

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**



**“COLORIMETRÍA Y ASOCIACIÓN DE LOS GENES *MC1R* Y *ASIP*
CON EL COLOR DE VELLÓN NEGRO Y MARRÓN EN ALPACAS
HUACAYA”**

**Presentada por:
RUBÉN PINARES HUAMANÍ**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA ANIMAL**









Lima - Perú

2023

Document Information

Analyzed document	TESIS RUBEN PINARES sustentación.docx (D150075954)
Submitted	11/18/2022 4:02:00 AM
Submitted by	Gustavo A. Gutierrez Reynoso
Submitter email	gustavogr@lamolina.edu.pe
Similarity	3%
Analysis address	gustavogr.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS - JORGE SEDANO.docx Document TESIS - JORGE SEDANO.docx (D140997003) Submitted by: gustavogr@lamolina.edu.pe Receiver: gustavogr.unalm@analysis.arkund.com	 5
J	Polimorfismos de nucleotido simple (PNSs) del gen MC1R en alpacas negras y marrones. (TRABAJOS ORIGINALES) URL: ef808f41-7e7b-4fa8-866f-705b99d33a0b Fetched: 9/3/2021 8:28:43 AM	 2
W	URL: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/87617/Documento_completo.pdf-PDFA1b.pdf?seque... Fetched: 5/26/2022 7:38:17 PM	 8
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / Tesis Calderon 2022 20_06.docx Document Tesis Calderon 2022 20_06.docx (D140997552) Submitted by: gustavogr@lamolina.edu.pe Receiver: gustavogr.unalm@analysis.arkund.com	 7
SA	Tesis - 11-11-19.docx Document Tesis - 11-11-19.docx (D58778556)	 2
W	URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332021000100002 Fetched: 11/9/2021 6:07:20 PM	 1
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587025 Fetched: 11/18/2022 4:13:00 AM	 2
W	URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587027 Fetched: 11/18/2022 4:13:00 AM	 4

Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL

COLORIMETRÍA Y ASOCIACIÓN DE LOS GENES MC1R Y ASIP CON EL COLOR DE VELLÓN NEGRO Y MARRÓN EN

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**

**“COLORIMETRÍA Y ASOCIACIÓN DE LOS GENES *MC1R* Y *ASIP*
CON EL COLOR DE VELLÓN NEGRO Y MARRÓN EN ALPACAS
HUACAYA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
*Doctoris Philosophiae***

**Presentada por:
RUBÉN PINARES HUAMANÍ**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. José Alberto Barrón López
PRESIDENTE

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
ASESOR

Dr. Leyfeng Alan Cruz Camacho
CO - ASESOR

Ph.D. Juan Chávez Cossío
MIEMBRO

Ph.D. Javier Ñaupari Vásquez
MIEMBRO

Dra. María Silvana Daverio
MIEMBRO EXTERNO

Dedicatoria

Esta TESIS dedico a mi maestro, mi señor, mi guía por excelencia, Jesucristo Dios quien me dio la sabiduría, fortaleza espiritual y permitió entrar a este mundo maravilloso del saber. Agradezco infinitamente, por haber cumplido el deber sagrado.

Recuerdo siempre a mis padres: Carlos Pinares y Ana Huamaní, quienes me dieron la vida, el amor y la alegría. A mi amada Neyla (My Love ♥♥) agradezco inmensamente por su inspiración y su constante aliento durante el desarrollo final de esta tesis.

Así, todo buen árbol da buenos frutos, pero el árbol malo da frutos malos. No puede el buen árbol dar malos frutos, ni el árbol malo dar frutos buenos. Todo árbol que no da buen fruto, es cortado y echado en el fuego. Así que, por sus frutos los conoceréis (San Mateo 7:17-20).

Esta tesis la escribí con fe, esperanza y amor.

Agradecimientos

Al CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica) y FONDECYT (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico y de Innovación Tecnológica). Convenio de financiamiento N° 178 - 2015 - FONDECYT.

Resolución de la dirección ejecutiva N° 028 – 2019 - FONDECYT - DE, por el financiamiento de la pasantía en el Laboratorio de Genética Molecular - IMBICE.

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) - UNALM, donde se realizó el aislamiento de leucocitos, extracción de ADN y estandarización de la PCR.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), donde se cuantificó el ADN.

Al Centro Ecológico Recreacional Taraccasa - Municipalidad Provincial de Abancay, por el acceso a las vicuñas (RDG N° 270 - 2019 - MINAGRI – SERFOR - DGGSPFFS).

Programa de Investigación y Proyección Social en Ovinos y Camélidos Americanos (POCA). Laboratorio de Fibras Textiles de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Al Programa de Investigación y Proyección Social en Mejoramiento Animal - UNALM.

A la Dra. Florencia Di Rocco por la Pasantía realizada en IMBICE: Entrenamiento y aplicación de la metodología de secuenciación, análisis e identificación de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) y haplotipos de los genes ASIP y MC1R, asociados al fenotipo negro y marrón en alpacas Huacaya.

A la Dra. María Silvana Daverio por su contribución en la Pasantía realizada en IMBICE, su enseñanza y guía en la tesis (PCR, identificación, análisis, asociación de los SNPs y haplotipos de los genes ASIP y MC1R con el color del vellón en alpacas).

Al Ph.D. Gustavo Augusto Gutiérrez Reynoso, por su asesoramiento en la investigación.

*Al Ph.D Federico Abel Ponce de León por su contribución en el diseño de la investigación, quien sugirió considerar a la *Vicugna vicugna mensalis* como referencia.*

A la Dra. María Wurzinger de la Universidad de BOKU por facilitarnos el colorímetro Chroma Meter CR – 210, para la cuantificación del color de fibra en alpacas y vicuñas.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN DE LITERATURA	03
2.1 La alpaca	03
2.2 Diversidad de color en alpacas	03
2.3 Biosíntesis de melanina y pigmentación del vellón	06
2.4 Genes asociados al color en animales	11
2.5 Genes <i>MC1R</i> y <i>ASIP</i> asociación al color del vellón	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Localización	15
3.2 Obtención de muestras de fibra y análisis por colorimetría	15
3.3 Asociación de los genes <i>MC1R</i> y <i>ASIP</i> con el color de vellón	17
3.3.1 Obtención de muestras de sangre	17
3.3.2 Extracción de ADN	17
3.3.3 Amplificación (PCR) y electroforesis del gen <i>MC1R</i>	19
3.3.4 Amplificación (PCR) y electroforesis del gen <i>ASIP</i>	20
3.3.5 Purificación y secuenciación de amplificados del <i>MC1R</i> y <i>ASIP</i>	21
3.3.6 Identificación de polimorfismos y haplotipos en el gen <i>MC1R</i>	22
3.3.7 Identificación de polimorfismos y haplotipos en el gen <i>ASIP</i>	22
3.3.8 Asociación de los genes <i>MC1R</i> y <i>ASIP</i> con el color del vellón	23
3.3.9 Análisis de estructura y función de la proteína de genes <i>MC1R</i> y <i>ASIP</i>	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Cuantificación del color de fibra por colorimetría	24
4.2 Caracterización del gen <i>MC1R</i>	26
4.3 Polimorfismos y haplotipos del gen <i>MC1R</i> asociados al color del vellón	27
4.4 Estructura y función de la proteína <i>MC1R</i>	32
4.5 Caracterización del gen <i>ASIP</i>	34
4.6 Polimorfismos y haplotipos de gen <i>ASIP</i> asociados al color del vellón	38

4.7 Análisis funcional de la proteína ASIP	42
4.8 Interacción entre los genes <i>ASIP</i> y <i>MC1R</i>	42
V. CONCLUSIONES	45
VI. RECOMENDACIONES	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
VIII. ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Clasificación del color de fibra en alpacas de Perú	04
Tabla 2: Descripción de color blanco, marrón y negro en alpacas australianas	05
Tabla 3: Espectrofotometría: calidad, concentración y cantidad de ADN en vicuña	19
Tabla 4: Lista de cebadores de los genes <i>MC1R</i> y <i>ASIP</i>	20
Tabla 5: Promedio \pm DE de parámetros colorimétricos en fibra de vicuña y alpaca	24
Tabla 6: Polimorfismos en gen <i>MC1R</i> , secuencia codificante y regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) en vicuña y alpaca	28
Tabla 7: Haplotipos constituidos por sustituciones no sinónimas en el gen <i>MC1R</i>	30
Tabla 8: Polimorfismos de un solo nucleótido y delección (c.325_381del) en el intrón 1, exón 2 y exón 4 del gen <i>ASIP</i> en alpacas negras y marrones	36
Tabla 9: Haplotipos y alelos del gen <i>ASIP</i> en alpacas de color y vicuñas	38
Tabla 10: Genotipos para el gen <i>ASIP</i> en alpacas Huacaya de color y vicuñas	41
Tabla 11: Interacción de los genes <i>ASIP</i> y <i>MC1R</i> en alpacas de color	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Cartilla de color del vellón de alpaca	05
Figura 2: Biosíntesis de feomelanina y eumelanina	06
Figura 3: Gránulos de melanina en fibra de alpaca, marrón oscuro y marrón claro	07
Figura 4: Gránulos de eumelanina mostrando estriaciones transversales en la llama	08
Figura 5: Pigmentación eumelánica y feomelánica de la alpaca Huacaya	09
Figura 6: Patrones de pigmentación en el vellón de llama	09
Figura 7: Patrón de pigmentación en vicuña de Abancay y guanaco de Argentina	10
Figura 8: Bulbo piloso pigmentado de vicuña (A y B), cutícula, corteza con médula fragmentada (C) y corteza pigmentada (D)	10
Figura 9: Variabilidad del color en mamíferos domésticos	12
Figura 10: a) Regulación genética de melanogénesis y (b) Pigmentación en fibras	13
Figura 11: Cartilla de color de fibra de alpaca INCA TOPS	16
Figura 12: Muestreo de fibra e identificación del patrón de pigmentación en vicuña	16
Figura 13: Cuantificación del color de fibra con el equipo Chroma Meter CR - 210	17
Figura 14: Bandas de ADN en gel de agarosa al 1 % teñidos con Safe - Green™	18
Figura 15: Bandas de ADN de vicuña en gel de agarosa al 1 % teñidos con GelRed	19
Figura 16: Marcador de peso molecular 100 bp DNA H3 RTU (Ready-To-Use)	21
Figura 17: Amplificados del gen <i>MC1R</i> en electroforesis (1A-15A y control [-])	26
Figura 18: Frecuencias absolutas de haplotipos del gen <i>MC1R</i> en alpaca y vicuña	31
Figura 19: Comparación de proteína MC1R completa y truncada en alpacas	33
Figura 20: Caracterización del exón 4 en el gen <i>ASIP</i> mediante electroforesis	35
Figura 21: Estructura del gen <i>ASIP</i> con polimorfismos identificados en alpaca	35
Figura 22: Alineamiento de secuencia de aminoácidos en el exón 2 del gen <i>ASIP</i>	37
Figura 23: Frecuencias absolutas de haplotipos del gen <i>ASIP</i> en alpaca y vicuña	39

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Caracterización visual de la pigmentación en vicuñas y alpacas de color	57
Anexo 2: Pigmento de feomelanina en vicuña y eumelanina en alpaca negra	59
Anexo 3: Protocolo comercial para la extracción de ADN en sangre entera	60
Anexo 4: Concentración y calidad de ADN extraída en alpacas y una vicuña	61
Anexo 5: Análisis de espectrofotometría con el equipo NanoDrop 8000	63
Anexo 6: Termociclador con perfil de ciclado para el exón 4 del gen <i>ASIP</i>	63
Anexo 7: Protocolo del Kit comercial usado en la PCR del exón 4 del gen <i>ASIP</i>	64
Anexo 8: Alineamiento del electroferograma e identificación de polimorfismo sinónimo (c.354C>T) y no sinónimos (c.376G>A) en el gen <i>MC1R</i>	66
Anexo 9: Alineamiento de c.291C>A y c.292C>T en el exón 4 del gen <i>ASIP</i>	66
Anexo 10: Alineamiento de deleción (c.325_381del) en el exón 4 del gen <i>ASIP</i>	67
Anexo 11: Secuencia codificante del gen <i>MC1R</i> de vicuña en GenBank	68
Anexo 12: Secuencia codificante de gen <i>MC1R</i> , alpaca marrón claro en GenBank	70
Anexo 13: Secuencia codificante del gen <i>MC1R</i> de alpaca negra en GenBank	72

RESUMEN

Los objetivos de esta investigación fueron cuantificar la variación del color de fibra, determinar la asociación de los genes *MC1R* y *ASIP* y su respectiva interacción en la expresión del vellón negro y marrón en alpacas Huacaya. El color de la fibra se cuantificó mediante colorimetría, agrupándose el color negro y marrón-negro en una sola categoría, diferente al marrón oscuro, marrón claro y vicuña. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), purificación de amplicones y secuenciación para los genes *MC1R* y *ASIP* se desarrolló de forma separada. Las secuencias de ambos genes fueron analizadas tomando como referencia la secuencia de vicuña. En el gen *MC1R* de alpaca se identificó una secuencia codificante de 954 pb con una delección c.224_227del y nueve polimorfismos. De ellos cinco fueron no sinónimos: c.82A>G, c.259G>A, c.376G>A, c.587T>C, c.901C>T (p.T28A, p.M87V, p.G126S, p.F196S, p.R301C) y cuatro sinónimos: c.126C>T, c.354C>T, c.618G>A, c.933A>G. Basado en el análisis de haplotipos se propone el alelo dominante (E), recesivo (e) y silvestre (E⁺) para este gen. Las alpacas de color negro/marrón-negro presentan el alelo E en homocigosis y/o heterocigosis. En el exón 4 del gen *ASIP* se identificó dos polimorfismos no sinónimos (c.292C>T, c.353G>A) y una delección de 57 pb (c.325_381del), en base a ello se propone tres alelos con pérdida de función a¹, a², a³ en alpacas negro/marrón-negro, marrón oscuro y claro, mientras que el alelo silvestre (A⁺) en homocigosis se presentó en 50 por ciento de alpacas blancas, 18.18 por ciento del marrón claro y 100 por ciento de vicuñas. Los alelos a¹, a², a³ del gen *ASIP* en combinación con el alelo E del gen *MC1R* definen los colores negro y marrón-negro. Las alpacas marrones tienen mayor variabilidad alélica en los genes *MC1R* y *ASIP* con genotipos heterocigotos que resultan en una gran diversidad fenotípica. En conclusión, el color del vellón de alpaca se debe a los diferentes alelos de los genes *MC1R* y *ASIP*, estos alelos y genotipos propuestos contribuirá en la selección de alpacas Huacaya de color negro y marrón y en el mejoramiento de la producción de vellones uniforme.

Palabras clave: Gen, *MC1R*, *ASIP*, haplotipo, genotipo, color de fibra

ABSTRACT

The objectives of this research were to quantify the fiber color variation, to determine the association of *MC1R* and *ASIP* genes and their respective interaction in the expression of black and brown fleece in Huacaya alpacas. Fiber color was quantified by colorimetry, grouping black and brown-black in a category, different from dark brown, light brown and vicuña. Polymerase chain reaction (PCR), amplicon purification, and sequencing of *MC1R* and *ASIP* genes were performed separately. The sequences of both genes were analyzed considering the vicuña sequences as reference. In alpaca *MC1R* gene, a coding sequence of 954 bp with c.224_227del and nine polymorphisms was identified. Five were non-synonymous: c.82A>G, c.259G>A, c.376G>A, c.587T>C, c.901C>T (p.T28A, p.M87V, p.G126S, p.F196S, p.R301C) and four synonyms: c.126C>T, c.354C>T, c.618G>A, c.933A>G. Based on haplotype analysis, the dominant allele (E), recessive (e) and wild type (E⁺) in this gene are proposed. Black/brown-black alpacas have E allele in homozygosis and/or heterozygosis. In exon 4 of *ASIP* gene, two non-synonymous polymorphisms (c.292C>T, c.353G>A) and 57 bp deletion (c.325_381del) were identified. Based on this, three alleles with loss of function a¹, a², a³ were proposed, they are present in black/brown-black, dark brown and light alpacas, while the wild allele (A⁺) in homozygosis was present in 50 percent of white alpacas, 18.18 percent of light brown and 100 percent of vicuñas. The a¹, a², a³ alleles of *ASIP* gene in combination with E allele of *MC1R* gene define the colors black and brown-black. Brown alpacas have greater allelic variability in *MC1R* and *ASIP* genes with heterozygous genotypes, resulting in a great phenotypic diversity. In conclusion, the color of alpaca fleece is due to different alleles of *MC1R* and *ASIP* genes, these proposed alleles and genotypes will contribute to selection of black and brown Huacaya alpacas, improving uniform fleece production.

Key words: *Gene, MC1R, ASIP, haplotype, genotype, fiber color*

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca muestra una gran diversidad genética de colores naturales (Vallejo *et al.* 2012), siendo los básicos el negro, marrón y blanco (Gandarillas 1971). A nivel nacional e internacional, la demanda industrial de la fibra motivó la selección del blanco, lo que permitió el blanqueo generalizado en los rebaños de alpaca del Perú. Consecuentemente, la calidad textil de la fibra fue mejorada genéticamente reduciéndose su diámetro medio de fibra. En este contexto, la estructura poblacional de alpacas de color ha sufrido una erosión genética, quedando en mayor frecuencia animales con tonalidades claras y marrones.

La alta presión de selección del blanco ha contribuido a la disminución de la variabilidad genética de alpacas negras, reduciéndose la población a menos del 2 por ciento (Chaparro 2010), actualmente estos animales aún se conservan por pequeños productores en las Comunidades Campesinas de Apurímac, Cusco, Puno, Ayacucho y Huancavelica (Oria *et al.* 2009; Aragón y Mamani 2018). Estas alpacas muestran ventajas adaptativas de rusticidad por su mayor capacidad de retención la radiación solar en su vellón (Vallejo *et al.* 2012) y las crías de color oscuro presentan bajos porcentajes de mortalidad comparado con el blanco (Bustinza 1968).

La fibra de color natural, aunque mantiene un bajo precio a nivel de productores locales, es atractiva para los consumidores finales, por ser un producto ecológico y no requieren el teñido con productos químicos, más bien contribuye en el ahorro de la energía y agua en la manufactura. En el mercado internacional las prendas ecológicas de alpaca, especialmente el color negro está siendo revalorado por sus atributos únicos y su demanda es creciente por parte de los consumidores finales. En ese sentido, se puede reorientar la producción sostenible de colores uniformes y a su vez promover la conservación de su biodiversidad (Aragón y Mamani 2018).

El color negro y marrón del vellón se debe a la presencia de gránulos de melanina localizados principalmente en la corteza y la médula de la fibra (Wang *et al.* 2005). Los dos tipos de pigmentos son: eumelanina (oscura e insoluble) presente en el negro y la feomelanina (soluble en álcali) presente en el marrón (Wakamatsu *et al.* 2021).

La cantidad, calidad y la proporción relativa entre estos dos tipos de melanina determinan los colores básicos en camélidos andinos, las concentraciones más altas de melanina total y eumelanina distinguen el vellón negro del marrón rojizo oscuro (Cecchi *et al.* 2011; Anello *et al.* 2022b). La expresión génica de la pigmentación del vellón en alpacas Huacaya fue analizada inicialmente por la cuantificación bioquímica de los tipos de melanina (Fan *et al.* 2010; Cecchi *et al.* 2011; Cransberg *et al.* 2013) y en seguida mediante secuenciación, caracterización y asociación de los polimorfismos en los genes *MC1R* y *ASIP* (Powell *et al.* 2008; Feeley y Munyard 2009; Feeley *et al.* 2011; Chandramohan *et al.* 2013, 2015).

La asignación del color de forma subjetiva y visual limita su relación con el genotipo, debido a la naturaleza compleja de la expresión del color (Gransberg 2017; Anello *et al.* 2022b). Los mecanismos moleculares que controlan la pigmentación uniforme del vellón en alpacas han sido poco explorados, particularmente la interacción epistática recesiva entre los alelos de los genes *MC1R* y *ASIP* (Pallotti *et al.* 2020). En este sentido la cuantificación del color y la determinación del genotipo facilitaría la selección de reproductores, acelerando el mejoramiento genético de las características productivas y textiles de fibra negra y marrón.

Por tanto, el objetivo general de esta investigación fue cuantificar la variación del color de la fibra mediante colorimetría y determinar la asociación de los genes *MC1R* y *ASIP* con el vellón negro y marrón en alpacas Huacaya. Los objetivos específicos fueron: a) cuantificar la variación del color de la fibra negra, marrón, blanca en alpaca Huacaya y en vicuña según las coordenadas colorimétricas $L^*a^*b^*$, y b) determinar la asociación de los genes *MC1R* y *ASIP* y su respectiva interacción en la expresión del vellón negro y marrón en alpacas Huacaya. La hipótesis general de esta investigación es que existe una asociación de los genes *MC1R* y *ASIP* y su respectiva interacción en la expresión del vellón negro y marrón en alpacas Huacaya.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA ALPACA

La alpaca (*Vicugna pacos*) es el más pequeño de los camélidos domésticos, está orientada a la producción de fibra para la industria textil nacional e internacional. Dentro de esta especie se reconocen dos razas, la Huacaya y la Suri (Bustinza *et al.* 2021; Renieri *et al.* 2009). Existen diferencias entre el vellón de la alpaca Huacaya y Suri; en la densidad folicular, relación de los folículos secundarios y primarios, en la forma y estructura cuticular (Antonini 2010); así como en la estructura medular de la fibra (Wang *et al.* 2005; Antonini 2010). Además, la Huacaya se caracteriza por tener el vellón denso con fibras rizadas (Antonini 2010).

Los análisis genómicos y estudios del ADN mitocondrial han determinado que la alpaca deriva de la domesticación de la vicuña (Kadwell *et al.* 2001; Gentry *et al.* 2004; Marín *et al.* 2017; Fan *et al.* 2020). Taxonómicamente la alpaca queda clasificada en:

Clase : Mamalia
Orden : Artiodáctyla
Suborden : Tylópoda
Familia : Camelidae
Tribu : Lamini
Género : *Vicugna*
Especie : *Vicugna pacos*

2.2 DIVERSIDAD DE COLOR EN ALPACAS

La terminología empleada para la denominar los colores de vellón en la alpaca es inconsistente, inadecuada y ambigua. La industria textil refiere hasta 22 colores de fibra, basada en la subjetividad de la percepción visual (Morante *et al.* 2009) y en el sistema de Munsell (Fan *et al.* 2010). La amplia variabilidad de colores de fibra podría explicar las tonalidades y/o combinación de colores naturales en la manufactura industrial. La Norma Técnica Peruana NTP 231.301 (2014) indica que la clasificación de las diferentes tonalidades de los colores básicos naturales debe ser realizada por un personal calificado

de forma manual y visual (Tabla 1). Las tonalidades de vellón marrón muestran mayor diversidad, las cartillas de colores comerciales ayudan a la asignación y registro homogéneo del color de fibra, registrándose hasta 16 tonalidades (Figura 1).

En el vellón de alpacas los colores más comunes y comerciales son el blanco, beige con intensidad X, Y, Z (LFX, LFY, LFZ), marrón claro, marrón oscuro, marrón oscuro negro y negro (Cruz 2017). Cransberg *et al.* (2013) investigando varias tonalidades de marrones, para determinar su origen genético, concluyeron que en el color marrón de la alpaca se expresa predominantemente la feomelanina y la variación de sus tonalidades se debe a los altos niveles de feomelanina y bajas cantidades relativas de eumelanina negra.

Tabla 1: Clasificación del color de fibra en alpacas de Perú

	Denominación	Símbolo
	Blanco	B
	Beige	LFX
Colores enteros	Vicuña claro	LFY
	Vicuña oscuro	LFZ
	Café claro	CC
	Café oscuro marrón	COM
	Café oscuro negro	CON
	Negro	N
	Blanco manchado claro	BMC
	Blanco manchado oscuro	BMO
Colores canosos	Negro manchado	NM
	Gris claro con canas blancas	GC
	Gris plata (canoso)	GP
	Negro manchado	GO
Colores indefinidos	Indefinidos claros	IC
	Indefinidos oscuros	IO

Fuente: Norma Técnica Peruana NTP 231.301 (2014)

La caracterización del color y tonalidad de la alpaca se inicia cuantificando objetivamente la pigmentación de la fibra y piel (Tabla 2). Los colores básicos como el marrón y negro dependen del tipo de melanina y su distribución uniforme en todo el cuerpo, que incluye cabeza cuello, vellón y las extremidades (Cecchi *et al.* 2011; Cransberg *et al.* 2013).

