wash Solution (CWA) to each Wizard® SV Minicolumn assembly.
Note: Washing with 650µl in the spin protocol results in DNA of equivalent purity to that obtained by washing with 800µl in the vacuum protocol.
6. Centrifuge at $13,000 \times g$ for 1 minute.
7. Discard the liquid in the Collection Tube and replace the Wizard® SV Minicolumn into the empty Collection Tube.
8. Repeat Steps 5-7 three times for a total of four washes of the Wizard® SV Minicolumn.
9. After the last wash, empty the Collection Tube and reassemble the Wizard® SV Minicolumn assembly. Centrifuge at $13,000 \times g$ for 2 minutes to dry the binding matrix.
10. Remove the Wizard® SV Minicolumn and place in a new labeled 1.5ml microcentrifuge tube for elution (not provided). Add 250µl of room temperature Nuclease-Free Water to the Wizard® SV Minicolumn. Incubate for 2 minutes at room temperature.
Optional: To improve DNA yield, heat the water to 65°C before adding it to the column for elution.
11. Place the Wizard® SV Minicolumn/elution tube assembly into the centrifuge and spin at $13,000 \times g$ for 1 minute.



12. Remove the Wizard® SV Minicolumn/elution tube assembly from the centrifuge. Add another 250µl of Nuclease-Free Water to the Wizard® SV Minicolumn and incubate at room temperature for 2 minutes. Place the Wizard® SV Minicolumn/elution tube assembly into the centrifuge and spin at 13,000 × g for 1 minute.

13. Total elution volume will be approximately 500µl.

Note: Elution volumes of 500µl are recommended for optimal DNA yield from tissue samples. Elution in volumes less than 500µl will concentrate the DNA but will decrease the total DNA yield.

14. Remove the Wizard® SV Minicolumn and discard. Cap the elution tube containing the purified genomic DNA and store at -20 to -70°C.

3.D. Purification of Genomic DNA from Lysates Using a Vac-Man® Vacuum Manifold

For each sample lysate, use one Wizard® SV Minicolumn. Label each SV Minicolumn to maintain sample identity. If the SV Minicolumn becomes clogged during the vacuum procedure, you can switch to the procedure for purification of the DNA by centrifugation (Section 3.C).

1. Attach one Miniprep Vacuum Adapter (Cat.# A1331) with Luer-Lok® fitting to one port of the manifold. Gently press a Wizard® SV Minicolumn into the Miniprep Vacuum Adapter until snugly in place. Ensure that all unused ports of the vacuum manifold are closed. **Note:** Miniprep Vacuum Adapters are reusable.
2. Transfer the entire prepared sample lysate (Section 3.B) to a Wizard® SV Minicolumn.
3. Apply a vacuum until the lysate passes through the Wizard® SV Minicolumn. After the lysate has passed through the column completely, close the one-way Luer-Lok® stopcock of that port.
4. Verify that ethanol has been added to the Column Wash Solution (CWA).
5. Add 800µl of Wash Solution to each Wizard® SV Minicolumn. Apply a vacuum until the Wash Solution has passed through the SV Minicolumn completely. Close each port after the Wash Solution has passed through.
6. Repeat Step 5 three more times for a total of 4 washes of the Wizard® SV Minicolumn.
7. Following the last wash, open each port and continue to pull a vacuum for 4 minutes to dry the binding matrix.
8. Close each port.
9. Turn off the vacuum source and open an unused port to vent the manifold. If all 20 ports are in use, break the vacuum at the source. Make certain that all vacuum pressure is released before performing the next step. It is important to turn off the vacuum at the source to prevent backflow into the columns.



ANEXO 5. Declaración jurada de autenticidad de tesis



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Luzgarda Flores Sanchez
identificado con DNI 75322363 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
Medicina Veterinaria y Zootecnia

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:
"Caracterización genética de marcadores microsatélites
polimórficos para determinar la variabilidad genética
en el ave suri (Rhea pennata)."

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno, 13 de Diciembre del 2024

Luzgarda Flores Sanchez
FIRMA (obligatoria)



Huella



ANEXO 6. Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio institucional



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Luzgarda Flores Sanchez,
identificado con DNI 75322368 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

Medicina Veterinaria y Zootecnia

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

"Caracterización genética de marcadores microsatélites
polimórficos para determinar la variabilidad genética
en el ave suri (Rhea pennata)"

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los "Contenidos") que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 13 de Diciembre del 2024

[Firma]
FIRMA (obligatoria)



Huella