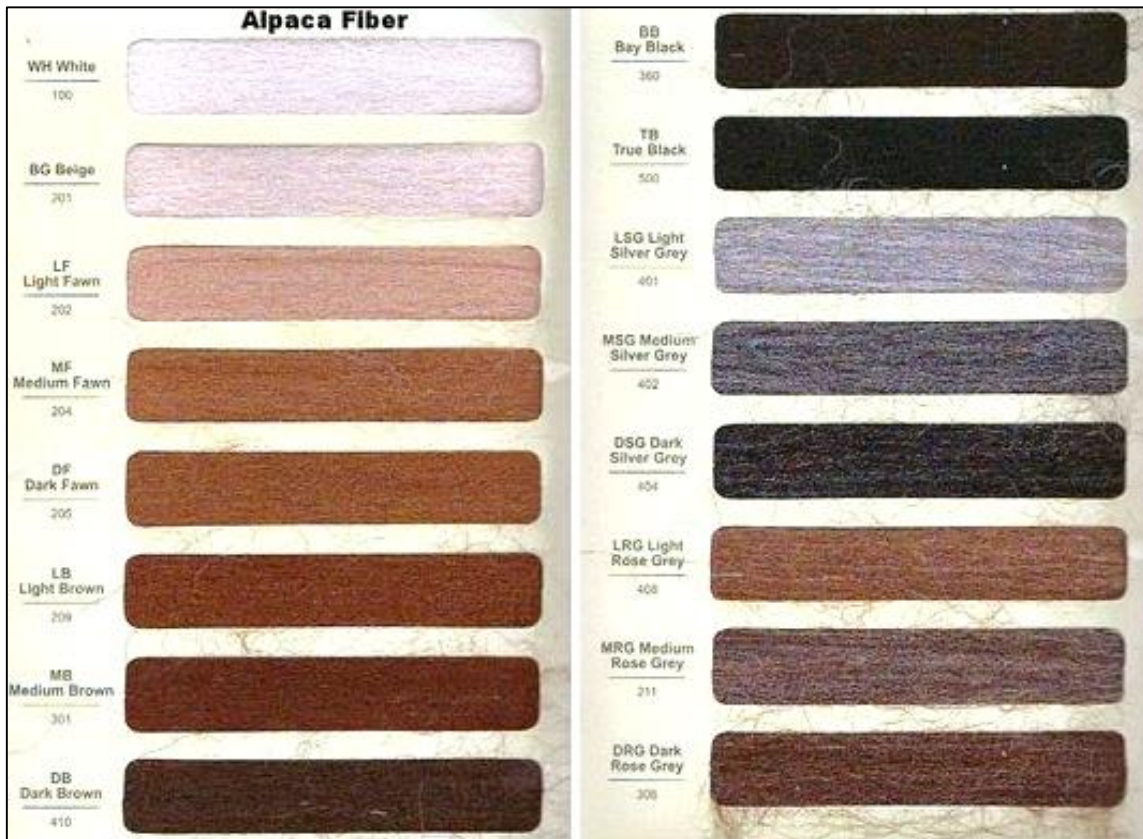


Figura 1: Cartilla de color del vellón de alpaca

Fuente: Adaptado de Australian Alpaca Association (2012)

Tabla 2: Descripción de color blanco, marrón y negro en alpacas australianas

Color del animal	Descripción del color de la fibra y piel
Blanco albino	Fibra blanca sobre piel rosada
Blanco no albino	Fibra blanca sobre piel pigmentada
Beige sobre piel rosada	Fibra amarilla a rojo, intensidad pálida-moderada sobre piel rosada
Beige sobre piel oscura	Fibra amarilla a rojo pálida-moderada sobre piel oscura
Bayo ligero	Fibra amarilla a rojo claro sobre piel oscura y extremidades negras
Bayo	Fibra amarilla a rojo oscuro sobre piel oscura y extremidades negras
Marrón negro	Fibra muy oscura con melanina mixta sobre piel eumelánica
Negro	Fibra negra sobre piel oscura

Fuente: Adaptado de Feeley (2015) y Cransberg (2017)

Cransberg (2017) denomina bayo, al "marrón" descrito por los criadores y organizaciones alpaqueras, porque se asemeja mucho al color bayo de los caballos. Color que juzgado por una persona podría ser calificado como marrón claro; asimismo, el marrón intermedio

calificado como marrón oscuro o viceversa. El color del animal se define por el tipo de pigmentación de su fibra; la pigmentación de su piel, mucosas y pezuñas complementa el registro del color de vellón (Cransberg *et al.* 2013; Cransberg 2017).

2.3 BIOSÍNTESIS DE MELANINA Y PIGMENTACIÓN DEL VELLÓN

En los melanocitos de la epidermis del folículo piloso se desarrolla la melanogénesis, a partir de la activación enzimática del aminoácido L-tirosina, la enzima tirosinasa (TYR) cataliza la oxidación hasta 3,4 - dihidroxifenilalanina (DOPA) y Dopaquinona (Ando *et al.* 2007; Kondo y Hearing 2011). La dopaquinona es el principal sustrato intermediario en la síntesis de eumelanina y feomelanina. En la síntesis de eumelanina se requiere la intervención del dopacroma tautomerasa (DCT) conocido como *TYRP2* (Figura 2).

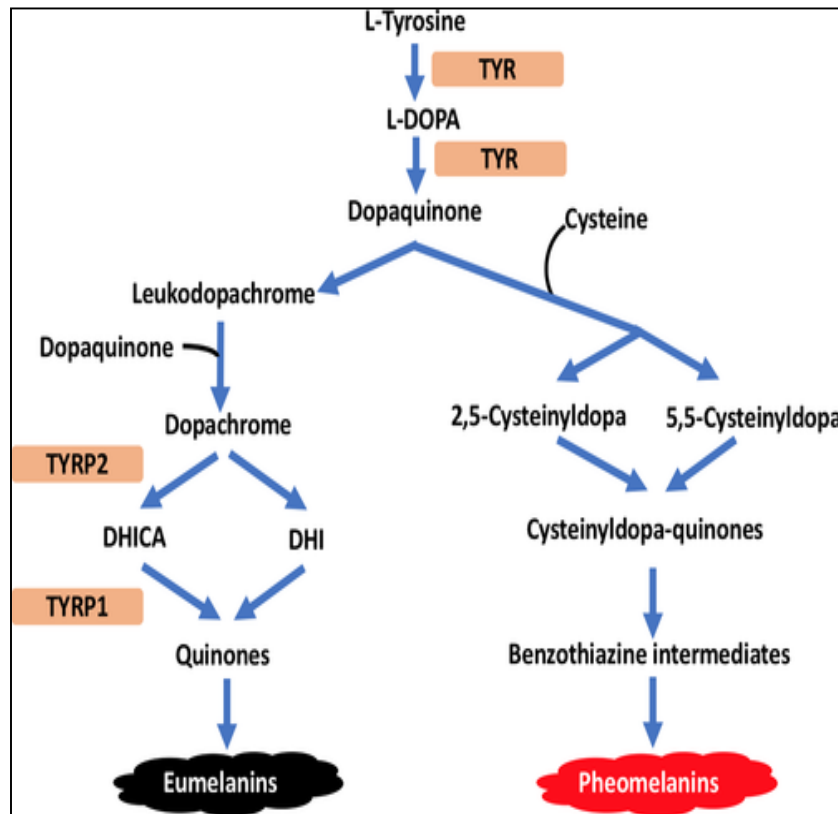


Figura 2: Biosíntesis de feomelanina y eumelanina

Fuente: Nguyen y Fisher (2018)

El AMP cíclico es activado por el gen *MC1R* y estimula la actividad enzimática de la tirosinasa, junto con las enzimas eumelanicas específicas: proteínas relacionadas con la tirosinasa *TYRP1* y *TYRP2*. El dopacromo se descarboxila espontáneamente en 5, 6-dihidroxiindol (DHI).

Si se dispone de dopacromo tautomerasa (*DCT*) el dopacromo se tautomeriza sin perder su ácido carboxílico para formar el 5,6 - dihidroxiindol - 2-ácido carboxílico (DHICA) en la síntesis de eumelanina (García-Borrón *et al.* 2005; Wakamatsu *et al.* 2021). En presencia de la cisteína se forma 2.5 o 5.5-cisteinildopa, que se oxida para dar lugar a cisteinildopa-quinonas, el intermediario de benzotiazina, de esta forma se sintetiza la feomelanina (Galbraith 2010; Nguyen y Fisher 2018). La melanogénesis es una vía sintéticamente compleja que involucra una serie de reacciones químicas, enzimáticas y no enzimáticas para producir dos tipos distintos de melaninas.

Los gránulos de melanina se observan antes de la queratinización de las células foliculares de la fibra (Wang *et al.* 2005). Numerosos gránulos de pigmento residen sueltos dentro de la fibra marrón y marrón oscura, distribuyéndose por debajo de las cutículas, dentro de las células corticales y médula (Figura 3). En la alpaca marrón es de tipo redondo y su tamaño es más pequeño que en fibra marrón oscura (Wang *et al.* 2005).

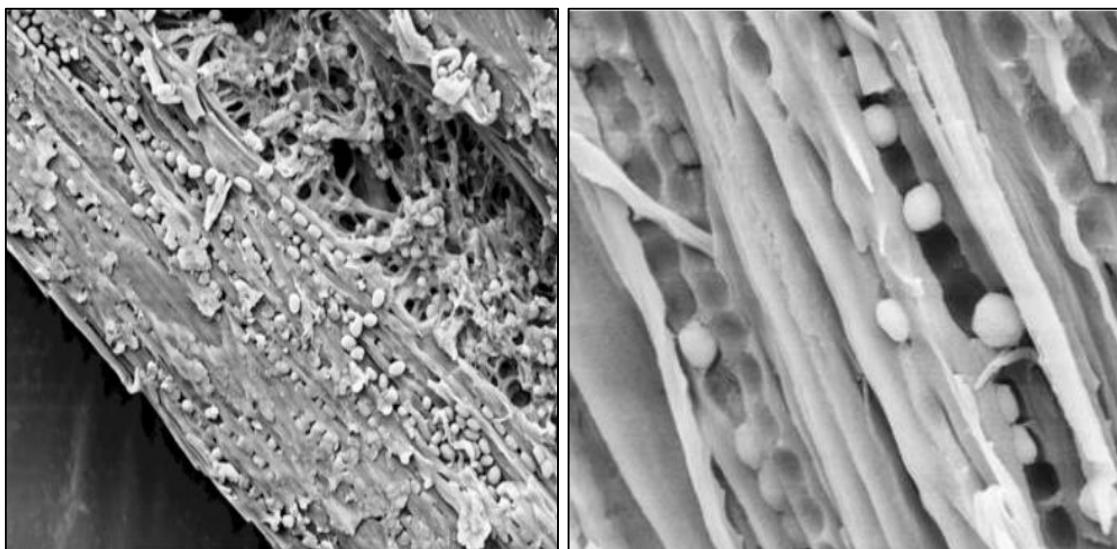


Figura 3: Gránulos de melanina en fibra de alpaca, marrón oscuro y marrón claro

Fuente: Adaptado de Wang *et al.* (2005)

Cecchi *et al.* (2011) y Cransberg *et al.* (2013) describen principalmente la eumelanina en alpacas negra con poca o mínima presencia de eumelanina en alpaca marrón, mientras que la feomelanina abunda en el marrón claro. Las melaninas y melanosomas de llama (*Lama glama L.*) descrito por Cecchi *et al.* (2004) explica la morfología del melanosoma y el grado de la madurez (etapas I a IV).

Tres tipos diferentes de melanosomas totalmente melanizados fueron identificados en el negro, marrón oscuro y marrón claro, respectivamente. La disminución de la intensidad de la melanogénesis parece estar relacionada con el aumento del número de melanosomas inmaduros en el marrón claro comparado con el negro. Los eumelanosomas son redondos y de forma ovalada y presentan estrías transversales (Figura 4) visibles con microscopio (Cecchi *et al.* 2004).

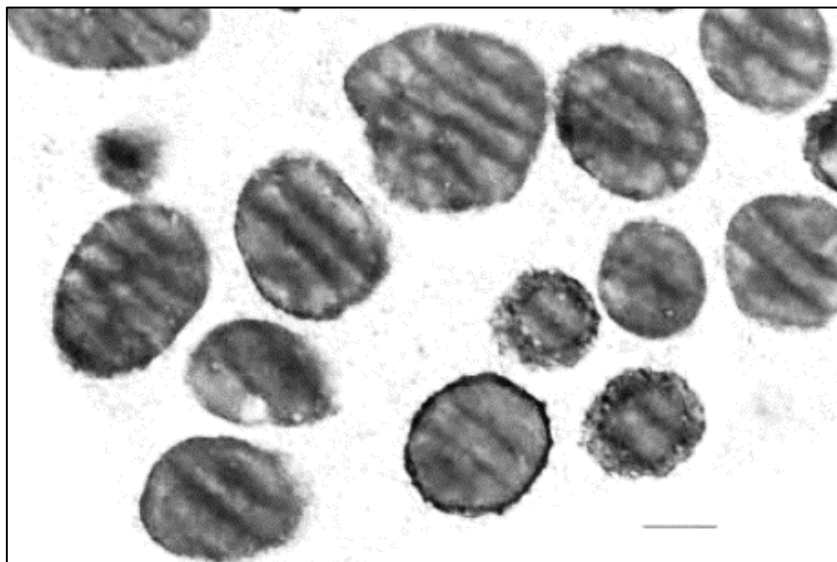


Figura 4: Gránulos de eumelanina mostrando estrías transversales en la llama

Fuente: Adaptado de Cecchi *et al.* (2004)

La cantidad total de melanina y eumelanina fueron superiores en la fibra negra, mientras que en la fibra marrón claro disminuye (Cecchi *et al.* 2011). Por el contrario, estos valores aumentan cuando la pigmentación pasa del blanco al negro, aunque la feomelanina se mantiene en pocas cantidades en el negro (Cecchi *et al.* 2004; Fan *et al.* 2010). Por otro lado, Adalsteinsson (1983) en ovinos, Frank (2001) en llamas, Renieri *et al.* (2004) en llamas y alpacas sugieren un sistema de clasificación y registro de la variación del color basado en tres criterios: tipo de pigmento (eumelanina y feomelanina), patrón de pigmentación y presencia/ausencia de manchas blancas. Los colores básicos en el vellón dependen de la cantidad y relación de eumelanina y feomelanina. Los patrones pigmentarios se refieren a la variación en la distribución de los pigmentos sobre todo el cuerpo (sentido dorsal - ventral). El primer problema en alpacas marrón (Figura 5) es distinguir a la eumelánica (marrón oscuro) de la feomelánica (tonalidad clara).



Figura 5: Pigmentación eumelánica y feomelánica de la alpaca Huacaya

Fuente: Cruz (2017)

Adalsteinnsson (1983) refiere que los patrones pigmentarios se expresan sobre los colores básicos. Frank (2001) describió los patrones pigmentarios en llamas argentinas (Figura 6, izquierda a derecha), eumelánico total o negro/marrón oscuro (tapado oscuro), negro/marrón oscuro con parte ventral y extremidades feomelánicas (Doberman), marrón rojizo con extremidades y cara negra (cara negra), marrón rojizo con extremidades y barriga negra (panza negra), silvestre (vicuña) y feomelánico (tapado claro).

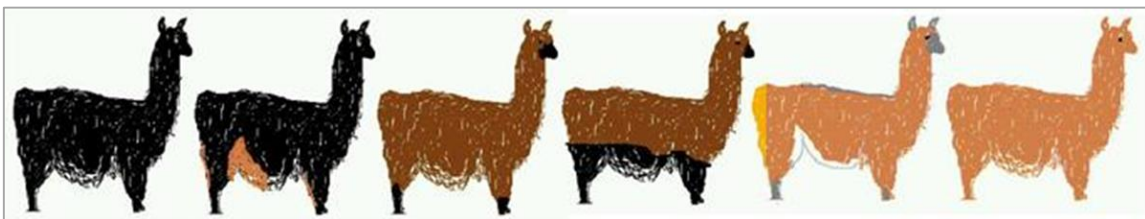


Figura 6: Patrones de pigmentación en el vellón de llama

Fuente: Modificado de Frank (2001)

El patrón clásico de la pigmentación se observa en los camélidos silvestres, vicuñas y guanacos. La vicuña una pigmentación una tonalidad de pigmentación ligeramente más intensa en el manto, cuello y cabeza y menos intensa en las extremidades, parte ventral (ingle, barriga y pecho) con presencia fibras blancas (Figura 7a). El guanaco presenta una pigmentación marrón rojizo en paleta, dorso y grupa (vellón), mientras que en la cabeza y las orejas se observa el gris oscuro, evidenciándose la expresión de ambos pigmentos (eumelanina y feomelanina) sobre el cuerpo entero (Figura 7b).



Figura 7: Patrón de pigmentación: a) vicuña de Abancay b) guanaco de Argentina
 Fuente: Fotografía tomada por el autor

El mecanismo de pigmentación en los mamíferos es un proceso altamente conservado a pesar de sutiles diferencias que existen entre especies. La pigmentación de la fibra está en función del tipo, composición, cantidad y forma de los gránulos de melanina (Cecchi *et al.* 2004, 2011). La presencia y/o ausencia de pigmentación y su distribución son propiedades importantes para el procesamiento comercial de las fibras animales (Allain y Renieri 2010). Estos gránulos color se localizan en el folículo y células corticales de la fibra (Figura 8), proporcionando muchas grietas en las fibras que pueden contribuir a la mayor flexibilidad, calidez y suavidad de las mismas (Wang *et al.* 2005).

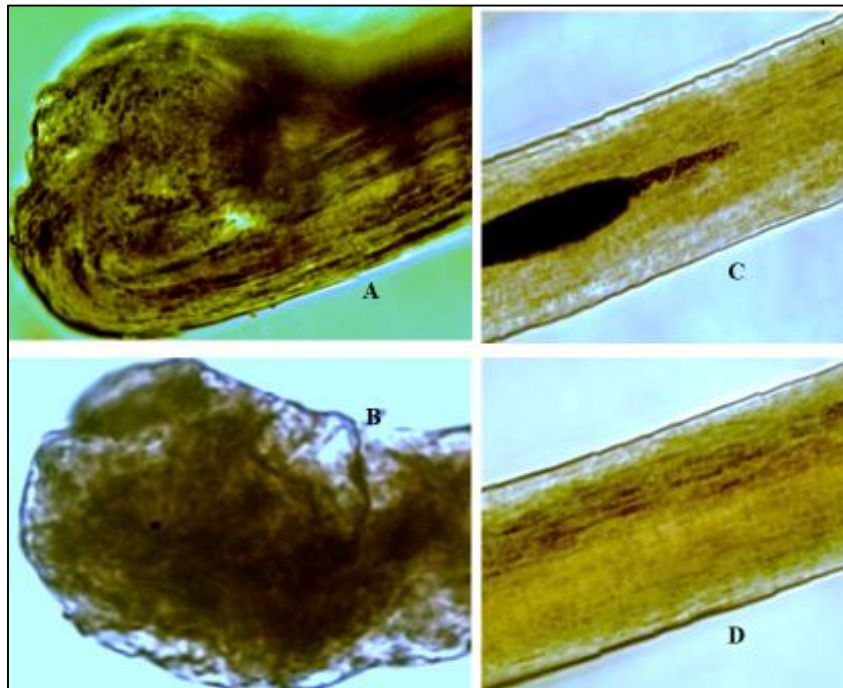


Figura 8: Bulbo piloso de vicuña (A y B), cutícula, corteza y médula fragmentada en fibra (C) y corteza pigmentada (D). Fotografía microscópica a 100 X

2.4 GENES ASOCIADOS AL COLOR EN ANIMALES

En los animales domésticos el color es muy importante para distinguir entre razas y variedades, además el color del vellón es importante para la supervivencia de animales en climas diversos (Koseniuk *et al.* 2018). Darwin clasificó la selección en tres tipos, selección inconsciente, selección metódica y selección natural (Mason 1973). Inicialmente la selección de los animales era de forma inconsciente, guiado por algunas características de interés (en inglés fancy point), posteriormente la selección era metódica por sus características productivas.

Las adaptaciones evolutivas selección natural en las especies silvestres y la selección dirigida por el hombre en animales domésticos (Cieslak *et al.* 2011; Linderholm y Larson 2013) han generado nuevas mutaciones en los genes del color, las que se expresan en diferentes patrones pigmentarios (Figura 9). El color de los animales era una de las principales características para la selección (Cieslak *et al.* 2011; Linderholm y Larson 2013; Librado *et al.* 2017). El color similar observado en diferentes especies domésticas es por la expresión de pocos genes conservados, sus alelos pueden ser responsables de colores similares en diferentes individuos de una especie o en diferentes especies o pueden influenciar diferentes expresiones del color (Cieslak *et al.* 2011).

Por lo tanto, para definir el color es importante entender su complejidad genética y los mecanismos de la herencia. Por ejemplo, el color del vellón de la oveja silvestre muestra un patrón de pigmentación marrón oscuro (barriga pálida), los criadores han domesticado y seleccionado preferentemente por el vellón blanco uniforme (Norris y Whan 2008; Cieslak *et al.* 2011). Los camélidos andinos también fueron seleccionados por el color de su vellón, lo que favoreció una diversidad de alelos responsables de colores oscuros y sus tonalidades (Bustinza 1968; Daverio *et al.* 2016; Marín *et al.* 2018).

La alpaca es descendiente de la vicuña (Fan *et al.* 2020) la variabilidad del color de su vellón proviene de la vicuña. Se sugiere que a partir de la vicuña se dio mutaciones dominantes y recesivas en los principales genes involucrados en la herencia del color. Los incas tenían especial cuidado en el manejo de los camélidos, ellos registraban y seleccionaban sistemáticamente por la calidad y color del vellón (negro, marrón y blanco) utilizando un sistema decimal de nudos “*quipos*” término que proviene de la palabra quechua “*hipu*” (Weeler *et al.* 1995).

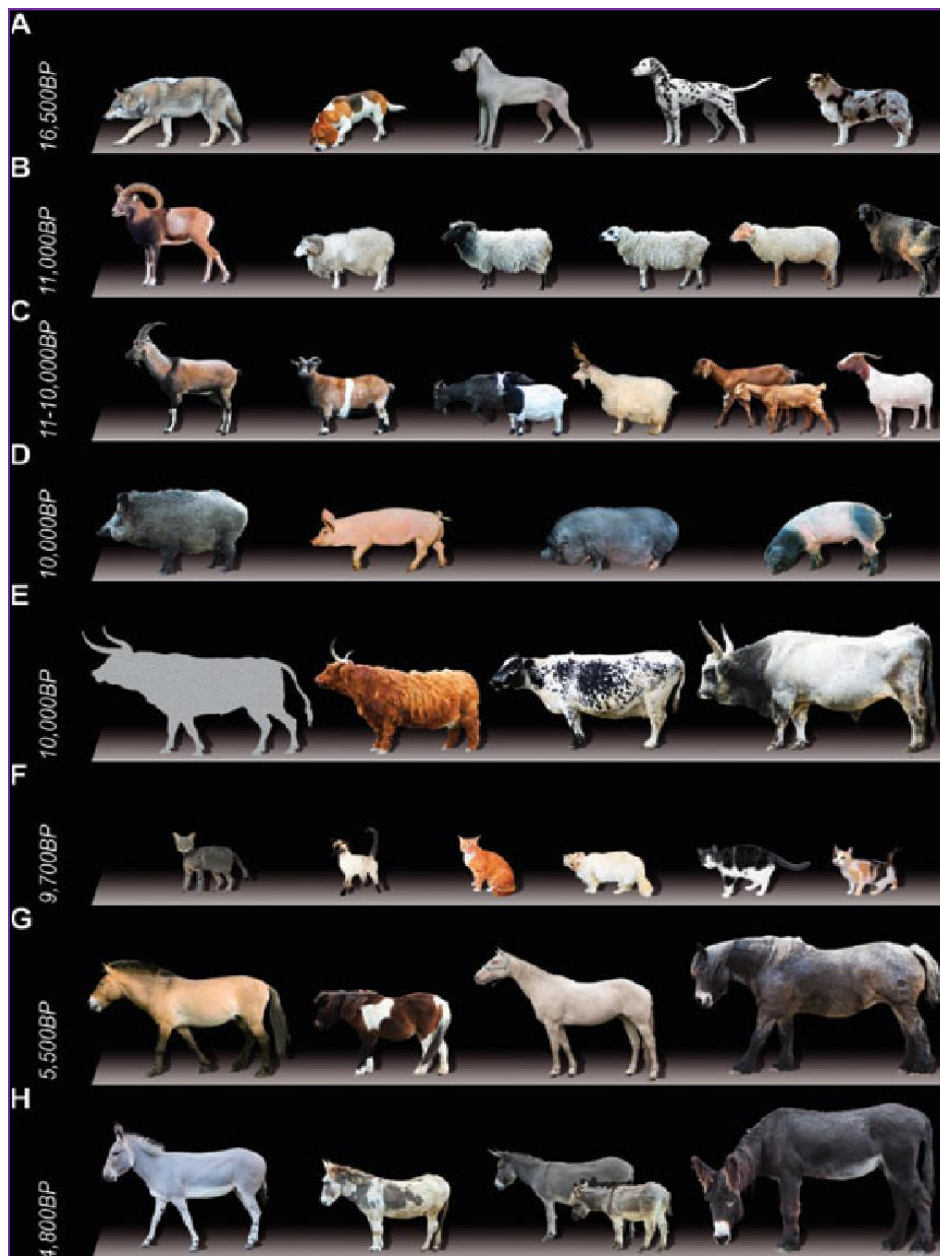


Figura 9: Variabilidad de color en mamíferos domésticos. BP: antes del presente
Fuente: Adaptado de Cieslak *et al.* (2011)

La pigmentación de la piel y la fibra está controlada por muchos genes que se activan en momentos y lugares diferentes, algunas veces actuando al mismo tiempo cuando existe interacción. En ovinos se ha descrito más de 150 genes (Rochus *et al.* 2019) de estos genes, el receptor 1 de melanocortina (*MC1R*) y la proteína de señalización agutí (*ASIP*) fueron asociados con la variación del color en el vellón de alpaca *ASIP* (Powell *et al.* 2008; Feeley y Munyard 2009; Feeley *et al.* 2011; Chandramohan *et al.* 2013, 2015; Marín *et al.* 2018).

El genoma de referencia de alpaca a nivel cromosómico VicPac3.1 amplía y mejora el entendimiento genómico de estos genes (Richardson *et al.* 2019), en la alpaca fueron localizados en el chr21 el gen *MC1R* y el gen *ASIP* en el chr19 mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (Alshanbari *et al.* 2019). Los principales genes estudiados en la alpaca: *MC1R*, *ASIP*, tirosinasa (*TYR*) y las proteínas relacionadas con la tirosinasa (*TYRP1* y *TYRP2*) fueron relacionados con la melanogénesis y la pigmentación del vellón, como fue descrito en ratones (Figura 10). En la alpaca se ha informado la influencia de otros genes como el *MITF*, *KIT* y *MATP* que intervienen en el transporte y la transferencia de pigmentos (Munyard 2011; Cransberg y Munyard 2011; Jackling *et al.* 2014; Feeley *et al.* 2016). Paralelamente, la Alpaca Research Foundation realiza investigaciones sobre la genética de la pigmentación en alpacas (Kooyman 2021).

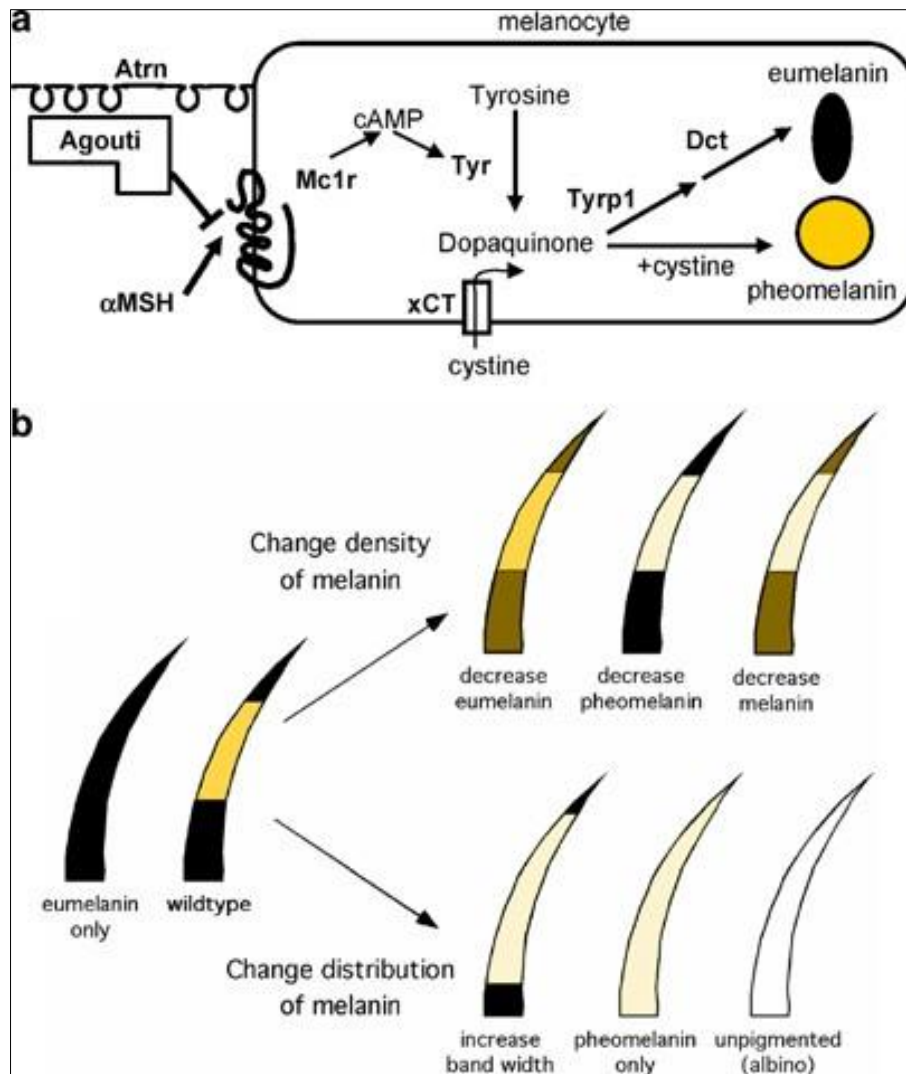


Figura 10: a) Regulación genética de melanogénesis y (b) Pigmentación en fibras
Fuente: Hoekstra (2006)

2.5 GENES *MC1R* Y *ASIP* ASOCIACIÓN AL COLOR DEL VELLÓN

El estudio sobre la herencia del color de la alpaca es limitado, la información se sustenta en los apareamientos y análisis de segregación. Bustinza (1968) refiere cuatro genes involucrados en la herencia de colores del vellón en alpacas, el color vicuña (v^+), color (c^+), negro (n^+) y extensión (v^+) conocido como el gen *MC1R*. El color blanco no albino es dominante sobre los pigmentados y manchados (Valbonesi *et al.* 2011). Los animales con cara y extremidades negras son dominantes sobre los negros (Frank *et al.* 2006). Gandarillas (1971) señala que el color marrón es completamente dominante sobre el negro. Estos autores coinciden en que los animales pigmentados eumelánicos son dominantes sobre los animales feomelánico.

El alelo dominante del gen *MC1R* fue asociado con la pigmentación del vellón negro en alpacas de EE UU (Powell *et al.* 2008). En otro estudio de alpacas australianas Feeley *et al.* (2011) identificaron tres polimorfismos con pérdida de función (c.292C>T, c.325_381del57 y c.353G>A) el gen *ASIP* asociados con el color negro (0.90), lo que sugiere que los criadores de alpacas seleccionen con facilidad el negro, aunque los genotipos definidos por estas tres mutaciones no son específicos de alpacas negras. Posteriormente estas tres mutaciones, dos de tipo SNP (single nucleotide polymorphisms) y una deleción de 57 pb en el exón 4 del gen *ASIP* fueron descritas en la población de alpacas de Puno, Perú (Chandramohan *et al.* 2013).

La interacción de los alelos de *MC1R* y *ASIP* regulan la producción del pigmento eumelanina en el vellón negro y feomelanina en el marrón claro y sus tonalidades (Pallotti *et al.* 2020). El gen *ASIP* actúa como un antagonista del gen *MC1R* al anular la acción de α -MSH, por lo tanto, la pérdida de función de *MC1R* resulta en la producción de feomelanina, mientras que la pérdida de función de *ASIP* induce la producción de eumelanina (Daverio *et al.* 2016; Almathen *et al.* 2018; Pallotti *et al.* 2020). Por otro lado, se demostró que el gen *ASIP* está altamente expresado en animales blancos y marrones, mientras que los animales negros presentaron muy baja expresión tanto en alpacas y llamas (Cransberg 2017; Anello *et al.* 2022a).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El Fundo Pacamarca está ubicado en las coordenadas geográficas 14°59'36" Latitud sur, 70°56'02.7" longitud oeste, a una altitud de 4060 msnm en el distrito de Llalli, provincia de Melgar y región de Puno. Cuenta aproximadamente con 1378 ha, ecosistema de puna húmeda (altiplano), con una precipitación pluvial media de 700 mm/año, con temperaturas que varían dependiendo de la estación y la hora entre -9°C a 21°C, con humedad relativa entre 40 y 60 por ciento. La alimentación consiste en pastoreo y suplementación con forraje fresco y heno de avena.

Este centro de investigación cuenta con una población aproximada de 665 alpacas negras, de las cuales más del 50 por ciento fueron comprados de otros fundos. El manejo se organiza en rebaños separados de machos y hembras. La selección por el color uniforme, se aplica en las crías, las que presentan mancha y defecto son eliminados antes del destete. El empadre de alpacas negras es dirigido, según la información genealógica. En Pacamarca el color de la cría se asigna subjetivamente utilizando una cartilla de colores desde blanco hasta negro, según la nomenclatura descrita en la Tabla 1. A partir del año 2018 se inició el registro del color mediante colorimetría (Cruz *et al.* 2021).

3.2 CUANTIFICACIÓN DEL COLOR DE FIBRA POR COLORIMETRÍA

Los animales del Fundo Pacamarca (Puno) fueron muestreados previo un riguroso análisis de la genealogía (coancestría), eligiéndose los animales con el mayor número de descendencias y menos emparentados entre ellos (sin evidencias de consanguinidad) estos animales fueron comprados de otros rebaños e incorporados en del Fundo Pacamarca y fueron registrados usando el software PacoPro Versión 5.10.

Las muestras de fibra fueron obtenidas del costillar medio de la alpacas machos y hembras de todas las edades, considerando los siguientes colores (Figura 11): blanco (BL), café claro (CC), café oscuro marrón (COM), café oscuro negro (CON) y negro (N). Adicionalmente, para una mejor caracterización del vellón se evaluó la pigmentación de piel, ojos, mucosas, pezuñas y presencia de canas y manchas (Anexo 1 y 2).



Figura 11: Cartilla de color de fibra de alpaca INCA TOPS

Como referencia para el presente estudio se tomó nueve muestras de fibra del costillar medio de vicuñas (Figura 11) procedentes del Centro Ecológico Recreacional Taraccasa de la Municipalidad Provincial de Abancay con autorización RDG N° 270-2019-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS y cinco muestras de fibra fueron obtenidas de vellones procedentes del Laboratorio de Fibras Textiles - UNALM. El vellón de la vicuña mostró una tonalidad más intensa en el manto, mientras que en la parte ventral (barriga y pecho) hay mayor presencia de cerdas blancas, esta diferenciación demuestra el patrón de pigmentación en la vicuña (Figura 12).



Figura 12: Muestreo de fibra e identificación del patrón de pigmentación en vicuña

Las muestras de fibra de ambas especies fueron lavadas y acondicionadas antes de su medición con el equipo Chroma Meter CR - 210 (Kónica Minolta), luego se calibró el colorímetro con un patrón estándar siguiendo las especificaciones del manual (Figura 13) y el procedimiento $CIE L^*a^*b^*$ (CIE 2004). La variación del color se determinó según los valores de L^* = luminosidad, a^* = [saturación de color rojo (+) al verde (-)] y b^* = [saturación de color amarillo (+) al azul (-)]. Adicionalmente se calculó la intensidad = $[(a^{*2} + b^{*2})^{0.5}]$ y la tonalidad con la función arco tangente = $[\tan^{-1} (b^*/ a^*)]$ como fue descrito por Druml *et al.* (2018).



Figura 13: Cuantificación del color de fibra con el equipo Chroma Meter CR - 210

3.3 ASOCIACIÓN DE LOS GENES *MC1R* Y *ASIP* CON EL COLOR DE VELLÓN

3.3.1 Obtención de muestras de sangre

Las muestras de sangre (2 - 5 mL) fueron colectadas de los mismos animales mencionados en el muestreo de fibra. Se obtuvo sangre de 87 alpacas Huacaya, mediante punción de la vena yugular y de nueve vicuñas, mediante punción de la vena safena interna. Todas las muestras fueron colectadas en tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA) y trasladadas del lugar de origen hasta el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.3.2 Extracción de ADN

El ADN fue extraído de 200 μ L de sangre entera (método 1) usando un kit comercial Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Catálogo N° D4068 y D4069), primero se agregó 200 μ L de buffer, bio fluido y 20 μ L de proteinasa K, siguiendo las especificaciones y el protocolo indicado (Anexo 3). La extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular - IBBM (UNALM). La concentración (ng/ μ L) y la pureza del ADN (definida por la relación de absorbancia de las longitudes de onda 260/280) (Anexo 4) se cuantificó mediante espectrofotometría usando NanoDrop 8000 (Anexo 5) en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

Las concentraciones eran entre 4.04 y 416.90 ng/ μ L, en cambio la relación de absorbancia 260/280 era uniforme de 1.72 - 2 (Anexo 4) similar a 1.8 - 1.9 ng/ μ L (Green y Sambrook 2012). La integridad se verificó en gel de agarosa al 1 por ciento, en buffer de corrida (TAE 1X) a 100 voltios / 50 minutos teñido con Safe - GreenTM (Figura 14).

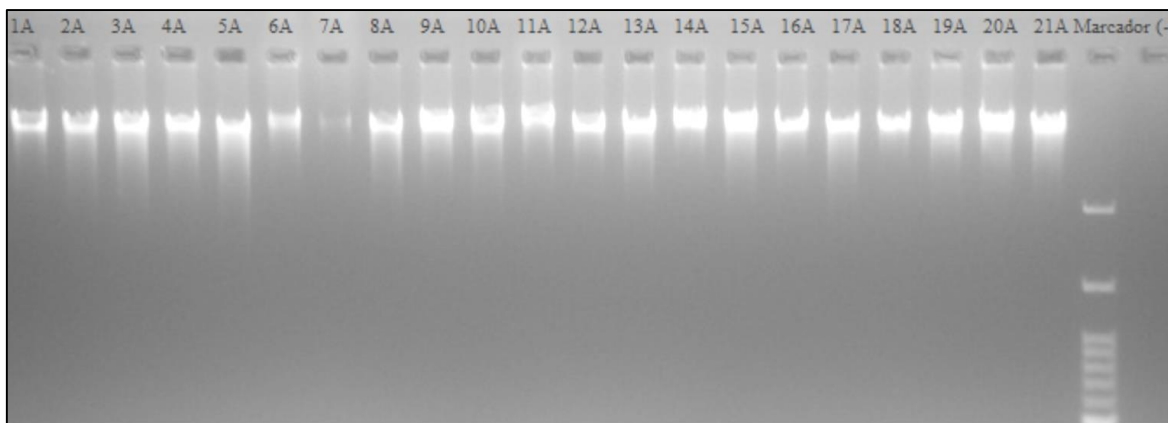


Figura 14: Bandas de ADN, gel de agarosa al 1 por ciento teñidos con Safe - GreenTM. Muestra de ADN de alpaca (1A - 21A), marcador de peso molecular (columna 22) y sin muestra de ADN (columna 23)

Con el método 1, solo en una muestra de vicuña se obtuvo ADN (29.4 ng/ μ L) de buena calidad (260/280 = 1.86), mientras que en las ocho muestras restantes no se obtuvo el ADN. Por esta razón se procedió con la extracción del ADN a partir del bulbo piloso tomado de la base de la cola (método 2) en nueve vicuñas y 12 alpacas con baja concentración de ADN (método 1). En la extracción de ADN (método 2) se usó el mismo kit comercial Quick-DNATM Miniprep Plus Kit. Según la espectrofotometría se obtuvo buena calidad ADN (260/280 entre 1.70 y 1.88) con altas concentraciones entre 30 y 400 ng/ μ L. Sin embargo, dentro de 72 horas el ADN se desintegró en todas las muestras. Los factores que afectaron la rápida desintegración no se revisaron.

El método 3 de extracción de ADN de vicuña se realizó a partir de leucocitos previamente aislados, usando un kit comercial de InvitrogenTM (PureLink Genomic DNA Mini kit) en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica-INIA. La cuantificación del ADN se realizó usando el espectrofotómetro multiplacas Epoch Take 3 BIOTEK. La relación de valores de absorbancia (260/280) fueron entre 1.8 y 2 (Tabla 4), los valores entre 1.6 y 1.8 indican una calidad adecuada de ADN. Por otro lado, se sabe que los valores inferiores a 1.6 indican contaminación durante la extracción, estas muestras de ADN pueden estar degradadas y no son recomendables para la PCR ni para la secuenciación.

Tabla 3: Espectrofotometría: calidad, concentración y cantidad de ADN en vicuña

N° Arete Vicuña	Relación 260/280 (absorbancia)	Concentración de ADN (ng/μL)	Cantidad de ADN (ng)
VV-02	1.88	33.62	6051.6
VV-03	1.85	55.22	9939.6
VV-04	1.82	49.23	8861.4
VV-05	1.88	51.39	9250.2
VV-06	1.86	62.23	11201.4
VV-07	1.85	66.04	11887.2
EV-06	1.81	28.42	5115.6
EV-07	1.82	44.93	8087.4
EV-08	1.92	52.97	9534.6

La integridad del ADN se evaluó mediante la electroforesis en gel de agarosa (1 por ciento p / vol) con 2 μL de muestra de ADN y 6 μL de buffer de carga SALB 2X (GelRed), esta mezcla se cargó en cada pocillo del gel (Figura 15). La corrida electroforética se realizó a 100 voltios en buffer TBE 1X por 30 minutos y las bandas del ADN fueron analizadas bajo luz UV en un sistema de foto documentación ChemiDoc TM MP (BIO-RAD).

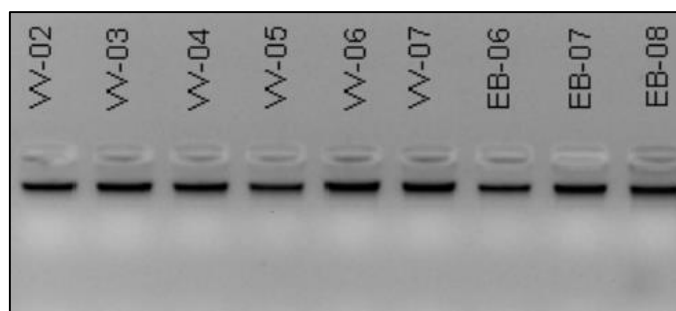


Figura 15: Bandas de ADN con GelRed (vicuña) en gel de agarosa al 1 por ciento

Para uniformizar la concentración del ADN alrededor de 25 ng/μL, se realizó una dilución en un volumen final de 20 μL: $[(25 \text{ ng}/\mu\text{L} * 20 \mu\text{L}) / \text{concentración inicial ng}/\mu\text{L}]$. Las concentraciones de las diluciones también fueron cuantificadas mediante espectrofotometría usando el NanoDrop 8000.

3.3.3 Amplificación (PCR) y electroforesis del gen *MC1R*

La amplificación de la región codificante y de sus regiones flanqueantes del gen *MC1R* se estandarizó en un volumen final de 25 μL con 0.5 μL del cebador directo y 0.5 μL del reverso (Tabla 4). En la PCR se usó un máster mix comercial amaR OnePCR™ (12 .5 μL de) que incluye la enzima Taq polimerasa, buffer, dNTPs, colorantes de carga y de fluorescencia, luego se agregó 6 μL de ADN y 5.5 μL de agua bidestilada hasta completar 25 μL (<https://www.genedirex.com/wp-content/uploads/2020/11/SM213-0250.pdf>).

Tabla 4: Lista de cebadores de los genes *MC1R* y *ASIP*

Genes	Nombre de cebadores	Secuencia del cebador (5' a 3')	Temperatura de alineamiento	Tamaño (pb)
<i>MC1R</i>	MC1R-Forward	GCTGCGAAGTGACCAGACTC		
	MC1R-Reverse	CTCCTCATTGCCAAGTAACTGC	61 °C	1230
<i>ASIP</i>	Exon 4-Forward	GGATATCTGGTCGGGAACCT		
	Exon 4-Reverse	GAAACCCCTCCTCCTGAAAG	60 °C	430
	Exon 2-Forward	TCCCTCCCTTCCTTGTCTTT		
	Exon 2-Reverse	CCACCAGGATTGTTTTGAGG	53°C	470

Fuente: Adaptado de Daverio *et al.* (2016)

El perfil de ciclado para el gen *MC1R* consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 61°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos usando un termociclador Mastercycler® nexus gradient de marca Eppendorf (https://www.eppendorf.com/product-media/doc/es/161574_Operating-Manual/Eppendorf_PCR_Operating-manual_Mastercycler-nexus-family.pdf).

La amplificación de los 96 productos de PCR fueron verificados en gel de agarosa al 1 por ciento, se usó 4 µL de producto de PCR, 1 µL de Safe - Green™ y 1 µL de marcador de peso molecular 100 pb DNA H3 RTU (Ready-to-Use) (<https://www.genedirex.com/wp-content/uploads/2020/11/DM003-R500.pdf>). Se usó el buffer de corrida TAE 1X (0.04 M Tris Base, 57.1 mL Acético glacial, 0.5M EDTA), las bandas fueron observadas mediante luz azul en el Laboratorio de Genética Molecular-IBBM de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.3.4 Amplificación (PCR) y electroforesis del gen *ASIP*

La PCR del exón 2 del gen *ASIP* se desarrolló en el Laboratorio de Genética Molecular-IMBICE, el ciclado incluyó tres minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 53°C, 1 minuto de extensión a 72°C y 5 minutos de extensión final a 72°C siguiendo el procedimiento descrito por Daverio *et al.* (2016). Las bandas amplificadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento teñidos con GelRed™.

La PCR del exón 4 del gen *ASIP* se estandarizó en un volumen final de 50 μ L (Anexo 12), con 25 μ L de máster mix comercial 2x PCR BIO Taq Mix Red: Taq polimerasa, $MgCl_2$ (6mM), dNTPs (2mM) y el colorante rosado (Anexo 7) y con buffer de carga (<https://pcrbio.com/app/uploads/PB10.13-PCRBIO-Taq-Mix-Red-Manual.pdf>), a máster mix se agregó 16 μ L de agua bidestilada, 2 μ L de cada cebador y 5 μ L de ADN.

El perfil de ciclado incluyó la desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C por 15 segundos, extensión a 72°C por 20 segundos y una extensión final a 72°C por 1 minuto, finalizando con 10°C en termociclador Mastercycler® nexus gradient marca Eppendorf (Anexo 6). En una solución de TAE 1X con agarosa al 1 por ciento (60 mL) se agregó 6 μ L de colorante Hi SYBr Safe Gel Stain (<https://himedialabs.com/TD/ML053.pdf>) y se preparó el gel con colorante. En electroforesis se corrió 2 μ L de muestra, el tamaño del fragmento amplificado se verificó usando el marcador de peso molecular (Figura 16).

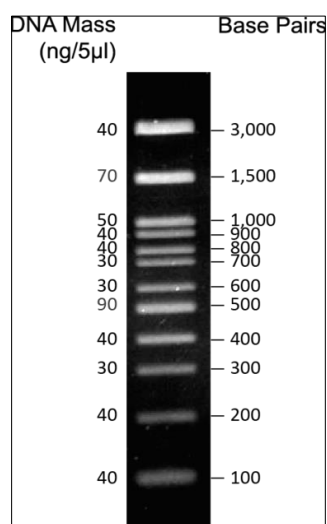


Figura 16: Marcador de peso molecular 100 bp DNA H3 RTU (Ready-To-Use)

3.3.5 Purificación y secuenciación de amplificados de los genes *MC1R* y *ASIP*

La purificación y secuenciación de los productos amplificados fueron desarrollados por la empresa MacroGen Inc (República de Corea, Seúl). Los amplicones de ambos genes *MC1R* y *ASIP* fueron purificados usando una enzima comercial ExoASP-IT® (usb) según el protocolo referido por la empresa MacroGen Inc (www.biocat.com/bc/pdf/32-030v2_Flyer_EnzSAP_PCR_Clean-up_Reagent.pdf). Las muestras purificadas fueron secuenciadas mediante el método de Sanger en dirección forward y reverse empleando los mismos cebadores de *MC1R* y *ASIP* usados en la PCR.

3.3.6 Identificación de polimorfismos y haplotipos en el gen *MC1R*

La calidad de las secuencias se inspeccionó según el porcentaje de alta calidad (HQ) en el archivo.ab1. La calidad de los electroferogramas se verificó usando el Software Geneious (Anexo 8). El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó usando el programa ClustalW (Thompson *et al.* 1994), para este estudio se tomó como referencia y control, la secuencia obtenida de las nueve vicuñas. Además, se consideró dos secuencias de alpaca negra y marrón disponibles en GenBank con número de acceso FJ502229 y FJ502230, respectivamente.

Los polimorfismos de un solo nucleótido y la delección fueron identificados mediante el alineamiento múltiple de las secuencias usando el software Geneious (Versión 11.1.5). Se infirieron haplotipos a partir de los datos genotípicos que se obtuvieron por secuenciación. El número de los mismos se determinó con el programa Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier y Lischer 2010). La fase gamética > 0.9 fue determinada utilizando el mismo software mediante el algoritmo Bayesiano ELB. Para armar los haplotipos se consideraron los polimorfismos no sinónimos encontrados en el gen *MC1R*. Para definir los alelos se tuvieron en cuenta aquellos haplotipos más frecuente en la alpaca y su asociación con cada grupo de color.

3.3.7 Identificación de polimorfismos y haplotipos en el gen *ASIP*

Los exones 2 y 4 del gen *ASIP* fueron secuenciados, excepto el exón 3 porque en este exón no se han reportado mutaciones en otras poblaciones de alpaca. El tamaño de los exones 2, 3 y 4 fueron caracterizados considerando las secuencias disponibles en GenBank (Feeley *et al.* 2011; Chandramohan *et al.* 2015; Daverio *et al.* 2016; Marín *et al.* 2018). Estas secuencias fueron comparadas mediante el BLAST y BLASTN (Multiple Sequence Alignment Viewer 1.11.1) según el parámetro de similitud > 99 por ciento.

Para el alineamiento de exón 4 del gen *ASIP* se consideró las secuencias de referencia de las vicuñas de este estudio y tres secuencias de alpacas que incluían los polimorfismos HM768323, HM768324 (incluye la delección de 57 pb) y HQ008273 (Feeley *et al.* 2011). Los polimorfismos del gen *ASIP* en alpacas fueron identificados mediante el alineamiento múltiple de las secuencias del exón 4 usando el Software Geneious (Versión 11.1.5).

Los haplotipos del gen *ASIP* fueron inferidos de la misma manera que en el gen *MC1R*, en este caso considerando dos SNPs no sinónimos y la delección (Excoffier y Lischer 2010) usando el software Arlequín (Versión 3.5.2.2). La denominación de los alelos fue asignada siguiendo la nomenclatura propuesta por Feeley *et al.* (2011).

3.3.8 Asociación de los genes *MC1R* y *ASIP* con el color del vellón

Los parámetros de luminosidad, intensidad y tonalidad fueron evaluados mediante la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$), para clasificar cuantitativamente el color de fibra en el vellón de alpacas.

Una vez definida objetivamente el color y analizada las secuencias, se evaluaron las asociaciones entre el color de vellón y los polimorfismos no sinónimos y haplotipos de los genes *MC1R* y *ASIP*. El análisis estadístico se realizó mediante la Prueba exacta de Fisher usando el software R (R Core Development Team 2021).

3.3.9 Análisis de estructura y función de la proteína de los genes *MC1R* y *ASIP*

A partir de la secuencia codificante de ambos genes se predijo la secuencia de aminoácidos usando la herramienta bioinformática (translation) en el Software Geneious. Para graficar la estructura de la proteína en 2D (Omasits *et al.* 2014) se utilizó el software PROTTER v1.0 (<http://wlab.ethz.ch/protter/#>). La probabilidad del daño potencial (Pdel) de la proteína MC1R funcional se determinó usando el programa PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships). Este análisis se realizó según lo descrito por Tang *et al.* (2016) en PANTHER-PSEP (position-specific evolutionary preservation).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CUANTIFICACIÓN DEL COLOR DE FIBRA POR COLORIMETRÍA

De acuerdo al análisis cuantitativo de la fibra por colorimetría (Chroma Meter) los parámetros de intensidad y luminosidad sugieren una reasignación de los colores en alpacas: negro/marrón-negro (1), marrón oscuro (2), marrón claro (3) y blanco (4). También se evaluó el color de la fibra de vicuña, determinándose como otro color (5) diferente al de la alpaca (Tabla 5). En cambio, la tonalidad de la fibra de vicuña resultó similar a las tonalidades de alpaca marrón claro, marrón oscuro y marrón-negro.

El color del vellón de la vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*) fue homogéneo en el manto, su tonalidad disminuye en sentido dorso-ventral, quedando sin pigmentación la barriga, pecho y cara interna de las extremidades (patrón de pigmentación). Por otra parte, se ha informado que la tonalidad del vellón incrementa con la edad (Quispe *et al.* 2019). En vicuñas australes (*Vicugna vicugna vicugna*) con tonalidad clara en su vellón Marín *et al.* (2018) relacionaron con un polimorfismo no sinónimo c.265A>G y con los polimorfismos sinónimos c.72C>G y c.618G>A.

Tabla 5: Promedio \pm DE de parámetros colorimétricos en fibra de vicuña y alpaca

Especie	Color del vellón ¹	n	Intensidad	Tonalidad	Luminosidad
Vicuña	Vicuña (VV)	14	24.33 \pm 1.39 ^a	1.17 \pm 0.03 ^a	47.74 \pm 03.65 ^b
Alpaca	Blanco (BL)	100	08.67 \pm 1.95 ^d	-0.54 \pm 1.40 ^c	84.52 \pm 10.52 ^a
Alpaca	Marrón claro (MC)	24	16.60 \pm 1.94 ^b	0.97 \pm 0.06 ^a	30.85 \pm 03.78 ^c
Alpaca	Marrón oscuro (MO)	19	11.41 \pm 4.42 ^c	0.74 \pm 0.54 ^a	27.37 \pm 14.47 ^d
Alpaca	Marrón-negro (MN)	11	02.32 \pm 1.55 ^e	0.38 \pm 0.28 ^a	18.68 \pm 01.82 ^e
Alpaca	Negro (N)	27	01.08 \pm 0.35 ^e	-0.05 \pm 0.49 ^b	19.02 \pm 05.10 ^e

¹ Colores asignados en alpacas, n: número de animales muestreados. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$)

La luminosidad de la fibra blanca fue la más alta (84.52) similar a 87.10 reportado por Cruz *et al.* (2021) y superior a 73.58 reportado por Guridi *et al.* (2011). Se observó mayor luminosidad (47.74) e intensidad (24.33) en la fibra de vicuña respecto a las alpacas

marrones. Los valores promedio de luminosidad e intensidad fueron superiores en alpaca marrón claro respecto al marrón oscuro. Por otro lado, Guridi *et al.* (2011) reportaron una luminosidad de 36.25 en alpacas marrones, siendo superior a nuestro hallazgo en alpaca marrón claro y marrón oscuro. La luminosidad define el grado de blancura en las tonalidades claras. En alpaca negra y marrón-negra por la presencia de eumelanina se observa muy baja luminosidad de 18.62 y 19.02, respectivamente similar a 17.23 ± 1.93 reportado por Guridi *et al.* (2011) en alpaca negra.

Por otro lado, existe información disponible sobre la variación cuantitativa de eumelaninas y feomelaninas en alpacas y llamas de color evaluadas mediante métodos bioquímicos y la morfología de los melanosomas y analizadas con microscopio electrónico (Cecchi *et al.* 2007; Cecchi *et al.* 2011). En este trabajo no se cuantificaron los niveles ni los tipos de melanina, sin embargo, los valores obtenidos de CIE L*a*b*, principalmente la L: luminosidad muestra una relación negativa con la cantidad de melaninas álcali-solubles (MAS) y eumelaninas (EM) reportado por Cecchi *et al.* (2011). La luminosidad de 84.52 (blanco) disminuye a 30.85 (marrón claro) y 19.02 (negro), inversamente la cantidad de eumelanina aumenta en la fibra negro respecto al marrón (Cechi *et al.* 2007; Fan *et al.* 2010; Cecchi *et al.* 2011).

En alpacas y llamas se ha indicado que la eumelanina es responsable de la pigmentación negro/gris y la feomelanina del rojo/amarillento (Sponenberg *et al.* 1988; Jones *et al.* 2019). Aunque Sponenberg *et al.* (1988) y Cecchi *et al.* (2007) señalan la posible ausencia de la pigmentación eumelánica en llamas marrones, Cecchi *et al.* (2011) y Cransberg *et al.* (2013) en alpacas marrones. En los rebaños es complicado diferenciar entre las tonalidades del marrón, el uso de cartillas ayuda la asignación del marrón claro, intermedio y marrón oscuro, donde podría haber tonalidades entre el marrón y negro (Australian Alpaca Association 2012).

Lupton *et al.* (2006) sugieren el método de medición por colorimetría para definir colores uniformes en alpacas, sin embargo, este método es indirecto y limita la asociación con el genotipo. Por tanto, en la asignación y registro del color en alpacas se debe integrar los nuevos métodos de evaluación química (eumelanina versus feomelanina) y la relación triangular entre el color químico, color visual y su genotipo (Wakamatsu e Ito 2021).

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL GEN *MC1R*

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de la región codificante y de sus regiones flanqueantes del gen *MC1R* resultó de 1230 pb ligeramente menor a 1500 pb del marcador de peso molecular (Figura 17). Tanto en alpacas como en vicuñas se observaron bandas amplificadas de buena calidad mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento.

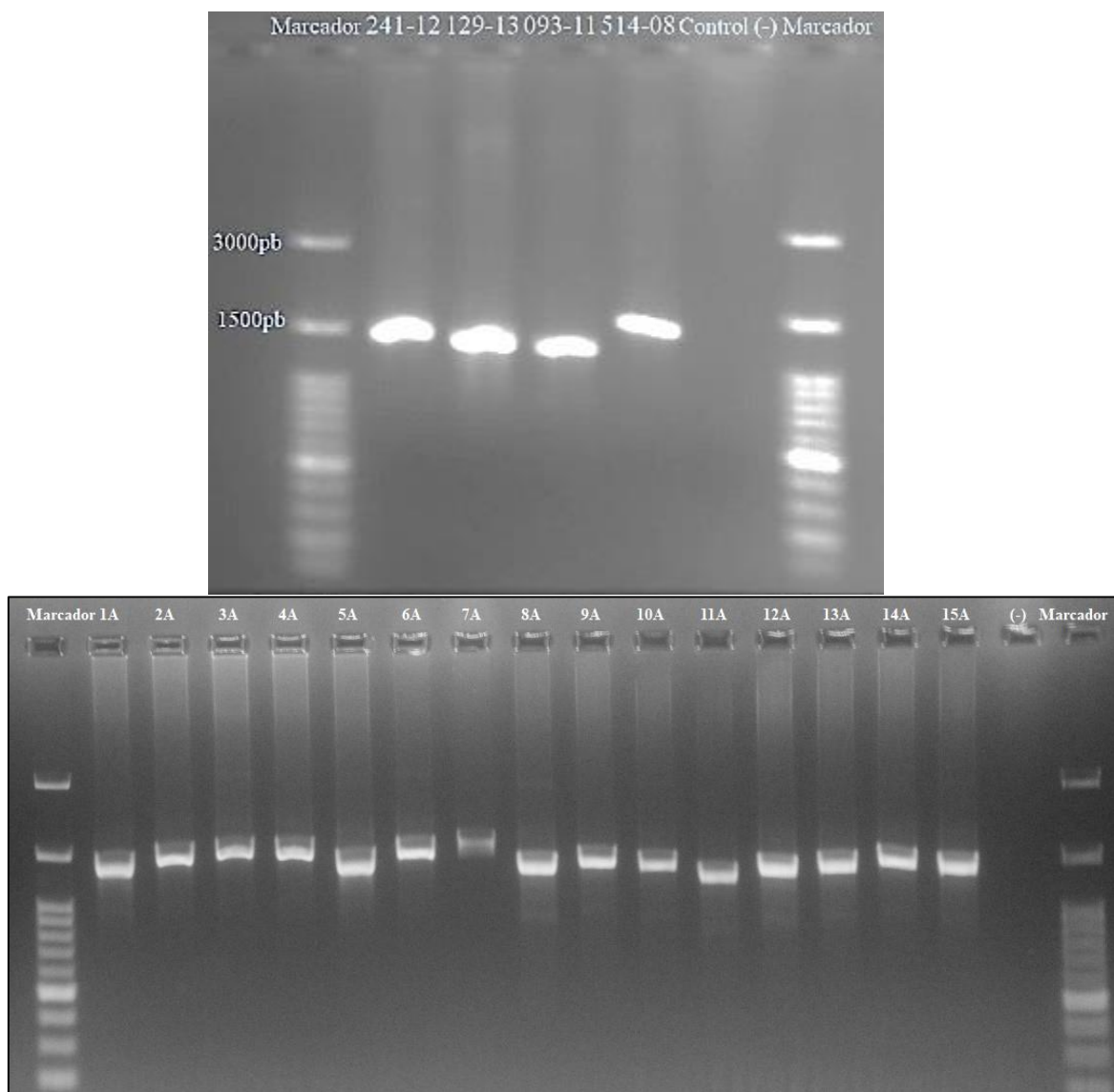


Figura 17: Amplificados del gen *MC1R* en electroforesis (1A - 15A y control [-])

En 96 animales, nueve vicuñas y 87 alpacas de color se caracterizó el gen *MC1R*, constituido por un único exón de 954 pb, flanqueada por las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), en este caso el exón único es la secuencia codificante en inglés

denominado *Coding Sequence* (CDS) que codifica una proteína de 317 aminoácidos. Tres secuencias codificantes representativas del gen *MC1R* fueron depositadas en la base de datos de GenBank (Anexo 11, 12 y 13) a) vicuña: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587025>, b) alpaca marrón claro <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587026> y c) alpaca negra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587027>.

Las secuencias codificantes y las regiones flanqueantes del gen *MC1R* en vicuñas fueron únicas e idénticas entre sí con 100 por ciento de similitud, sin la presencia de los polimorfismos de nucleótido único ni la delección, por tanto, se consideró como la secuencia de referencia. En cambio, en las secuencias codificantes y regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) del gen *MC1R* en alpacas se identificó 12 mutaciones, que incluye 11 polimorfismos de nucleótido único y una delección c.224_227del.

De acuerdo a la distribución en el gen, se localizaron 10 mutaciones (nueve polimorfismos y una delección) en la región codificante y dos -42C>G y c.*5T>C en 5'UTR y 3'UTR, respectivamente. En la región codificante del gen *MC1R* en alpaca de color, seis mutaciones resultaron no sinónimas produciendo un cambio en el aminoácido codificado c.82G>A, c.259G>A, c.376G>A, c.587T>C, c.901C>T (p.A28T, p.V87M, p.G126S, p.F196S, p.R301C), c.224_227del (ORF) y cuatro mutaciones fueron sinónimas c.126C>T, c.354C>T, c.618G>A, c.933A>G.

En otras poblaciones de alpacas se reportaron otros polimorfismos no sinónimos adicionales a nuestros hallazgos en el gen *MC1R*, c.383C>T (Powell *et al.* 2008), c.865C>T, c.874G>A y c.886T>C (Guridi *et al.* 2011), c.92C>T (Chandramohan *et al.* 2015), c.265A>G (Marín *et al.* 2018), también se reportaron dos polimorfismos no sinónimos nuevos c.205G>A y c.638G>A en llamas (Daverio *et al.* 2016).

4.3 POLIMORFISMOS Y HAPLOTIPOS DEL GEN *MC1R* ASOCIADAS AL COLOR DEL VELLÓN

En este estudio la delección c.224_227del se confirmó por alineamiento de secuencias (electroferograma) en dirección forward y reverse, observándose en 20 de 87 alpacas, según el color en 26.32 por ciento de negros, 19.51 por ciento de marrones y 25 por ciento de blancos (Tabla 6). De 87 alpacas ningún animal presentó la delección en homocigosis.

Tabla 6: Polimorfismos en el gen *MC1R*, secuencia codificante y regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) en vicuña y alpaca

c.-2C>G 5'UTR	c.82G>A p.A28T	c.126C>T p.D42D	c.224_227del ORF	c.259G>A p.V87M	c.354C>T p.N118N	c.376G>A p.S126G	c.587T>C p.F196S	618G>A p.L206L	c.901C>T p.R301C	c.933A>G p.E311E	c.*5T>C 3'UTR	Color de animales
G/G	G/G	C/C	--	G/G	C/C	G/G	T/T	A/A	C/C	A/A	C/C	9 VV, 4 BL
G/G	G/G	C/C	--	G/G	C/C	G/G	T/T	A/A	T/T	A/A	C/C	1 BL
G/G	G/G	C/C	--	G/G	C/T	G/G	T/T	A/A	C/C	A/A	C/C	1 BL
G/G	A/G	C/T	D4-	G/G	C/T	G/G	T/T	G/A	C/C	A/A	C/C	1 BL
G/G	A/G	C/T	D4-	G/G	C/T	G/G	T/T	G/A	C/T	A/G	T/C	1 BL
G/G	G/G	C/C	--	G/G	C/C	G/G	T/T	A/A	C/T	A/A	C/C	2 MC
G/G	G/G	C/C	--	G/G	C/T	G/G	T/C	A/A	C/C	A/A	C/C	1 MC
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/T	A/G	T/C	2 MC
C/C	A/A	T/T	D4-	G/A	T/T	G/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	5 MC
C/C	A/A	T/T	--	A/A	T/T	A/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	3 MC
C/G	A/G	C/T	--	G/A	T/T	G/A	T/C	G/A	C/C	A/G	T/C	7 MC
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/C	A/G	T/C	1 MC
C/C	A/A	T/T	--	G/A	T/T	G/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	1 MC
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/T	A/G	T/C	5 MO
C/G	A/G	C/T	--	G/G	C/T	G/G	T/T	G/A	C/T	A/G	T/C	2 MO
C/C	A/A	T/T	--	A/A	T/T	A/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	7 MO
C/G	A/G	C/T	--	G/G	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	1 MO
C/C	A/A	T/T	D4-	G/A	T/T	G/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	3 MO
C/C	A/A	T/T	--	G/A	T/T	G/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	1 MO
C/G	A/G	C/T	--	A/A	C/T	G/A	T/T	G/G	C/T	A/G	T/C	1 MN
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/C	A/G	T/C	1 MN
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	A/A	T/T	G/A	C/T	G/G	T/C	1 MN
C/G	A/G	C/T	--	G/A	T/T	G/A	T/C	G/A	C/C	A/G	T/C	1 MN
C/C	A/A	T/T	--	G/A	T/T	G/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	1 MN
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/T	A/G	T/C	4 MN
C/G	A/G	C/T	--	G/A	T/T	G/A	T/C	G/A	C/C	A/G	T/C	1 MN
C/C	A/A	T/T	--	A/A	T/T	A/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	1 MN, 9 N
C/C	A/A	T/T	D4-	A/A	T/T	A/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	1 N
C/C	A/A	T/T	D4-	G/A	T/T	G/A	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	9 N
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/T	A/G	T/C	6 N
C/G	A/G	C/T	--	G/A	C/T	G/A	T/T	G/A	C/C	A/G	T/C	2 N

Chandramohan *et al.* (2015) reportaron la delección c.224_227del sin especificar su frecuencia en alpacas negras, marrones y blancas. Powell *et al.* (2008) reportaron en 14 de 79 alpacas, el negro (n = 3) y marrón-negro (n = 3) no presentaron la delección, mientras que en los marrones si observaron en 1 de 5 alpacas marrón oscuro, en 2 de 11 alpacas marrón intermedio, 1 de 9 alpacas marrón claro, asimismo en 5 de 16 alpacas color crema oscuro, en 2 de 9 light fawn (LF) y en 3 de 7 alpacas color blanco, estos autores en ningún animal reportaron la delección en homocigosis.

Por otro lado, esta delección no fue reportada en alpacas y llamas de otras poblaciones (Feeley y Munyard 2009; Guridi *et al.* 2011; Daverio *et al.* 2016; Marín *et al.* 2018), su ausencia probablemente se debe a la presión de selección que fueron sometidos estas poblaciones. Los cinco polimorfismos no sinónimos identificados en el gen *MC1R* c.82G>A, c.259G>A, c.376G>A, c.587T>C, c.901C>T serían los responsables de la variabilidad alélica expresada en los colores básicos y sus respectivas tonalidades en alpaca. Estos resultados son concordantes con los reportes de Powell *et al.* (2008), Feeley y Munyard (2009), Guridi *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2015), Daverio *et al.* (2016) y Marín *et al.* (2018).

Los cuatro polimorfismos sinónimos o mutaciones silenciosas c.126C>T, c.354C>T, c.618G>A, c.933A>G identificados fueron concordantes al reporte de Powell *et al.* (2008), Feeley y Munyard (2009), Guridi *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2015), Daverio *et al.* (2016) y Marín *et al.* (2018). En 1 de 19 alpacas marrón oscuro se observó un polimorfismo sinónimo c.72C>G y otro no sinónimo c.265A>G (p.M89V) coincidentes con lo observado por Marín *et al.* (2018) en dos alpacas y las vicuñas australes (*Vicugna vicugna vicugna*).

El polimorfismo c.82G>A con genotipo A/A mostró una asociación con el color eumelánico (negro y marrón-negro), el genotipo G/G con el color marrón claro, blanco y vicuña (Prueba exacta de Fisher $p < 0.02$). En 8 de 22 alpacas de color marrón claro y en 2 de 11 marrón-negros se presentó el polimorfismo el no sinónimo c.587T>C con sustitución de aminoácidos (p.F196S). El genotipo T/C mostró asociación con el marrón claro (Prueba exacta de Fisher $p < 0.01$), en cambio el resto de alpacas de color y las vicuñas mostraron el genotipo T/T (sin mutación), ningún animal mostró la variante homocigota C/C. Este polimorfismo fue también reportado por Powell *et al.* (2008) en alpacas de Estados Unidos y por Daverio *et al.* (2016) en llamas de Argentina.

Aparte del polimorfismo c.82G>A y c.587T>C ningún otro polimorfismo fue asociado con el color de vellón en alpacas, probablemente debido a la mayor frecuencia de genotipos heterocigotos en los polimorfismos c.259G>A, c.376G>A c.901C>T. Este inconveniente en la asociación del color con los polimorfismos, alelos y genotipos del *MC1R* fue descrito en los trabajos de Powell *et al.* (2008), Feeley y Munyard (2009), Guridi *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2015), razón por la cual en este estudio se agruparon los polimorfismos no sinónimos en haplotipos, para su asociación con el color del vellón en alpacas.

En el polimorfismo c.901C>T se observó alta frecuencia del genotipo C/C, menor frecuencia del C/T y muy baja frecuencia del T/T (1 alpaca blanca) similar al reporte de Guridi *et al.* (2011). Por otro lado, se reportaron los genotipos T/T y C/T en alpacas de color blanco de Estados Unidos (Powell *et al.* 2008), Australia (Feeley y Munyard 2009) y Perú (Chandramohan *et al.* 2015) y en camellos dromedario blanco (Almathen *et al.* 2018 y Alshanbari *et al.* 2019).

En base a los cinco polimorfismos no sinónimos c.82G>A, c.259G>A, c.376G>A, c.587T>C, c.901C>T se infirieron ocho haplotipos (H1 - H8) con su respectiva frecuencia en alpacas de color y en vicuñas. El H1: AAATC fue el más frecuente en alpacas negra/marrón negra y ausente en blancas (Tabla 7, Figura 19).

Tabla 7: Haplotipos constituidos por sustituciones no sinónimas en el gen *MC1R*

Haplotipos definidos por 5 SNPs *	Frecuencia de fase	Número de animales por color de fibra				
		N/MN	MO	MC	BL	VV
[H1] AAATC	94	38(11;27)	16(7;9)	19(3;16)	00	00
[H2] AGGTC	24	10	06	06	02	00
[H3] GGGTT	24	10	07	04	2(1;1)	00
[H4] GGGTC	37	03	01	04	6(5;1)	09
[H5] GAGTT	01	01	00	00	00	00
[H6] GGGCC	10	02	00	08	00	00
[H7] GGATT	01	01	00	00	00	00
[H8] AGGTT	01	00	01	00	00	00

* Haplotipos constituidos por 5 polimorfismos con sustitución de aminoácidos c.82G>A (p.A28T), c.259G>A (p.V87M), c.376G>A (p.S126G), c.587T>C (p.F196S), c.901C>T (p.R301C). n(a;b), n: número de animales en a: homocigosis, b: heterocigosis, color, negro/marrón negro (N/MN), marrón oscuro (MO), marrón claro (MC), blanco (BL), vicuña (VV)

Los haplotipos H2: AGGTC y H3: GGGTT en las alpacas de color negro y marrón y sus respectivas tonalidades se presentaron en heterocigosis con una importante frecuencia, el H3 en homocigosis (H3/H3) solo se presentó en una alpaca blanca. La combinación de H1 con H2 y H3 determina los genotipos heterocigotos H1/H2 y H1/H3 presentes con mayor frecuencia en las alpacas negras y marrones (Tabla 8, Figura 18). Los haplotipos H1, H2 y H3 no fueron observados en vicuñas.

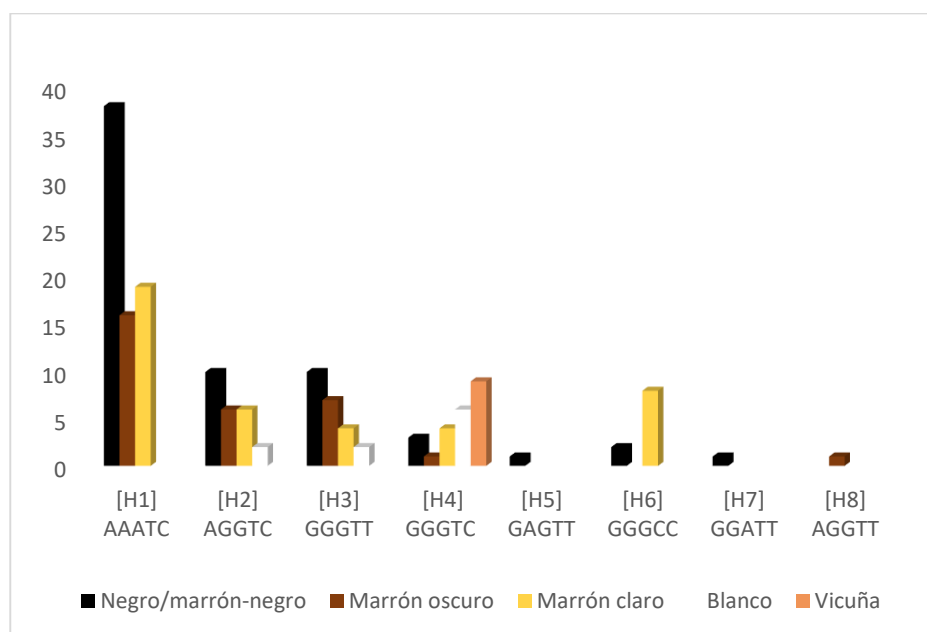


Figura 18. Frecuencias absolutas de haplotipos del gen *MC1R* en alpaca de color y vicuña. Haplotipos: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 y H8

A partir de los haplotipos H1, H4, H6 se definieron tres alelos E, E⁺, e, respectivamente para el gen *MC1R*. El haplotipo 1: AAATC se observó en homocigosis y/o heterocigosis en 100 por ciento de negros (negro y marrón-negro), 84 por ciento de marrón oscuro, 86 por ciento marrón claro, por el contrario, este haplotipo no fue observado en alpaca blanca y vicuña; razón por la cual se lo propone como el alelo dominante (E).

En alpacas negras se observó alta frecuencia (0.63) de heterocigosis (H1/-) y la homocigosis (H1/H1) con una frecuencia intermedia de 0.37. El H1 mostró asociación con el color negro y marrón oscuro (Prueba exacta de Fisher $p < 0.001$). En presencia del alelo E, siempre se producirá la pigmentación de la fibra y pie en las alpaca negra y marrón y sus tonalidades. El haplotipo 4: GGGTC se presentó en homocigosis (E⁺E⁺) en el 100 por ciento de las vicuñas, 62.5 por ciento de alpacas blancas y 18.18 por ciento de alpacas marrón claros, por ello se propone como el alelo silvestre (E⁺).

Se observó una asociación entre el H4 y el color marrón claro, blanco (alpaca) y el color de vicuña (Prueba exacta de Fisher $p < 0.001$). Sin embargo, este alelo en combinación con el alelo dominante (E) se presenta en muy baja frecuencia en animales negros y marrones (Tabla 8). El haplotipo 6: GGGCC definido por el polimorfismo c.587T>C (p.F196S) en heterocigosis (alelo recesivo e) se observó en 8 de 22 alpacas marrón claro y en 2 de 11 alpacas marrón-negro, este alelo no se observó en los demás colores ni en vicuñas. El H6 fue asociado con el marrón claro (Prueba exacta de Fisher $p < 0.01$). Powell *et al.* (2008) y Marín *al.* (2018) reportaron este haplotipo con muy baja frecuencia en alpacas feomelánicas.

De los haplotipos descritos en este estudio se puede deducir cuatro posibles genotipos en la alpaca negra: H1/H1, H1/H2, H1/H3, H1/H4 y seis genotipos en la alpaca marrón claro: H1/H1, H1/H2, H1/H3, H1/H4, H1/H6; en ambos colores se observaron una mayor presencia del genotipo heterocigoto (E/-). Dentro del color marrón oscuro mostró el genotipo homocigoto EE en 36.84 por ciento y el resto mantiene el genotipo heterocigoto (E/-). El color marrón claro mostró mayor variabilidad alélica en el gen MC1R, donde el 18.18 por ciento mostraron el genotipo silvestre (E⁺E⁺), el H1 junto con el H6 definen el genotipo heterocigoto AAATC/GGGCC (E/e) en el 36.36 por ciento, el 13.64 por ciento mostraron el genotipo dominante EE y el resto mantiene el genotipo heterocigoto (E/-).

El genotipo AAATC/AAATC (EE) fue asociado con el negro, AAATC/GGGCC (Ee) con el marrón claro y GGGTC/GGGTC (E⁺E⁺) con la vicuña (Prueba exacta de Fisher $p < 0.001$). El genotipo AAATC/AAATC del negro fue similar a AAAC/AAAC descrito en el estudio de Chandramohan *et al.* (2015) y en otro estudio de Feeley y Munyard (2009) el haplotipo c.82G>A y c.901C>T y su genotipo AC/AC fue asociado con alpacas eumelánicas (negro y marrón-negro), mientras que el genotipo GT/GT o GT/GY fue asociado con alpacas feomelánicas (blancas y algunas light fawn).

4.4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA MC1R

En la secuencia codificante del gen *MC1R* de alpaca, la delección c.224_227del (ACTT) resulta en el corrimiento del marco de lectura (frameshift). Esto provoca la aparición de una proteína truncada de 84 aminoácidos con probable pérdida de función. La proteína MC1R graficada en 2D se muestra en la Figura 19 con la secuencia completa de aminoácidos (317 aa) y truncada (84 aa), respectivamente.

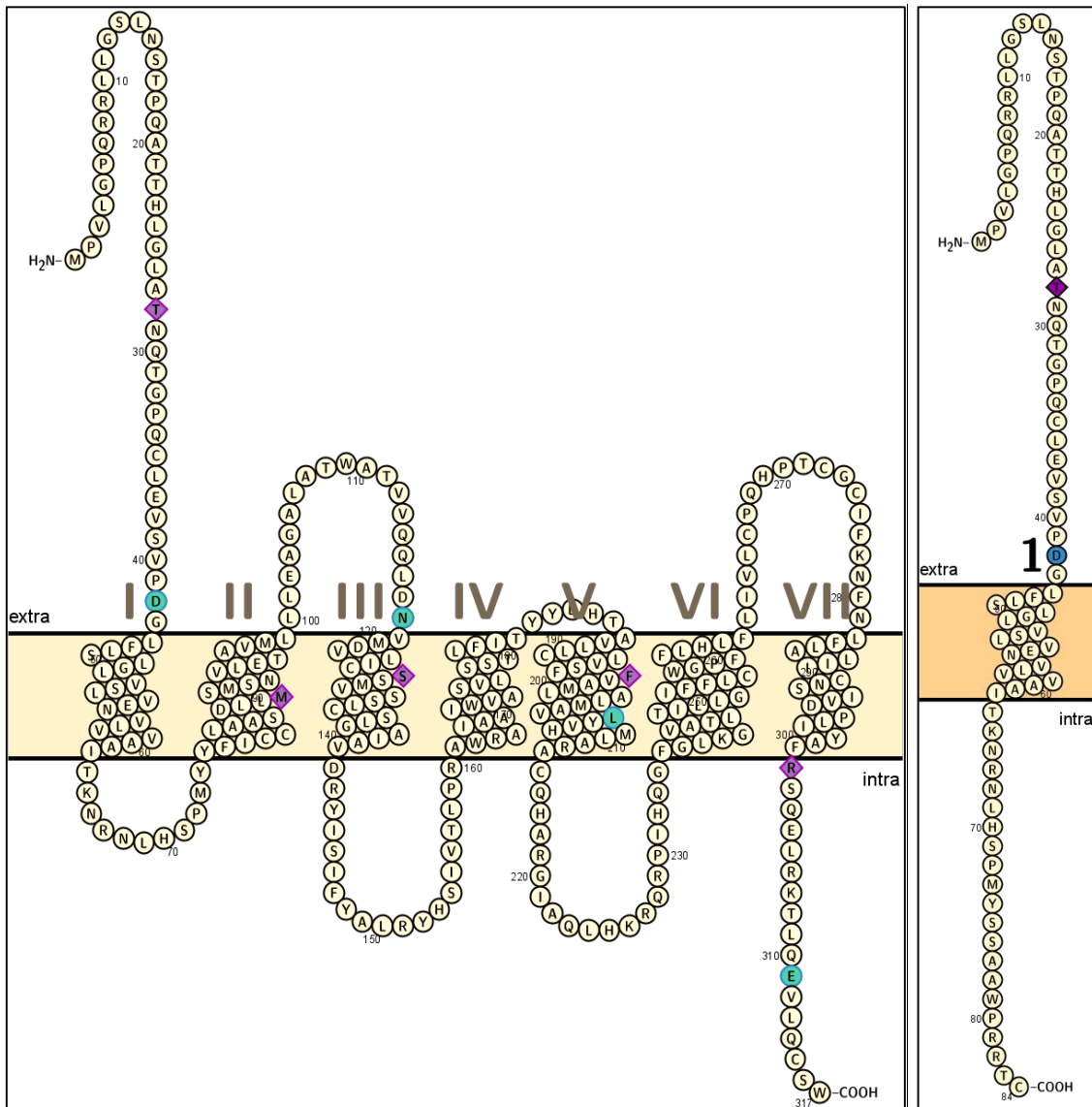


Figura 19: Comparación de estructura completa y truncada de proteína MC1R en alpacas. Se muestra la proteína completa (izquierda) y truncada (derecha) con las sustituciones de aminoácidos (♦) y sin sustituciones (●), dominios transmembrana I-VII, amino terminal (H₂N) y carboxilo terminal (-COOH)

Las cinco sustituciones de aminoácidos fueron localizadas: una en el extremo amino extracelular (p.A28T), 3 en los dominios transmembrana TM2 (p.V87M), TM3 (p.G126S), TM5 (p.F196S) y una en el extremo carboxilo intracelular (p.R301C). Por el contrario, la delección c.224_227del se localizó transversalmente en el primer dominios transmembrana (TM1). La p.A28T fue localizada cerca al dominio N₂H y junto al sitio potencial de N-glicosilación de p.29N (García-Borrón *et al.* 2005; Chandramohan *et al.* 2015).

Las otras cuatro sustituciones localizadas en las regiones transmembranas, probablemente tienen un alto impacto sobre la expresión del color ya que interactúan directamente con la membrana del melanocito. En los polimorfismos no sinónimos se determinaron las probabilidades del daño potencial en la función de la proteína MC1R (Pdel), las sustituciones p.F196S y p.R301C mostraron mayor probabilidad de producir un efecto nocivo en la función de la proteína (Pdel = 0.74), la probabilidad de p.V87M fue moderada (Pdel = 0.57), mientras que las sustituciones p.A28T y p.S126G mostraron baja probabilidad de provocar daño en la función de la proteína (Pdel = 0.19). Al considerar estas últimas sustituciones con baja probabilidad de alterar la función en la proteína, entonces los haplotipos 7 y 8 serían considerados como equivalentes al haplotipo 3.

La secuencia de aminoácidos con cinco sustituciones y un frameshift en alpacas resultaron más variable a seis sustituciones en la secuencia de aminoácidos descritas por Chandramohan *et al.* (2015) en alpacas de Quimsachata (Puno, Perú), pero menos variable comparados con las 10 sustituciones en la secuencia de aminoácidos descritas en llamas de Argentina (Daverio *et al.* 2016), lo que podría indicar que la llama expresa las diferentes tonalidades y los patrones pigmentarios (Frank *et al.* 2006; Anello *et al.* 2022b), esta situación probablemente es favorecida por la menor presión de selección. La menor variabilidad genética observada en la población de Quimsachata, (Chandramohan *et al.* 2015) se puede deber a presión selectiva por la producción de fibra, mientras que la llama fue orientada para la producción de carne y muy poco para fibra.

4.5 CARACTERIZACIÓN DEL GEN ASIP

El tamaño de los exones codificantes 2 y 4 fueron caracterizados mediante secuenciación. Basado en la estructura del gen *ASIP* con los tres exones funcionales (GeneScaffold_575:110917-114835): exón 2 (160 pb), exón 3 (65 pb) y exón 4 (177 pb o 120 pb) se caracterizó la secuencia codificante del gen *ASIP* con un tamaño de 402 pb que se traduce en 133 aminoácidos, en cambio, cuando se presenta la delección de 57 pb la secuencia codificante resulta de 345 pb y se traduce en 114 aminoácidos.

En el exón 2 del gen *ASIP* se identificó un polimorfismo sinónimo (c.102G>A) que codifica una glicina (p.G34G) en 12 alpacas negras y cinco marrones (Tabla 8), en otros estudios Feeley *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2013), Daverio *et al.* (2016) y Marín *et al.* (2018) reportaron este polimorfismo.

El exón 3 resulta invariable según el reporte de las secuencias disponibles en GenBank. En el exón 4 del gen *ASIP* se identificó un polimorfismo sinónimo (c.291C>A), dos polimorfismos no sinónimos (c.292C>T y c.353G>A) y una deleción (c.325_381del) de 57 pb, en la Figura 20 se muestra el tamaño proporcional de los exones codificantes. En la región del intrón 1 se identificaron dos polimorfismos: c.-153C>T y c.-128A>C, asimismo en la región 3'UTR dos polimorfismos: c.*10C>T y c.*38G>A.

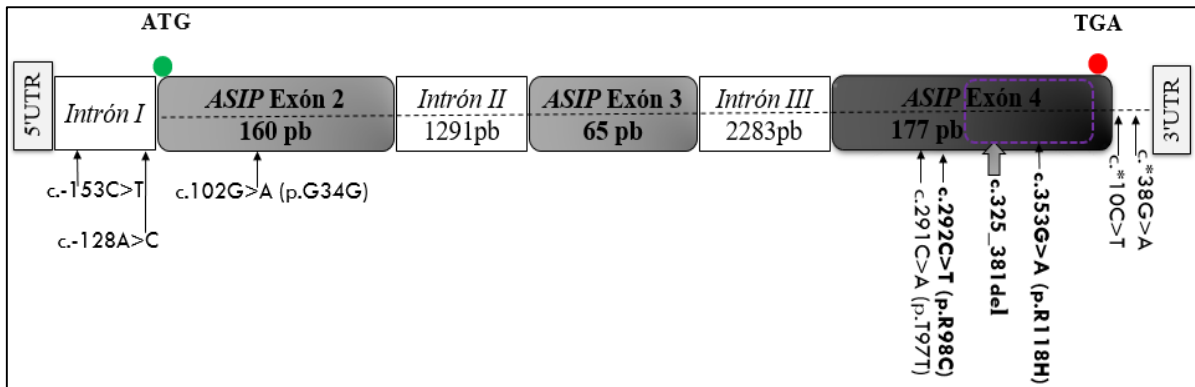


Figura 20: Estructura del gen *ASIP* con polimorfismos identificados en alpaca Huacaya. El polimorfismo c.353G>A no se observa en la secuencia con deleción en homocigosis c.325_381del

Inicialmente, la deleción fue caracterizada y tipificada mediante electroforesis en geles de agarosa. Los genotipos fueron definidos por presentar o no la deleción de 57 pb, tal como se muestra en la Figura 21. Luego, fueron corroborados por secuenciación.

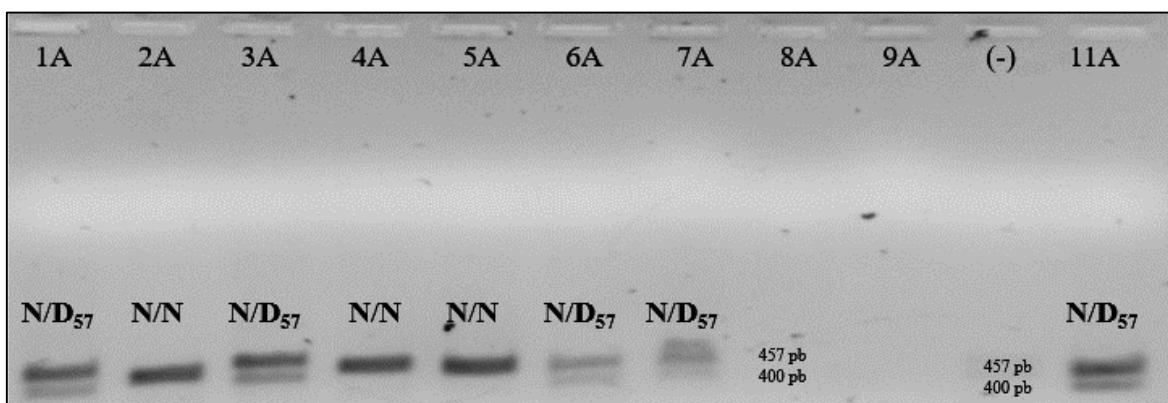


Figura 21: Caracterización del exón 4 en el gen *ASIP* mediante electroforesis. Productos de PCR sin deleción 2A, 4A y 5A y con deleción heterocigota (1A, 3A, 6A, 7A). Muestras no amplificadas 8A y 9A, seguida del control negativo (-) y control positivo (11A)

Tabla 8: Polimorfismos de un solo nucleótido y delección (c.325_381del) en el intrón 1, exón 2 y exón 4 del gen *ASIP* en alpacas negras y marrones

c.- 153C>T Intrón 1	c.- 128A>C Intrón 1	c.102G>A p.G34G	c.291C>A p.T97T	c.292C>T p.R98C	c.325_381del p.C109- R127	c.353G>A p.R118H	c.*10C>T 3'UTR	c.*38G>A 3'UTR	Color
C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	D₅₇/D₅₇	**	C/C	G/G	N
C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	D₅₇/D₅₇	**	C/C	G/G	N
T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	D₅₇/-	G	C/C	A/G	N
T/T	C/C	G/G	C/C	C/T	D₅₇/-	G	C/C	A/G	N
C/C	A/A	A/G	C/A	C/C	D₅₇/-	A	C/T	G/G	N
C/C	A/A	A/G	C/A	C/C	D₅₇/-	A	C/T	G/G	MN
C/C	A/A	A/G	C/A	C/C	D₅₇/-	A	C/T	G/G	MO
T/T	C/C	G/G	C/C	T/T	--	G/G	C/C	A/A	N
C/C	A/A	A/G	C/A	C/T	--	G/A	C/T	A/G	N
C/C	A/A	A/A	A/A	C/C	--	A/A	T/T	G/G	N
C/C	A/A	A/A	A/A	C/C	--	A/A	T/T	G/G	N
C/C	A/A	A/A	A/A	C/C	--	A/A	T/T	G/G	N
T/T	C/C	A/G	C/A	C/C	--	G/A	C/T	A/G	MO
NI	NI	NI	C/A	C/C	--	G/A	C/T	A/G	MC
C/C	A/A	A/A	A/A	C/C	--	A/A	T/T	G/G	MC
T/T	C/C	A/G	C/A	C/C	--	G/A	C/T	A/G	MC

En negrita se muestran los polimorfismos no sinónimos; delección homocigota (D₅₇/D₅₇), heterocigota (D₅₇/-), sin delección (--). **: No disponible c.353G>A en la delección en homocigosis c.325_381del. NI: no identificado. Color de alpacas: tres marrones claros (MC), dos marrones oscuros (MO), 1 marrón-negros (MN) y 11 negros (N)

Además, en la Figura 22 se muestra la comparación de 16 secuencias de aminoácidos (codificados por el exón 2 del gen *ASIP*) y la secuencia de aminoácidos referido por Almathen *et al.* (2018) en alpaca negra y marrón. En nuestro estudio no observamos el c.11C>G (p.T4S) ni el c.19T>C (p.F7L) mostrados por Almathen *et al.* (2018) en alpaca negra y marrón, quienes consideraron las accesiones FJ847231 y FJ847230, respectivamente. Por otro lado, existen tres secuencias HQ645015, HQ645016 y HQ645017 depositadas por Bathrachalam *et al.* (2012), Chandramohan *et al.* (2013). Nuestro hallazgo en el exón 2 del gen *ASIP* demuestra la ausencia de SNP en la posición c.11C (p.T4) y c.19T (p.F7) coincidente con los resultados obtenidos por Feeley *et al.* (2011), Daverio *et al.* (2016) y Marín *et al.* (2018).

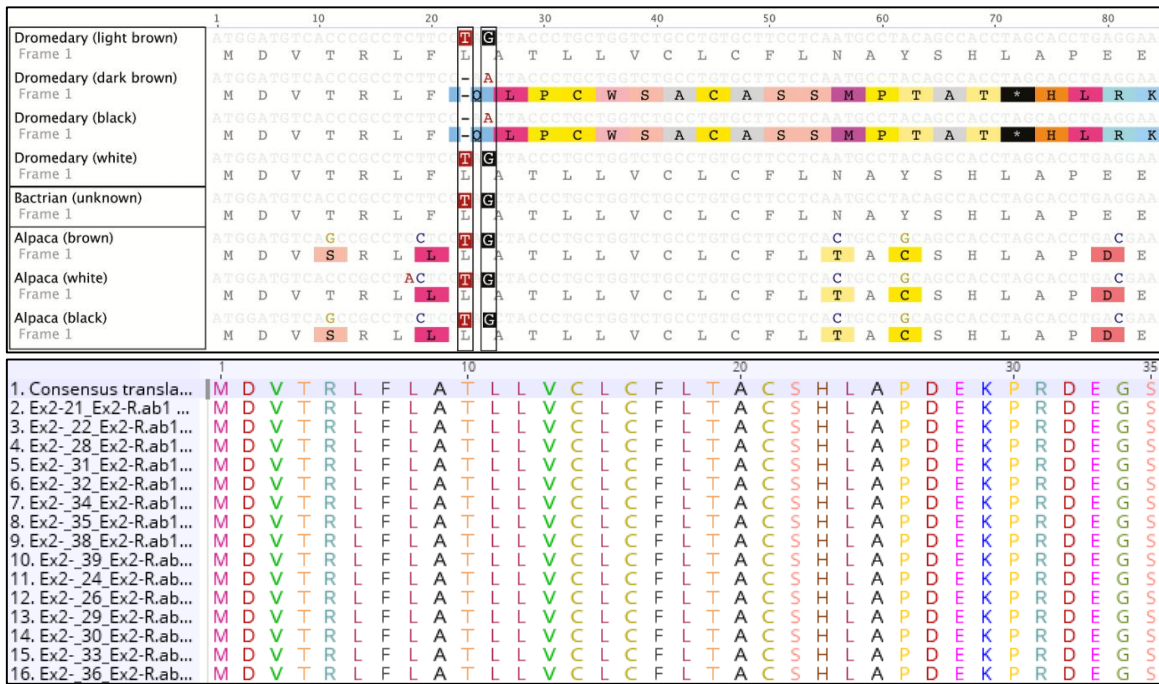


Figura 22: Alineamiento de secuencia de aminoácidos en el exón 2 del gen *ASIP*. La parte superior de esta figura fue adaptada de Almathen *et al.* (2018)

Una vez caracterizada la estructura del exón 4, completamos la amplificación por PCR y la secuenciación de 98 animales (89 alpacas y nueve vicuñas), los mismos animales mencionados en el estudio del gen *MC1R*. El polimorfismo sinónimo c.291C>A y el polimorfismo no sinónimos c.292C>T se localizaron juntos los que se denominan polimorfismos de doble nucleótido (Tabla 10, Anexo 9), del inglés double nucleotide polymorphisms (DNP). A pesar de que el c.291C>A es sinónimo podría tener algún efecto en la expresión del color por estar junto a c.292C>T (Feeley *et al.* 2011; Chandramohan *et al.* 2013). Feeley *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2013) y Marín *et al.* (2018) reportaron juntos estos dos polimorfismos c.291C>A y c.292C>T, los que se traducen en p.T97T y p.R98C, respectivamente y que pueden ser analizados como haplotipos.

Por otro lado, en dromedario se identificaron dos polimorfismos en el exón 2 del gen *ASIP*, una delección de 1 pb (c.23 T_{del}) y un SNP (c.25G>A) que definen 2 haplotipos y 2 genotipos en homocigosis, c.23T_{del}/25A y c.23T/c.25G (Almathen *et al.* 2018). Estos autores indican que los animales de color negro y marrón oscuro presentan el primer haplotipo en homocigosis y que provoca el cambio de la secuencia de aminoácidos e introduce un codón de terminación prematuro en la posición 24.

Mientras que todos los individuos de color marrón claro y blanco eran homocigóticos para el haplotipo c.23T/c.25G. En dromedario de diferentes colores no se han reportado polimorfismos en los exones 3 y 4 del gen *ASIP* (Almathen *et al.* 2018).

4.6 POLIMORFISMOS Y HAPLOTIPOS DEL GEN *ASIP* ASOCIADOS AL COLOR DEL VELLÓN

En nuestro estudio solo dos animales negros presentaron la delección en homocigosis. Feeley *et al.* (2011) observaron en homocigosis 21 de 50 de alpacas negras (0.42) y en heterocigosis en 19 de 50 animales (0.35). En cambio, Chandramohan *et al.* (2013) no observaron esta delección en homocigosis. Por otro lado, Daverio *et al.* (2016) reportó en homocigosis (D_{57}/D_{57}) en 9 de 19 llamas eumelánicas (0.47).

En 12 alpacas negros y seis marrón-negros se observó la delección heterocigota ($D_{57}/-$), con una frecuencia de 0.45 mayor a 0.32 reportado por Daverio *et al.* (2016) en llamas con pigmentación eumelánica. En la vicuña no se observó esta delección, porque es una especie silvestre que no está sometido a selección artificial, este resultado coincide con el reporte de Marín *et al.* (2018). En la alpaca se definieron tres haplotipos (H), H1: TGN, H2: C-D, H3: CAN constituidos por tres polimorfismos c.292C>T, c.353G>A, c.325_381del, mientras que en la vicuña se definió el H4: CGN (Tabla 9).

Tabla 9: Haplotipos y alelos del gen *ASIP* en alpacas de color y vicuñas

Haplotipos (H)*	Frec. fase	N/MN	MO	MC	BL	VV	Alelo
[H1] TGN	23	16(2;14)	03	02	00	00	a ²
[H2] C-D	34	20(2;18)	06	04	03	00	a ¹
[H3] CAN	74	26(11;15)	12(3;9)	16(2;14)	01	00	a ³
[H4] CGN	65	02	11(1;10)	17(4;13)	8(4;4)	09	A ⁺

* Haplotipos constituidos por tres polimorfismos con sustitución de aminoácidos c.292C>T, c.353G>A, c.325_381del. D: delección, N: sin delección, c.353G>A y sin la variante (-). En cada haplotipo n(a;b), n: número de individuos, a:homocigosis, b:heterocigosis. Negro/marrón-negro (N/MN), marrón oscuro (MO), marrón claro (MC), blanco (BL), vicuña (VV)

El H1 fue el más frecuente en alpacas negras, menos frecuentes en alpacas marrones y ausente en las blancas y vicuñas. El H2 delecionado (C-D) se presentó en el 51.9 por ciento de alpacas negras y en el 54.4 por ciento de marrón-negras, observándose menor porcentaje de H2 en los otros colores (Figura 23).

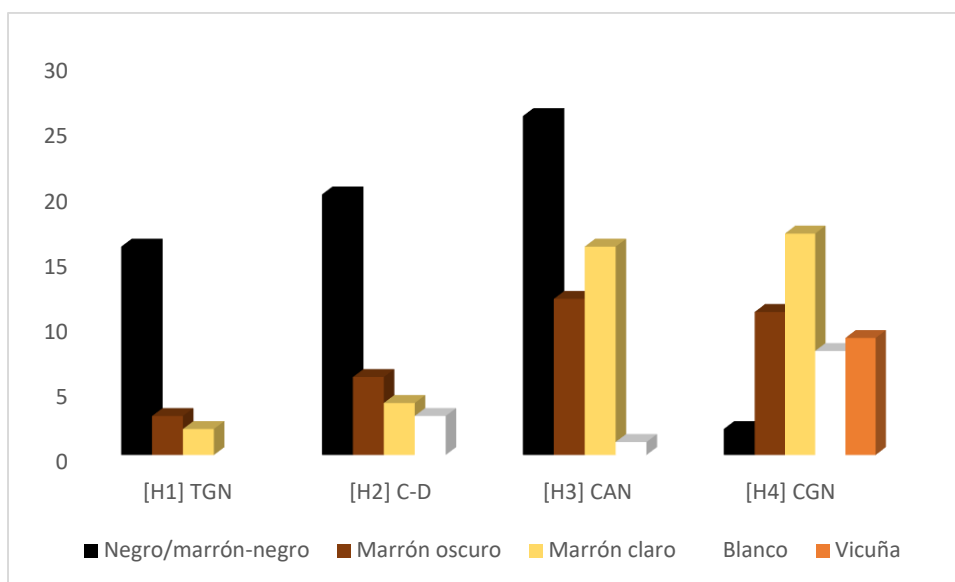


Figura 23: Frecuencias absolutas de haplotipos del gen ASIP en alpaca de color y vicuña. Haplotipos: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 y H8

Los haplotipos H1, H2, H3 fueron asociados con el vellón negro/marrón-negro (Prueba exacta de Fisher $p < 0.001$), mientras que el H4: CGN fue asociado con alpacas feomelánicas (marrón claro, marrón oscuro, blanco) y vicuñas (Prueba exacta de Fisher $p < 0.005$). Agrupando solo en dos colores el negro y marrón, se observó que el H3 está asociado con el negro y el H4 con el marrón (Prueba exacta de Fisher $p = 7.858e-05$).

En nuestro estudio los animales con pigmentación eumelánica presentaron la forma homocigota al menos en uno de los tres polimorfismos (D_{57}/D_{57}), T/T y A/A, también se observó la combinación de dos polimorfismos en heterocigosis, la deleción ($D_{57}/-$) con CT, la deleción ($D_{57}/-$) con A y C/T con G/A (Tabla 10). En alpacas negras Chandramohan *et al.* (2013) y Feeley *et al.* (2011) han propuesto los genotipos basado en los tres alelos recesivos del gen ASIP, estos autores encontraron que las alpacas negras presentaban en homocigosis el alelo delecionado p.C109_R127del, el alelo c.292T (p.R98C), el alelo c.353A (p.R118H) o presentaban en heterocigosis la combinación de dos de estas mutaciones.

Los alelos fueron definidos en base a los haplotipos: H2 = a¹, H1 = a², H3 = a³, H4: alelo silvestre (A⁺) porque se presentó en homocigosis en el 100 por ciento de vicuñas, 50 por ciento de alpacas blancas, el 18.18 por ciento de marrones claro. En alpacas identificamos tres alelos con pérdida de función en el gen *ASIP* similar al reporte de Feeley *et al.* (2011) y Chandramohan *et al.* (2013).

Los haplotipos H3 y H4, difieren en el polimorfismo c.353G>A, la variante A en homocigosis A/A se relaciona con la producción del pigmento eumelánico. Los polimorfismos no sinónimos c.292C>T (p.R98C) y c.353G>A (p.R118H) y una delección de 57 pb (p.C109_R127del) caracterizados en el exón 4 del gen *ASIP* definen los genotipos en este gen, los cuales fueron coincidentes al reporte de Feeley *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2013), Daverio *et al.* (2016) y Marín *et al.* (2018).

Tabla 10: Genotipos propuesto para el gen *ASIP* en alpacas Huacaya de color y vicuñas

c.291C>A p.T97T	c.292C>T p.R98C	c.325_381del p.C109-R127	c.353G>A p.R118H	c.*10C>T 3'UTR	c.*38G>A 3'UTR	Genotipos propuesto	Especies: 89 alpacas de color y nueve vicuñas
C/C	C/T	D₅₇/-	G	C/C	A/G	a ¹ a ²	5N, 2MN, 2MO
C/A	C/C	D₅₇/-	A	C/T	G/G	a ¹ a ³	7N, 3MN, 3MO, 1MC
A/A	C/C	--	A/A	T/T	G/G	a ³ a ³	8N, 3MN, 3MO, 2MC
C/C	C/C	D₅₇/D₅₇	**	C/C	G/G	a ¹ a ¹	2N
C/A	C/T	--	G/A	C/T	A/G	a ² a ³	5N 1MN, 2MC
C/C	T/T	--	G/G	C/C	A/A	a ² a ²	2N
C/A	C/C	--	G/A	C/T	A/G	A ⁺ a ³	8MO, 11MC, 1BL
C/C	C/T	--	G/G	C/C	A/A	A ⁺ a ²	1MN, 1MO
C/C	C/C	D₅₇/-	G	C/C	A/G	A ⁺ a ¹	1MN, 1MO, 2MC, 3BL
C/C	C/C	--	G/G	C/C	A/A	A ⁺ A ⁺	1MO, 4MC, 4BL
C/A	C/C	--	G/G	C/T	G/G	A ⁺ A ⁺	5 Vicuñas
C/C	C/C	--	G/G	C/C	G/G	A ⁺ A ⁺	4 Vicuñas

En negrita son mutaciones no sinónimas y la delección c.325_381del, en homocigosis (D₅₇/D₅₇), en heterocigosis (D₅₇/-) y sin delección (--).

** No disponible c.353G>A, la delección en homocigosis. Genotipos identificados c.325_381del: [H2 = a¹], c.292T: [H1 = a²], c.353A: [H3 = a³].

Número de alpacas: 29 negros (N), 11 marrón-negros (MN), 19 marrón oscuros (MO), 22 marrón claros (MC), ocho blancos (BL) y nueve vicuñas

En camélidos andinos la región codificante del gen *ASIP* tiene una estructura compleja con varios promotores y primeros exones no codificantes alternativos que se transcriben en ARNm con diferentes 5'UTRs. Estas isoformas de ARNm regulan la expresión temporal y espacial del gen *ASIP*, produciendo diversos patrones de pigmentación (Chandramohan *et al.* 2013; Cransberg 2017; Anello *et al.* 2022a).

4.7 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA ASIP

La probabilidad del daño en la proteína (Pdel = 0.57) fue moderada en el polimorfismo c.353G>A. Los haplotipos H1 y H4, difieren en c.292C>T, aunque la probabilidad de alterar la función de la proteína es baja (Pdel = 0.27). La delección (c.325_381del) causa la pérdida de función en la proteína *ASIP* por la pérdida de 19 aminoácidos. Este frameshift fue reportado en otra población de alpacas y llamas por Feeley *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2013), Daverio *et al.* (2016) y Marín *et al.* (2018).

4.8 INTERACCIÓN ENTRE LOS GENES ASIP Y MC1R

Interacción de alelos en los genes *ASIP* y *MC1R* se observó en alpacas de color negro, marrón-negro, marrón oscuro y marrón claro (Tabla 11).

Tabla 11: Interacción de alelos de genes *ASIP* y *MC1R* en alpacas de color

Alelos de <i>ASIP</i> (<i>agouti</i>)	Alelos de <i>MC1R</i> (<i>extension</i>)	Genotipos propuestos	Colores definidos	Número de animales
a ¹ , a ³	E	a ¹ a ³ E-	Negro	7 alpacas
a ³	E	a ³ a ³ EE	Negro	6 alpacas
a ¹	E ⁺ , E	a ¹ a ¹ E ⁺ E	Negro	2 alpacas
a ¹ , a ²	E	a ¹ a ² E-	Negro	5 alpacas
a ² , a ³	E	a ² a ³ E-	Negro	5 alpacas
a ²	E	a ² a ² E-	Negro	2 alpacas
a ¹ , a ²	E	a ¹ a ² E-	Marrón-negro	2 alpacas
a ¹ , a ³	E	a ¹ a ³ E-	Marrón-negro	3 alpacas
a ³	E	a ³ a ³ E-	Marrón-negro	3 alpacas
A ⁺ , a ³	E	A ⁺ a ³ E-	Marrón oscuro	8 alpacas
a ¹ , a ³	E	a ¹ a ³ E-	Marrón oscuro	3 alpacas
a ³	E	a ³ a ³ E-	Marrón oscuro	3 alpacas
A ⁺ , a ³	E	A ⁺ a ³ E-	Marrón claro	7 alpacas
A ⁺	E	A ⁺ A ⁺ EE	Marrón claro	3 alpacas
A ⁺ , a ³	E, e	A ⁺ a ³ Ee	Marrón claro	4 alpacas
A ⁺	E ⁺	A ⁺ A ⁺ E ⁺ E ⁺	Blanco	4 alpacas
A ⁺ , a ¹	E ⁺	A ⁺ a ¹ E ⁺ E ⁺	Blanco	3 alpacas
A ⁺	E ⁺	A ⁺ A ⁺ E ⁺ E ⁺	Vicuña	9 vicuñas

Alelo silvestre en el gen *ASIP*: A⁺ y alelos recesivos: a¹, a² y a³. En el gen *MC1R*, alelo silvestre: E⁺, dominante: E, recesivo: e

La nomenclatura que hace referencia a los alelos E, e, E⁺ del gen *MC1R* y los alelos a¹, a², a³, A⁺ del gen *ASIP* deriva de los iniciales de ambos genes, el gen *MC1R* es conocido como el gen *extension* y el gen *ASIP* es conocido como el gen *agouti*. Nuestros resultados demuestran la interacción epistática entre los alelos de los genes *MC1R* y *ASIP* en alpacas negra y marrón-negra. El alelo E se presenta en combinación con los alelos recesivos del gen *ASIP* (a¹, a² y a³) en homocigosis y/o heterocigosis, sin embargo, en alpacas negras de INIA Quimsachata (Puno) Pallotti *et al.* (2020) reportaron el alelo E en homocigosis que interacciona únicamente con los alelos recesivos en heterocigosis del gen *ASIP*. Por otro lado, Daverio *et al.* (2016) observaron que las llamas eumelánicas eran homocigotas para la delección, homocigotas para la variante T de c.292C>T o heterocigotas para la combinación de la delección y el polimorfismo c.292C>T.

En alpacas negras, la interacción entre los genes *ASIP* y *MC1R* en homocigosis a³a³EE y en heterocigosis para el gen *ASIP* a¹a³EE resultó similar al reporte de Feeley *et al.* (2011), Chandramohan *et al.* (2013), Bathrachalam *et al.* (2019) y Pallotti *et al.* (2020). Pero no todas las alpacas negras y marrones presentaron una interacción epistática, por otra parte, algunas alpacas negras y marrones eran heterocigotas en el gen *MC1R* similar al reporte de Pallotti *et al.* (2020), por el contrario, estos autores indican la presencia del genotipo homocigoto dominante solo en animales negros, en cambio ninguna alpaca marrón era homocigota para los alelos dominantes o recesivos. En la mayoría de alpacas marrones oscuro se presenta el alelo silvestre A⁺ del gen *ASIP*, en heterocigosis (A⁺a³) e interactúa con el alelo dominante (E) del gen *MC1R* similar al reporte de Pallotti *et al.* (2020).

El alelo dominante (A^{wl}) en el gen *agouti* de alpaca blanca fue descrito por Hart *et al.* (2003) que se segrega juntamente con el alelo recesivo del *extension* (e). Se afirma que el gen *MC1R* es epistático sobre el *ASIP* (Hart *et al.* 2003; Bathrachalam *et al.* 2019). En alpacas negras la interacción epistática puede ser dominante cuando se presenta la mutación con ganancia de función en el gen *MC1R* y recesiva cuando se presenta la mutación con pérdida de función en el gen *ASIP* (Bathrachalam *et al.* 2019; Pallotti *et al.* 2020). Por otro lado, en los equinos negros se determinó el genotipo con una interacción epistática de aaEE, mientras que en el marrón oscuro la interacción fue AaEE (Druml, *et al.* 2018). En algunas alpacas marrón claro se expresa el alelo silvestre A⁺ en homocigosis o en heterocigosis (A⁺/a³) junto con el alelo dominante (E) del gen *MC1R*, al igual que las blancas.

En la mitad de las alpacas blancas se observaron alelos silvestres en homocigosis A^+ y E^+ , su genotipo fue similar al genotipo de las vicuñas. Los alelos silvestres en los genes *MC1R* y *ASIP* de las vicuñas se mantienen en homocigosis, lo que sugiere que la vicuña fue el color ancestral de la alpaca. En otro estudio independiente Marín *et al.* (2018) observó que las vicuñas eran menos variables entre sí comparado con la alpaca, asimismo Almathen *et al.* (2018) demostró la presencia del alelo silvestre en camellos dromedarios de color marrón claro. El marrón claro es el más abundante en los rebaños de alpaca de color, probablemente debido a la presencia del alelo silvestre del gen *ASIP*.

Por otro lado, las tonalidades del marrón se deben a la variación cuantitativa del pigmento feomelanina (Cransberg *et al.* 2013), además se sugiere que hay efectos aditivos de genes en la expresión de la gran variabilidad de tonalidades (Bustinza 1968). La cantidad de feomelanina es un carácter cuantitativo, por ello es probable que toda la variación esté controlada por múltiples loci adicionales, como fue descrito en perros feomelánicos (Slavney *et al.* 2021).

V. CONCLUSIONES

- El color de las alpacas se reagrupó en negro/marrón-negro, marrón oscuro y marrón claro diferente al color de la vicuña, según la cuantificación de los parámetros de colorimetría CIE $L^*a^*b^*$ que relaciona indirectamente la cantidad total de eumelanina y feomelanina.
- En el gen *MC1R* se propone el alelo dominante (E), recesivo (e) y silvestre (E^+). Las alpacas de color negro/marrón-negro tienen el alelo E en homocigosis y/o heterocigosis, mientras que las alpacas marrones tienen el alelo e en heterocigosis y las vicuñas el alelo E^+ en homocigosis. En alpacas para el gen *ASIP* se propone tres alelos recesivos a^1 , a^2 , a^3 y un silvestre (A^+).
- La interacción sinérgica entre los genes *MC1R* y *ASIP* modula la síntesis de melanina en la fibra, el alelo E dominante del gen *MC1R* combinado con los alelos recesivos del gen *ASIP* a^1 , a^2 y a^3 en heterocigosis y/o homocigosis se presenta en alpacas de color negro/marrón-negro. En alpacas marrones la interacción es menos frecuente, por la expresión del alelo silvestre A^+ del gen *ASIP*. No se observa ninguna interacción en alpacas blancas y vicuñas debido a la expresión de ambos alelos silvestres A^+ y E^+ .

VI. RECOMENDACIONES

- En la fibra y piel de alpaca, la definición subjetiva de la pigmentación y el registro de los colores debe reemplazarse con métodos cuantitativos (espectrofotometría o colorimetría) para el registro del color según la edad de la alpaca.
- Realizar el análisis de segregación y analizar la expresión de los genes *MC1R* y *ASIP* en alpacas negras, marrones y blancas de diferentes edades.
- Realizar estudios de segregación de manchas en el vellón de alpacas de color e identificar los marcadores moleculares que ayuden para la selección de alpacas de colores uniformes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adalsteinsson, S. 1983. Inheritance of colours, fur characteristics and skin quality traits in North European sheep breeds: A review. *Livestock Production Science* 10: 555--567
- Almathen, F; Elbir, H; Bahbahani, H; Mwacharo, J; Hanotte, O. 2018. Polymorphisms in *MC1R* and *ASIP* genes are associated with coat color variation in the Arabian camel. *Journal of Heredity* 109: 700-706.
- Alshanbari, F; Castaneda, C; Juras, R; Hillhouse, A; Mendoza, MN; Gutiérrez, GA; Ponce de León, FA; Raudsepp, T. 2019. Comparative FISH - Mapping of *MC1R*, *ASIP*, and *TYRP1* in new and old world camelids and association analysis with coat color phenotypes in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Frontiers in Genetics* 10: 340.
- Allain, D; Renieri, C. 2010. Genetics of fibre production and fleece characteristics in small ruminants, Angora rabbit and South American camelids. *Animal* 4(9): 1472-1481.
- Ando, H; Kondoh, H; Ichihashi, M; Hearing, VJ. 2007. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *Journal of Investigative of Dermatology* 127: 751-761.
- Anello, M; Daverio, MS; Rodríguez, SS; Romero, SR; Renieri, C; Vidal Rioja, L; Di Rocco, F. 2022a. The *ASIP* gene in the llama (*Lama glama*): Alternative transcripts, expression and relation with color phenotypes. *Gene* (30): 809:146018.
- Anello, M; Daverio, MS; Di Rocco, F. 2022b. Genetics of coat color and fiber production traits in llamas and alpacas. *Animal Frontiers* 12 (4): 78-86.
- Antonini, M. 2010. Hair follicle characteristics and fiber production in South American Camelids. *Animal* 4: 1460-1471.
- Aragón, O; Mamani, L. 2018. Alpaca de color. Estrategia de conservación en comunidades de alta montaña: Sistematización de la experiencia de Heifer Perú en la formación de los Centros de Producción de Reproductores. HEIFER internacional Perú. Lima-Perú.

Australian Alpaca Association. 2012. AAA Alpaca Fleece Colour Chart. Disponible en: <https://www.oakgrove.com.au/AAA%20Alpaca%20Fleece%20Colour%20Chart.pdf>

Bathrachalam, C; Nocelli, C; Pazzaglia I; Pallotti, E; Pediconi, D; La Terza, A; Renieri, C. 2019. Interaction between *ASIP* and *MC1R* in black and brown alpaca. In: M Gerken, C Renieri, D Allain, H Galbraith, JP Gutiérrez, L McKenna, R Niznikowski and M. Wurzinger, ed. *Advances in Fibre Production Science in South American Camelids and other Fibre Animals*. Universitätsverlag Göttingen, Göttingen. p. 163-170.

Bathrachalam, C; La Manna, V; Renieri, C; La Terza, A. 2012. *ASIP* and *MC1R* cDNA polymorphism in alpaca. *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*, Springer Book. Wageningen Academic Publishers. p. 93-96.

Bustinza, AV; Machaca, V; Cano, V; Quispe, J. 2021. Evolución y desarrollo de las razas de Alpaca: Suri y Huacaya. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 32(5): e19876.

Bustinza, AV. 1968. Herencia de colores del pelaje en alpacas. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. 44p.

Cecchi, T; Valbonesi, A; Passamonti, P *et al.* 2011. Quantitative variation of melanins in alpaca (*Lama pacos L.*). *Italian Journal of Animal Science* 10: 158-161.

Cecchi, T; Valbonesi, A; Passamonti, P *et al.* 2007. Quantitative variation of melanins in llama (*Lama glama L.*). *Small Ruminant Research* 71: 52-58.

Cecchi, T; Cozzali, C; Passamonti, P; Ceccarelli, P; Pucciarelli, F; Gargiulo, AM. 2004. Melanins and melanosomes from llama (*Lama glama L.*). *Pigment Cell Research* 17: 307-311.

Chandramohan, B; Renieri C; La Manna, V; La Terza A. 2015. The Alpaca Melanocortin 1 Receptor: Gene Mutations, Transcripts, and Relative Levels of Expression in Ventral Skin Biopsies. *The Scientific World Journal* 1-9.

Chandramohan, B; Renieri C; La Manna, V; La Terza A. 2013. The alpaca agouti gene: genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanic and pheomelanic coat color. *Gene* 521 (2): 303–310.

Chandramohan, B; Renieri C; La Manna, V; La Terza A. 2015. The Alpaca Melanocortin 1 Receptor: Gene Mutations, Transcripts, and Relative Levels of Expression in Ventral Skin Biopsies. *The Scientific World Journal* 1-9.

Chandramohan, B; Renieri C; La Manna, V; La Terza A. 2013. The alpaca agouti gene: genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanic and pheomelanic coat color. *Gene* 521 (2): 303-310.

Chaparro, C. 2010. Estudio de la diversidad de alpacas de color (*Vicugna pacos*) de la raza huacaya en unidades pecuarias familiares en la provincia de Candarave - Región Tacna-2009. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú. 80p.

CIE (Commission International de l'Eclerage). 2004. CIE 15: Technical Report: Colorimetry. Washington, the United States of America.

Cieslak, M; Reissmann, M., Hofreiter, M., and Ludwig, A. 2011. Colours of domestication. *Biological Reviews*, 86 (4): 885-899.

Cransberg, R. 2017. Insights into the alpaca skin transcriptome in relation to fibre colour. Thesis of Doctor of Philosophy. Curtin University, Australia. 147p.

Cransberg, R; Munyard, KA. 2011. Polymorphisms detected in the *tyrosinase* and *MATP* (*SLC45A2*) genes did not explain coat colour dilution in a sample of alpaca (*Vicugna pacos*). Short communication. *Small Ruminant Research* 95: 92-96.

Cruz, A; Yucra, A; Gutiérrez, GA; Burgos, A; Morante, R; Gutiérrez, JP; Cervantes, I; Wurzinger, M. 2021. Colorimetry analysis of coat color and its relationship with fiber traits in alpacas. *Animal* 15:100219.

Cruz, LA. 2017. Parámetros genéticos de caracteres funcionales y secundarios en alpacas. Tesis de Doctor. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 168p.

Daverio, MS; Rigalt, F; Romero, SR; Vidal-Rioja, L; Di Rocco, F. 2016. Polymorphisms in *MC1R* and *ASIP* genes and its association with coat color phenotypes in llamas (*Lama glama*). *Small Ruminant Research* 144: 83-89.

Daverio, MS. 2014. Caracterización de genes vinculados al crecimiento y al color de capa en la Llama (*Lama glama*). Tesis de Doctor. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 109p.

Druml, T; Grilz-Seger, G; Horna, M; Brem, G. 2018. Discriminant analysis of colour measurements reveals allele dosage effect of *ASIP/MC1R* in bay horses. Czech Journal of Animal Science 63: 347-355.

Excoffier, L; Lischer, HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564-567.

Fan, R; Gu, Z; Guang, X; Marín, JC; Varas, V; González, BA; Wheeler, JC; Hu, Y; Li, E; Sun, X; Yang, X; Zhang, C; Gao, W; He, J; Munch, K; Corbett-Detig, R; Barbato, M; Pan, S; Zhan, X; Bruford, MW; Dong, C. 2020. Genomic analysis of the domestication and post-Spanish conquest evolution of the llama and alpaca. Genome Biology 21(159): 1-26.

Fan, R; Yang, G; Dong, C. 2010. Study of hair melanins in various hair color alpaca (*Lama Pacos*). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 23(4): 444-449.

Feeley, NL; Bottomley, S; Munyard, KA. 2016. Novel mutations in *Vicugna pacos* (alpaca) *TYRPI* are not correlated with brown fibre colour phenotypes. Small Ruminant Research 143: 29-34.

Feeley, NL. 2015. Inheritance of fibre color in Alpacas: identifying the genes involved. Thesis of Ph.D of Curtin University, Australia.

Feeley, NL; Bottomley, S; Munyard, KA. 2011. Three novel mutations in *ASIP* associated with black fibre in alpacas (*Vicugna pacos*). Journal of Agricultural Science 149 (4): 529-538.

Feeley, NL; Munyard, KA. 2009. Characterization of the melanocortin-1 receptor gene in alpaca and identification of possible markers associated with phenotypic variations in colour. Animal Production Science 49: 675-81.

Frank, EN. 2001. Descripción y análisis de segregación de fenotipos de color y tipos de vellón en Llamas argentinas. Tesis de Doctor. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 304p.

Frank, EN; Hick, MVH; Gauna, C; Lamas, H; Reniere, C; Antonini, M. 2006. Phenotypic and genetic description of fiber traits in South American domestic camelids (llamas and alpacas). *Small Ruminant Research* 61: 113-129.

Gandarillas, H. 1971. Identificación preliminar de los genes involucrados en la herencia del color de las llamas y alpacas. *Boletín Experimental* 49: 1-29. Ministerio de asuntos campesinos y Agricultura. Estación Experimental de Patacamaya. La Paz, Bolivia.

Galbraith, H. 2010. Fundamental hair follicle biology and fine fibre production in animals. *Animal* 4(9): 1490-1509.

García-Borrón JC; Sánchez-Laorden, BL; Jiménez-Cervantes, C. 2005. Melanocortin 1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Research* 18: 393-410.

Gentry, A; Clutton-Brock, J; Groves, C. 2004. The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal Archaeological Science* 31: 645-651.

Green, M; Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning. A laboratory manual* (4th Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guridi, M; Soret, B; Alfonso, L; Arana, A. 2011. Single nucleotide polymorphisms in the melanocortin 1 receptor gene are linked with lightness of fibre colour in Peruvian Alpaca (*Vicugna pacos*). *Animal Genetics* 42(6): 679-82.

Hart, KW; Barker, SJ; Skerritt, JW; Vercoe, PE. 2003. The gene for white fleece in alpacas is homologous to A^{wt} , the gene for white fleece in sheep. *Gene Expression* 15: 82-85.

Hoekstra, H. 2006. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97: 222-234.

Hubbard, JK; Uy, JAC; Hauber, ME; Hoekstra, HE; Safran, RJ. 2010. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics* 26(5): 231-239.

- Jackling, FC; Johnson, WE; Appleton, BR. 2014. The Genetic Inheritance of the Blue-eyed White Phenotype in Alpacas (*Vicugna pacos*). *Journal of Heredity* 105(6): 941-951.
- Jones, M; Sergeant, C; Richardson, M; Groth, D; Brooks, S; Munyard, K. 2019. A non-synonymous SNP in exon 3 of the KIT gene is responsible for the classic grey phenotype in alpacas (*Vicugna pacos*). *Animal Genetics* 50(5): 493-500.
- Kadwell, M; Fernández, M; Stanley, H; Baldi, R; Wheeler, J; Rosadio, R; Bruford, M. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London* 268: 2575-2584.
- Kondo, T; Herring, VJ. 2011. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Review Dermatology* 6(1): 97-108.
- Kooyman, DL. 2021. Investigation of Genes Controlling Pigmentation in Alpacas. Alpaca Research Foundation. <https://alpaca-research.org/library/2455/investigation-of-genes-controlling-pigmentation-in-alpacas>
- Koseniuk, A; Ropka-Molik, K; Rubis, D; Smołucha, G. 2018. Genetic background of coat colour in sheep. *Archives Animal Breeding* 61(2): 173-178.
- Lupton, CJ; McColl, A; Stobart, RH. 2006. Fiber characteristics of the Huacaya Alpaca. *Small Ruminant Research* 64: 211-224.
- Marín, JC; Rivera R; Varas, V; Cortés, J; Agapito, A; Chero, A; Chávez, A; Johnson, W; Orozco-terwengel, P. 2018. Genetic variation in coat colour genes *MC1R* and *ASIP* provides insights into domestication and management of South American camelids. *Frontiers in Genetics* 9:487-494.
- Marín, JC; Romero, K; Rivera, R; Johnson, WE; González, BA. 2017. Y-chromosome and mtDNA variation confirms independent domestications and directional hybridization in South American camelids. *Animal Genetics* 48: 591-595.
- Munyard, KA. 2011. Inheritance of white colour in alpacas, identifying the genes involved. Project N° PRJ-000060. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, ACT.

Mason, IL. 1973. The role of natural and artificial selection in the origin of breeds of farm animals: A critique of Darwin's the variation of animals and plants under domestication. Institute of Animal Genetics, Edinburgh 90: 229-244.

Nguyen, NT; Fisher, DE. 2018. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell & Melanoma Research* 32(2): 224-236.

Norma Técnica Peruana NTP 231.301. 2014. Fibra de alpaca clasificada. Definiciones, clasificación por grupo de calidades, requisitos y rotulado. Comisión de normalización y de fiscalización de barreras comerciales no arancelarias-INDECOPI. 2ª Edición. Lima, Perú.

Norris, BJ; Whan, VA. 2008. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Research* 18:1282-1293.

Omasits, U; Ahrens, CH; Müller, S; Wollscheid, B. 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30(6): 884-886.

Oria, I; Quicaño, I; Quispe EC; Alfonso L. 2009. Variabilidad del color de la fibra de alpaca en la zona altoandina de Huancavelica-Perú. *Animal Genetic Resources Information* 45: 79-84.

Pallotti, E; Chandramohan, B; Pediconi, D; Nocelli, C; La Terza, A; Renieri, C. 2020. Interaction between the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) and agouti signalling protein genes (*ASIP*), and their association with black and brown coat colour phenotypes in peruvian alpaca. *Italian Journal of Animal Science* 19(1): 1508-1512.

Powell, AJ; Moss, MJ; Tree, LT; Roeder, BL; Carleton, C.L; Campbell, E; Kooyman, DL. 2008. Characterization of the effect of Melanocortin 1 Receptor, a member of the hair color genetic locus, in alpaca (*Lama pacos*) fleece color differentiation. *Small Ruminant Research* 79: 183-187.

Quispe, JE; Bustinza, V; Jahuira, F. 2019. Características del vellón de vicuñas (*Vicugna vicugna mensalis*) de Cala Cala y Picotani (Puno-Perú) criadas en semicautiverio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 30(2): 523-536.

R Core Team. 2021. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.

Renieri, C; Frank, EN; Rosati, AY; Antonini, M. 2009. Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources* 45: 45-54.

Renieri, C; Antonini, M; Frank, E 2004. Fibre recording systems in Camelids. In: Cardellino, R.; Rosati, A.; Mosconi, C (Eds). *Current Status of Genetic Resources, Recording and Production Systems in African, Asian and American Camelids*. ICAR Technical Series N° 11 pp.131-143. Sousse, Tunisia

Richardson, MF; Munyard, KA; Croft, LJ *et al.* 2019. Chromosome-level alpaca reference genome VicPac 3.1 improves genomic insight into the biology of New World camelids. *Frontiers in Genetics* 10: 586.

Rochus, CM; Westberg, SK; Jonas, E; Mikko, S; Johansson, AM. 2019. Mutations in *ASIP* and *MC1R*: dominant black and recessive black alleles segregate in native Swedish sheep populations. *Animal Genetics* 50(6):712-717.

Slavney, AJ; Kawakami, T; Jensen, MK; Nelson, TC; Sams, AJ; Boyko, AR. 2021. Five genetic variants explain over 70 por ciento of hair coat pheomelanin intensity variation in purebred and mixed breed domestic dogs. *PLoS ONE* 16(5): e0250579.

Tang, H; Thomas, PD. 2016. PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics* 15: 32(14):2230-2232.

Sponenberg, DP; Ito, S; Wakamatsu, K; Eng, LA. 1998. Pigment types in sheep, goats, and llamas. *Pigment Cell Research* 1: 414-418.

Valbonesi, A; Apaza, N; La Manna, V; González, ML; Huanca, T; Renieri, C. 2011. Inheritance of white, black and brown coat colours in alpaca (*Vicuna pacos L.*). *Small Ruminant Research* 99(1): 16-19.

Vallejo, AR; Yalta, C; Veli, E, Cerna, D. 2012. Diversidad y estructuración genética de alpacas de color de la región Puno (Perú). IV Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos.

Wakamatsu, K; Ito, S. 2021. Melanins in Vertebrates. In: Hashimoto, H., Goda, M., Futahashi, R., Kelsh, R., Akiyama, T. (Eds). *Pigments, Pigment Cells and Pigment Patterns*. Springer, Singapore.

Wakamatsu, K; Zippin, JH; Ito, S. 2021. Chemical and biochemical control of skin pigmentation with special emphasis on mixed melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Research* 34: 730-747.

Wang, H; Xin, L; Wang, X. 2005. Internal structure and pigment granules in coloured alpaca fibers. *Fibers and Polymers* 6(3): 263-268.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Caracterización visual de la pigmentación en vicuñas y alpacas de color

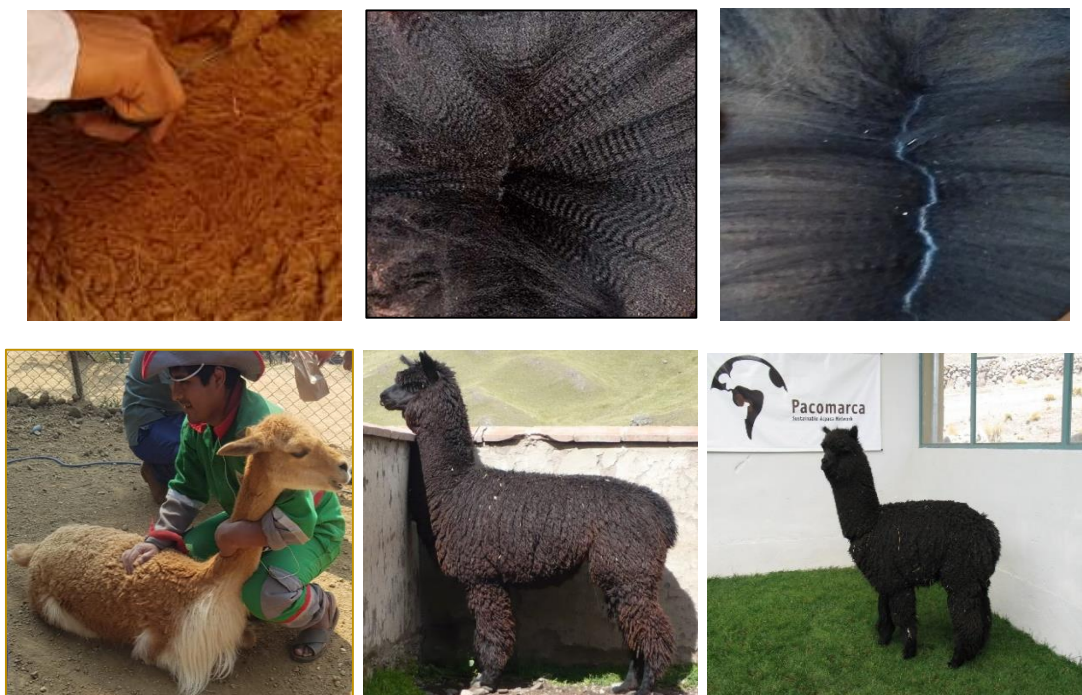
ID de animal	Sexo	Caracterización de la pigmentación					Presencia de canas y manchas	
		Vellón	Piel	Ojos	Mucosa	Pezuña	Canas	Manchas
Vicuña	M	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	H	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	H	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	H	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	H	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	M	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	H	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	M	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
Vicuña	H	Marrón	Oscuro	Negro	Oscuro	Azul		
030-12M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/pierna	BL/ingle/pierna
312-16M	M	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		BL/ingle
446-09M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/MR	Cuello/cola
394-14M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cuerpo	BL/costillar
278-09M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cola	BL/ingle
660-11MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro	BL/cuerpo	BL/ingle
667-11MP	M	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cuello	BL/paleta
668-11MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/cuello/ingle
677-16MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/vellón/ingle
285-13M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/grupa
362-16M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/costillar
373-14M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/mano/costillar
535-14M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cuerpo	
534-14M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/MR/cola	
555-08M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cuerpo	BL/cara/pierna
616-12MP	M	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cara	BL/costillar
444-16M	M	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		
167-13M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/ingle
405-15MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro	BL/cuerpo	BL/pierna
406-15MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro		BL/ingle
407-15MP	M	N	Azul	Zarco	Claro	Negro		BL/paleta
408-15MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro		
409-15MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	MR ligero	
439-15MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro		BL/cuello
535-14MP	M	N	Azul	Oscuro	Claro	Negro	BL/cuerpo	
534-14MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/MR cola	BL/orejas/pierna
585-14MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/flanco
639-12MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		MR/cruz/cola
582-13M	M	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		BL/paleta
201-15M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/ligero	BL/lomo/ingle
092-15M	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/costillar/lomo
102-14M	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro		BL/ingle
429-15MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro		Pig. MR/ingle/pie
440-15MP	M	N	Azul	Claro	Claro	Negro		Pig. MR/ingle

460-14MP	M	N	Azul	Oscuro	Claro	Negro	BL/MR/cuerpo	BL/cuello
705-16MP	M	N	Azul	Oscuro	Claro	Negro		BL/muslo/ingle
722-16MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/ orejas	
723-16MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
368-09M	M	N	Azul	Zarco	Oscuro	Negro		BL/MR/brazo
771-17MP	M	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		MR/cruz
093-11	H	N	Azul	Zarco	Oscuro	Negro	BL/cuerpo	BL/paleta/cuello
446-09	H	N	Azul	Zarco	Oscuro	Negro		
462-08	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		
487-10	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		BL/paleta/cabeza
507-10	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cuerpo	
433-15P	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
432-15P	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
304-05	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/paleta
439-09	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cuello	BL/paleta
120-14	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		MR/cuerpo
129-13	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/cuerpo
351-10	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/todo cuerpo	MR/ingle
573-08	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	MR/cara	MR/cara/costillar
241-12	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/todo cuerpo	BL/cuerpo/mano
044-13	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	MR/cara	MR/ingle
288-10	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/cara/cabeza
514-08	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cara/cabeza	BL/cara/cuerpo
484-11	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	BL/cuerpo	BL/flanco
522-17	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/poto
621-12P	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		MR/ BL/costillar
619-12P	H	N	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/costillar
446-09	H	N	Azul	Zarco	Oscuro	Negro		
665-09	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cuello	BL/paleta
651-09	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cuello	BL/pecho/flanco
508-09	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cara	
137-07	H	N	Azul	Zarco	Oscuro	Negro		BL/paleta
285-09	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		
491-10	H	N	Azul	Claro	Oscuro	Negro		
306-14	H	CON	Azul	Claro	Oscuro	Negro		BL/costillar
131-08R	H	CON	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		MR/ingle
543-11	H	CON	Azul	Claro	Oscuro	Negro		MR/cuerpo
072-13	H	CON	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
541-13	H	CON	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro	MR/grupa	MR/ingle
589-13	H	CON	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
197-12	H	CON	Azul	Claro	Oscuro	Negro		BL/costillar
370-12	H	CON	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/grupa	BL/costillar
185-13	H	CON	Azul	Claro	Oscuro	Negro	BL/cola	BL/costillar
237-15M	M	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
490-11M	M	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		MR/lomo
249-09	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
032-12	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
069-12	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		N/cara

228-09	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/costillar
271-10	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
329-07	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
429-11	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		BL/cuello
196-13	H	COM	Azul	Oscuro	Oscuro	Negro		
630-07M	M	CC	Marrón	Oscuro	Claro	Oscuro		
042-11M	M	CC	Marrón	Oscuro	Claro	Oscuro		
574-10M	M	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		
299-05	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		
661-10	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro	BL/cuerpo	BL/ingle
289-06	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		
323-05	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		BL/ingle
617-07	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		BL/pecho
557-09	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro	BL/cuerpo	
120-04	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		LF/ingle
183-08	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro		LF/ingle
451-07	H	CC	Marrón	Claro	Claro	Oscuro	N/cuerpo	

Café claro (CC), café oscuro marrón (COM), café oscuro negro (CON), negro (N). Patrón de pigmentación (Pig), mancha blanca (BL), mancha marrón (MR)

Anexo 2: Pigmento de feomelanina en vicuña y eumelanina en alpaca negra



Anexo 3: Protocolo comercial para la extracción de ADN en sangre entera

Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit Quick Protocol Catalog Nos. D4068 & D4069



Biological Fluids & Cells Protocol

Biological Fluids: ≤ 200 µl

Total DNA from whole blood, buffy coat, saliva, sputum, semen, etc. See the Instruction Manual page 2 for special considerations.

Cultured Cells: ≤ 5x10⁶

Total DNA from *E. coli*, insect, or mammalian cells (e.g. HeLa cells, buccal cells, HEK-293 cells, etc.). See the Instruction Manual page 2 for special considerations.

Note: Pellet cells and discard supernatant. Resuspend cell pellets using **DNA Elution Buffer** or an isotonic buffer (e.g. PBS):
< 1 x 10⁶ cells in 100 µl
1-5 x 10⁶ cells in 200 µl

*Add 1,040 µl of Storage Buffer to each 20 mg tube of Proteinase K. Store at -20°C.

1. Add up to 200 µl sample to a microcentrifuge tube and add:
200 µl **BioFluid & Cell Buffer (Red)**
20 µl **Proteinase K**

Note: For an input of less than 200 µl Biological Fluid, proportionally decrease BioFluid & Cell Buffer (Red), Proteinase K, and Genomic Binding Buffer.

2. Mix thoroughly and then incubate the tube at 55°C for 10 minutes.
 3. Add 1 volume **Genomic Binding Buffer** to the digested sample. Mix thoroughly.
Example: Add 420 µl Genomic Binding Buffer to the 420 µl digested sample.
 4. Transfer the mixture to a **Zymo-Spin™ IIC-XL Column** in a **Collection Tube**. Centrifuge (≥ 12,000 x g) for 1 minute. Discard the collection tube with the flow through.
 5. Add 400 µl **DNA Pre-Wash Buffer** to the column in a new Collection Tube and centrifuge for 1 minute. Empty the Collection Tube.
 6. Add 700 µl **g-DNA Wash Buffer** and centrifuge for 1 minute. Empty the Collection Tube.
 7. Add 200 µl **g-DNA Wash Buffer** and centrifuge for 1 minute. Discard the collection tube with the flow through.
 8. To elute the DNA, transfer to a clean microcentrifuge tube. Add ≥ 50 µl **DNA Elution Buffer** (minimum 35 µl), incubate for 5 minutes, and then centrifuge for 1 minute.
-

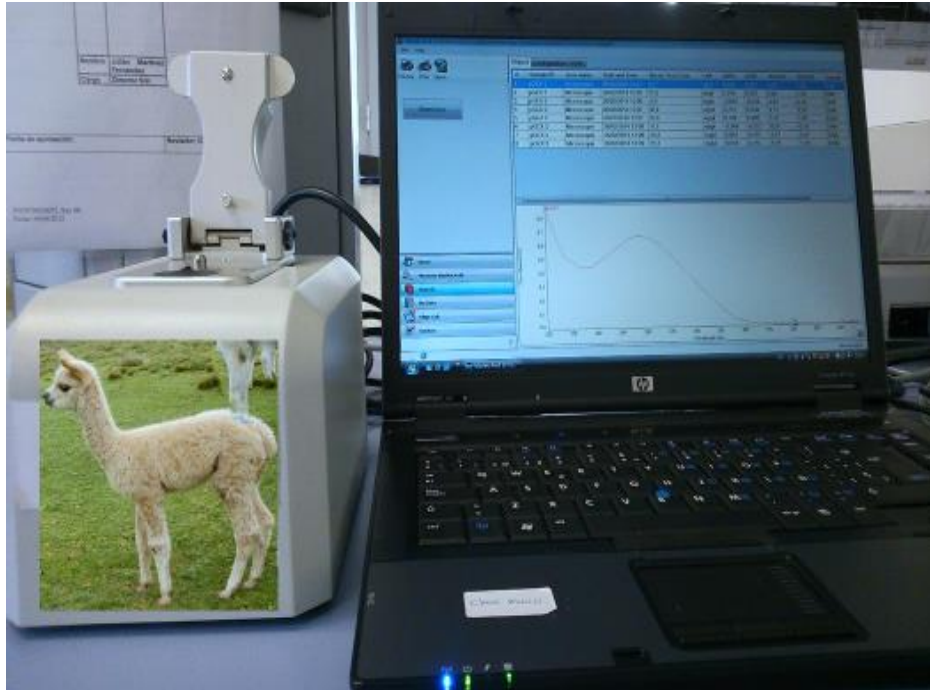
Anexo 4: Concentración y calidad de ADN extraída en alpacas y una vicuña

Código	Especie	Color de fibra	Concentración de ADN (ng/μL)	Calidad (260/280)
21	Huacaya	N	26.76	1.97
22	Huacaya	N	36.16	1.95
23	Huacaya	N	25.12	1.94
24	Huacaya	N	61.16	1.92
25	Huacaya	N	26.71	1.92
26	Huacaya	N	17.47	1.92
27	Huacaya	CC	120.9	1.89
28	Huacaya	N	7.748	1.88
29	Huacaya	CC	416.9	1.87
30	Huacaya	CC	89.8	1.87
31	Huacaya	COM	148.4	1.86
32	Huacaya	CON	22.86	1.85
33	Huacaya	N	19.94	1.85
34	Huacaya	N	64.95	1.85
35	Huacaya	N	94.73	1.85
36	Huacaya	N	55.16	1.84
37	Huacaya	COM	222.9	1.83
38	Huacaya	N	15.42	1.82
39	Huacaya	N	18.39	1.75
40	Huacaya	N	11.13	1.84
41	Huacaya	N	25.27	1.85
42	Huacaya	N	52.66	1.61
43	Huacaya	N	48.15	1.91
44	Huacaya	N	31.69	1.87
45	Huacaya	N	103	1.91
46	Huacaya	N	39.11	1.88
47	Huacaya	N	13.7	1.55
48	Huacaya	N	33.6	1.87
49	Huacaya	N	41.54	1.88
50	Huacaya	N	40	1.86
51	Huacaya	N	30.67	1.91
52	Huacaya	N	130.2	1.84
53	Huacaya	CON	20.24	1.69
54	Huacaya	CON	46.52	1.91
55	Huacaya	CON	42.85	1.9
56	Huacaya	CON	296.4	1.84
57	Huacaya	CON	36.74	1.9
58	Huacaya	CON	44.18	1.79
59	Huacaya	CON	123.9	1.85

60	Huacaya	CON	24.98	1.82
61	Huacaya	CON	35.05	1.94
62	Huacaya	COM	16.4	1.7
63	Huacaya	COM	17.74	1.82
64	Huacaya	COM	3.891	1.25
65	Huacaya	COM	227.3	1.86
66	Huacaya	COM	181.2	1.82
67	Huacaya	COM	54.16	1.86
68	Huacaya	COM	240.1	1.86
69	Huacaya	COM	293.5	1.87
70	Huacaya	COM	61.62	1.94
71	Huacaya	COM	9.981	2.06
72	Huacaya	COM	35.04	1.95
73	Huacaya	COM	53.09	1.85
74	Huacaya	COM	57.73	1.81
75	Huacaya	COM	103	1.85
76	Huacaya	COM	16.11	1.43
77	Huacaya	COM	63.09	1.92
78	Huacaya	COM	126.6	1.87
79	Huacaya	COM	38.93	1.87
80	Huacaya	CC	13.43	1.91
81	Huacaya	CC	4.044	2.45
82	Huacaya	CC	52.52	1.77
83	Huacaya	CC	18.06	1.78
84	Huacaya	CC	32.43	1.89
85	Huacaya	CC	273.1	1.85
86	Huacaya	CC	295.5	1.86
87	Huacaya	CC	62.56	1.86
88	Huacaya	CC	135.9	1.79
89	Huacaya	CC	143	1.83
90	Huacaya	CC	304.9	1.82
91	Huacaya	CC	70.61	1.83
92	Huacaya	CC	121.3	1.86
93	Huacaya	CC	51.24	1.9
94	Huacaya	CC	305.7	1.84
95	Huacaya	CC	144.2	1.83
96	Huacaya	CC	350	1.84
97	Huacaya	CC	70.97	1.85
98	Huacaya	CON	37.04	1.92
99	Huacaya	N	19.34	1.82
100	Huacaya	N	18.65	1.89
101	Huacaya	N	24.7	1.91

102	Huacaya	CC	165.7	1.85
103	Huacaya	N	27.14	1.89
104	Huacaya	N	134	1.83
105	Vicuña	Marrón	29.04	1.86

Anexo 5: Análisis de espectrofotometría con el equipo NanoDrop 8000



Anexo 6: Termociclador con perfil de ciclado para el exón 4 del gen ASIP



Anexo 7: Protocolo del Kit comercial usado en la PCR del exón 4 del gen ASIP

PCRBIO SYSTEMS
simplifying research

2x PCRBIO Taq Mix Red

www.pcrbio.com

Product description:

PCRBIO Taq Mix Red uses the latest developments in polymerase technology and buffer chemistry to enhance PCR speed, yield and specificity. The enzyme and buffer system allow for superior PCR performance on complex templates such as mammalian genomic DNA. Reactions can be directly loaded onto agarose gels without additional loading buffer.

2x PCRBIO Taq Mix Red is a robust mix for all your everyday PCR applications including genotyping, screening and library construction.

PCRBIO Taq DNA Polymerase can perform consistently well on a broad range of templates (including both GC and AT rich).

PCRBIO Taq DNA Polymerase has an error rate of approximately 1 error per 2.0×10^5 nucleotides incorporated. PCR products generated with PCRBIO Taq DNA Polymerase are A-tailed and may be cloned into TA cloning vectors.

High-throughput screening has resulted in a buffer system that allows efficient amplification from GC-rich and AT-rich templates, under fast and standard cycling conditions.

Component	200 reactions	1000 reactions
2x PCRBIO Taq Mix Red	5 x 1ml	25 x 1ml

Shipping and storage

On arrival the kit should be stored at between -30°C and -15°C . Avoid prolonged exposure to light. If stored correctly the kit will retain full activity for 12 months. The kit can be stored at 4°C for 1 month. The kit can go through 30 freeze/thaw cycles with no loss of activity.

Limitations of product use

The product may be used only for in vitro research purposes.

Technical support

For technical support and troubleshooting please email technical@pcrbio.com the following information:

Amplicon size
Reaction setup
Cycling conditions
Screen grabs of gel images

Continuación del Anexo 7

Important considerations

2x PCR BIO Taq Mix Red: The 2x mix contains PCR BIO Taq DNA Polymerase, 6mM MgCl₂, 2mM dNTPs, enhancers, stabilizers and a red dye for tracking during agarose electrophoresis. It is not recommended to add further PCR enhancers or MgCl₂ to the reaction. The buffer composition has been optimised to maximise PCR success rates.

Template: For eukaryotic DNA use between 5ng and 500ng per reaction, for cDNA use below 100ng per reaction.

Primers: Primers should have a predicted melting temperature of around 60°C, using default Primer 3 settings (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). The final primer concentration in the reaction should be between 0.2µM and 0.6µM.

Annealing: We recommend performing a temperature gradient to experimentally determine the optimal annealing temperature. Alternatively, we recommend a 55°C annealing temperature then increase in 2°C increments if non-specific products are present.

Extension: Optimal extension is achieved at 72°C. The optimal extension time is dependent on amplicon length and complexity of template. 15 seconds per kilobase (kb) is recommended for amplification from eukaryotic DNA for amplicons between 1kb and 6kb. For shorter amplicons a 1 second extension is sufficient.

Agarose gel electrophoresis dye migration: The 2x mix contains a red dye for tracking during agarose gel electrophoresis. In a 2% agarose TAE gel the dye migrates at a rate equivalent to 350bp of DNA. In a 1% agarose TAE gel the dye migration rate is equivalent to 600bp of DNA.

Reaction setup

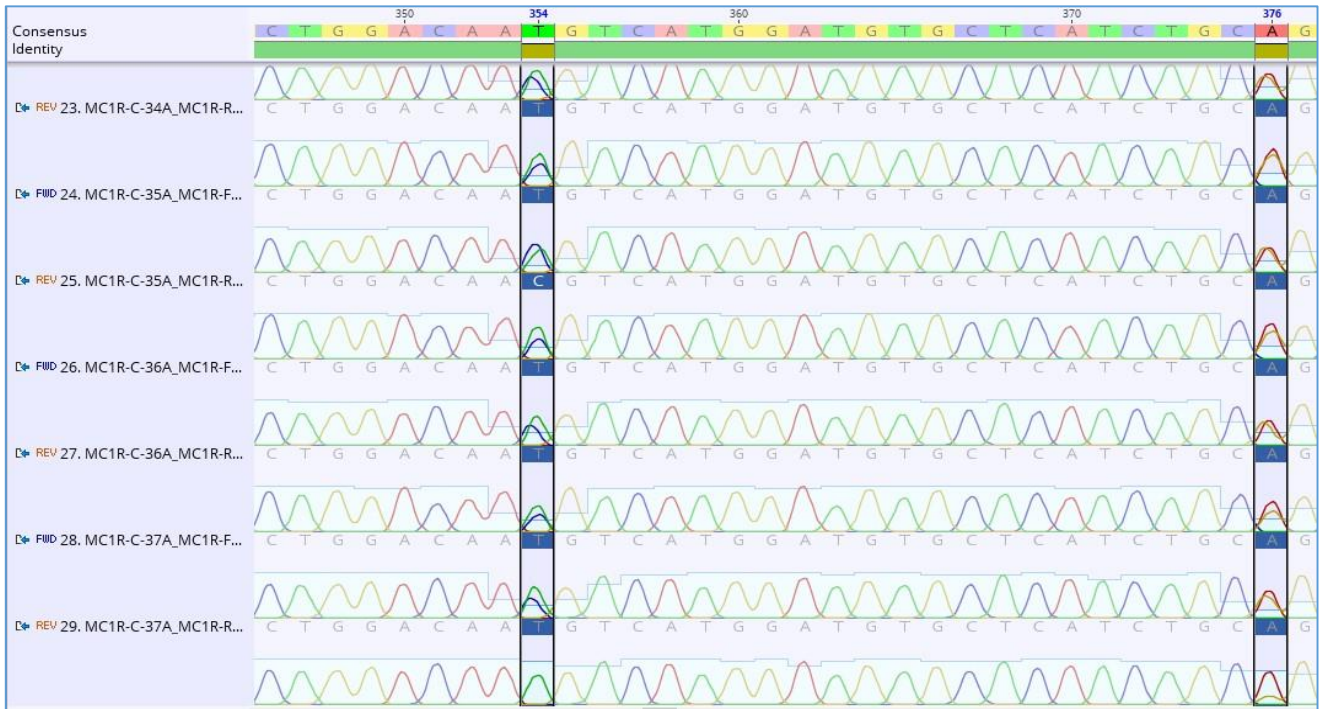
1. Prepare a master mix based on the following table:

Reagent	50µl reaction	Final concentration	Notes
2x PCR BIO Taq Mix Red	25.0µl	1x	
Forward primer (10µM)	2.0µl	400nM	See above for optimal primer design
Reverse primer (10µM)	2.0µl	400nM	
Template DNA	<100ng cDNA, <500ng genomic	variable	See above for template considerations
PCR grade dH ₂ O	Up to 50µl final volume		

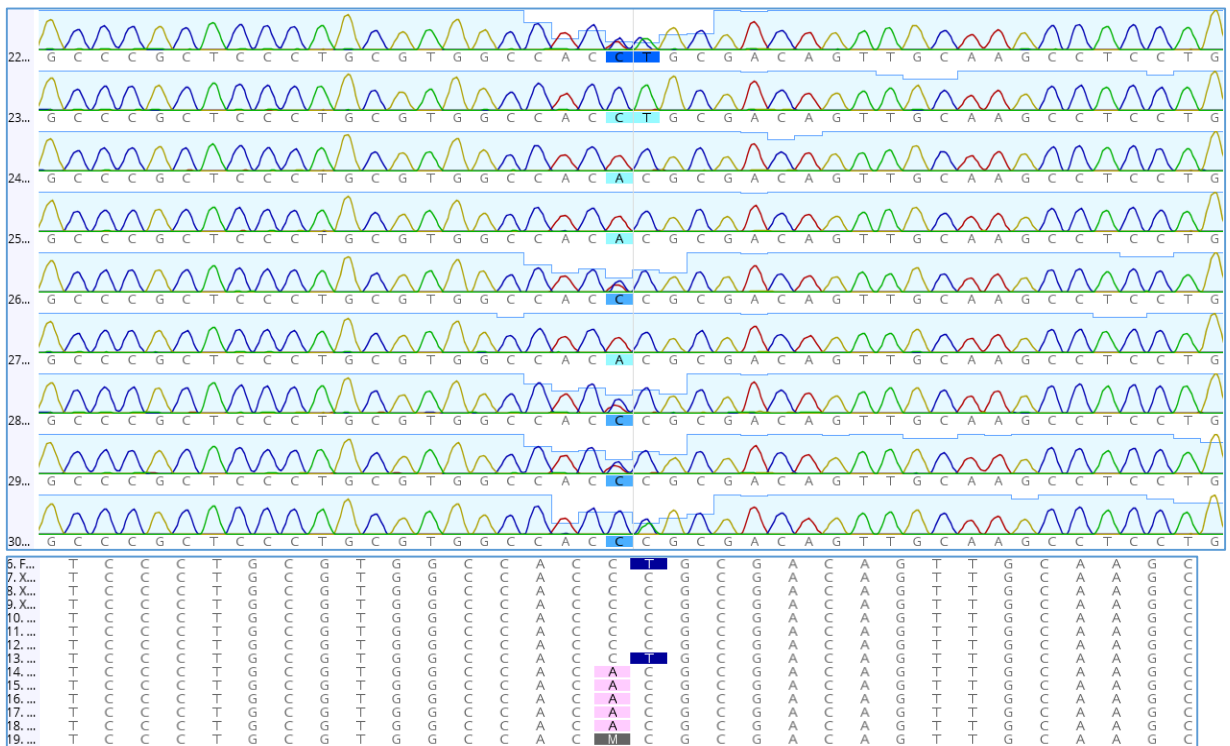
2. Cycle using conditions based on the following table:

Cycles	Temperature	Time	Notes
1	95°C	1min	Initial denaturation
40	95°C	15 seconds	Denaturation
	55°C to 65°C	15 seconds	Anneal
	72°C	1 to 90 seconds	Extension (15 seconds per kb)

Anexo 8: Alineamiento del electroferograma e identificación de polimorfismo sinónimo (c.354C>T) y no sinónimos (c.376G>A) en el gen *MC1R*



Anexo 9: Alineamiento que muestra c.291C>A y c.292C>T en el exón 4 del gen *ASIP*



Anexo 11: Secuencia codificante del gen *MC1R* de vicuña depositada en GenBank

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587025>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1995624742>

Vicugna vicugna mensalis isolate Vicuna 1 melanocortin 1 receptor (*MC1R*) mRNA, complete cds

GenBank: MW587025.1

[FASTA Graphics PopSet](#)

LOCUS MW587025 954 bp mRNA linear MAM 06-MAR-2021
DEFINITION Vicugna vicugna mensalis isolate Vicuna 1 melanocortin 1 receptor(MC1R) mRNA, complete cds.
ACCESSION MW587025
VERSION MW587025.1
KEYWORDS
SOURCE Vicugna vicugna mensalis
ORGANISM [Vicugna vicugna mensalis](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Artiodactyla; Tylopoda; Camelidae; Vicugna.
REFERENCE 1 (bases 1 to 954)
AUTHORS Pinares,R., Cruz,A., Daverio,M.S., Gutierrez,J.P., Ponce De Leon,F.A., Wurzinger,M., Di Rocco,F. and Gutierrez,G.A.
TITLE Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the MC1R gene in black and brown alpacas
JOURNAL Rev Peru Biol 28 (1) (2021)
REMARK Publication Status: Available-Online prior to print
REFERENCE 2 (bases 1 to 954)
AUTHORS Pinares,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-FEB-2021) Produccion Animal, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, Lima 12, Peru

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..954
/organism="Vicugna vicugna mensalis"
/mol_type="mRNA"
/isolate="Vicuna 1"
/sub_species="mensalis"
/db_xref="taxon:[273917](#)"
[gene](#) 1..954
/gene="MC1R"
[CDS](#) 1..954


```

/gene="MC1R"
/note="controls which type of melanin is produced
      by melanocytes"
/codon_start=1
/product="melanocortin 1 receptor"
/protein_id="QSG01068.1"

```

```

/translation="MPVLGPPQRRLLGSLNSTPQATTHLGLAANQTGPQCLEVSVDPGL
FLSLGLVSLVENVLVVAAITKNRNLHSPMYFICCLAASDLLVSMNSVLETAVMLLLE
AGALATWATVVQQLDNVMDVLCGSMVSSLCSLGAIAVDRIYISIFYALRYHSIVTLPR
AWRAIAAIWVASVLSSTLFITYYDHTAVLLCLVSFFVAMLALMAVLYVHMLARACQHA
RGIAQLHKRQRPIHQGFGLKGVATLTILLGIFFLCWGPFFLHLFLIVLCPQHPTCGCI
FKNFNLFALALIICNSIVDPLIYAFRSQELRKTLLQEVLCQSW"

```

ORIGIN

```

 1 atgcctgtgc tcggcccca gaggaggctg ctgggctccc tcaactccac cccccaagcc
61 accaccacc tcggactggc cgccaaccag acggggcccc agtgcctgga ggtgtctgtt
121 cccgacgggc tgttcctcag cctggggctg gtgagcctcg tggagaacgt gctgggtggtg
181 gctgccatca ccaagaaccg caacctgcat tctcccatgt attacttcat ctgctgcctg
241 gccgcgtcgg acctgctggt gagcatgagc aacgtgctgg agacggccgt catgctgctg
301 ctggaggctg gcgccctggc cacatgggct acgggtggtg agcagctgga caacgtcatg
361 gatgtgctca tctgcggctc catggtgtcc agcctctgct ctctgggtgc tatcgccgtg
421 gaccgctaca tctccatctt ctatgactg cgctaccaca gcatcgtgac gctgcctcgg
481 gcatggcggg ccatcgcggc catctgggtg gccagcgtcc tctccagcac cctcttcatc
541 acctactatg atcacacagc cgtcctcctc tgtctcgtca gctttttgt agccatgctg
601 gcgctcatgg cggtgctata tgtccacatg ctggcccggg cgtgccagca tgcccggggc
661 atgcccagc tccacaagag acagcggccc atccaccagg gctttggcct caagggcgtg
721 gccacgctca ccatcctgct gggcatctt ttcctctgct gggggccctt cttcctgcac
781 cttttctca tcgtcctctg tcctcagcac cccacctgtg gctgcatctt caagaattt
841 aacctcttc ttgccctcat catctgcaac tccatcgtgg acccctcat ctatgcctt
901 cgcagccagg agctccgga gacactccag gaagtgtgct agtgctcctg gtga

```

//

Anexo 12: Secuencia codificante del gen *MC1R* de alpaca marrón claro en GenBank

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587026>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1995624744>

Vicugna pacos isolate Alpaca 2 melanocortin 1 receptor (*MC1R*) mRNA, complete cds

GenBank: MW587026.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

LOCUS MW587026 954 bp mRNA linear MAM 06-MAR-2021
DEFINITION Vicugna pacos isolate Alpaca 2 melanocortin 1 receptor (MC1R) mRNA, complete cds.
ACCESSION MW587026
VERSION MW587026.1
KEYWORDS
SOURCE Vicugna pacos (alpaca)
ORGANISM [Vicugna pacos](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Artiodactyla; Tylopoda; Camelidae; Vicugna.
REFERENCE 1 (bases 1 to 954)
AUTHORS Pinares, R., Cruz, A., Daverio, M.S., Gutierrez, J.P., Ponce De Leon, F.A., Wurzinger, M., Di Rocco, F. and Gutierrez, G.A.
TITLE Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the MC1R gene in black and brown alpacas
JOURNAL Rev Peru Biol 28 (1) (2021)
REMARK Publication Status: Available-Online prior to print
REFERENCE 2 (bases 1 to 954)
AUTHORS Pinares, R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-FEB-2021) Produccion Animal, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, Lima 12, Peru

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..954 /organism="Vicugna pacos" /mol_type="mRNA" /isolate="Alpaca 2" /db_xref="taxon:30538"
gene	1..954 /gene="MC1R"
CDS	1..954 /gene="MC1R"

```

        /note="MC1R*brown light; controls which type of
                melanin is produced by melanocytes"
/codon_start=1
/product="melanocortin 1 receptor"

/protein_id="QSG01069.1"

```

```

/translation="MPVLGFPQRRLGSLNSTPQATTHLGLAXNQTGPQCLEVSVPDGL
FLSLGLVSLVENVLVVAITKNRNLHSPMYFICCLAASDLLXSMSNVLETAVMLLLE
AGALATWATVVQQLDNVMDVLICXSMVSSLCSLGAIIVDRYISIFYALRYHSIVTLPR
AWRAIAAIWVASVLSSTLFITYYDHTAVLLCLVSEFXVAMLALMAVLYVHMLARACQHA
RGIAQLHKRQRPIHQGFGLKGVATLTILLGIFFLCWGPFFLHLFLIVLCPQHPTCGCI
FKNFNLFALIIICNSIVDPLIYAFRSQELRKTLEVLQCSW"

```

ORIGIN

```

  1 atgcctgtgc tcggcccca gaggaggctg ctgggctccc tcaactccac cccccaagcc
 61 accacccacc tcggactggc crccaaccag acggggcccc agtgcctgga ggtgtctgtt
121 cccgaygggc tgttcctcag cctggggctg gtgagcctcg tggagaacgt gctgggtggg
181 gctgccatca ccaagaaccg caacctgcat tctcccatgt attacttcat ctgctgcctg
241 gccgcgtcgg acctgctgrt gagcatgagc aacgtgctgg agacggccgt catgctgctg
301 ctggaggctg gcgccctggc cacatgggct acggtggtgc agcagctgga caatgtcatg
361 gatgtgctca tctcrgctc catggtgtcc agcctctgct ctctgggtgc tatcgccgtg
421 gaccgctaca tctccatctt ctatgactg cgctaccaca gcatcgtgac gctgcctcgg
481 gcatggcggg ccacgcggc catctgggtg gccagcgtcc tctccagcac cctcttcatc
541 acctactatg atcacacagc cgtcctcctc tgtctcgtca gcttttytgt agccatgctg
601 gcgctcatgg cggtgctrta tgtccacatg ctggcccggg cgtgccagca tgcccggggc
661 atcgcccagc tccacaagag acagcggccc atccaccagg gctttggcct caagggcgtg
721 gccacgctca ccatcctgct gggcatcttc ttcctctgct gggggcccctt cttcctgcac
781 cttttcctca tcgtcctctg tcctcagcac cccacctgtg gctgcatctt caagaatttc
841 aacctcttc ttgccctcat catctgcaac tccatcgtgg accccctcat ctatgccttc
901 cgcagccagg agctccggaa gacactccag gargtgctgc agtgctcctg gtga

```

//

Anexo 13: Secuencia codificante del gen *MC1R* de alpaca negra en GenBank

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW587027>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1995624746>

Vicugna pacos isolate Alpaca 3 melanocortin 1 receptor (*MC1R*) mRNA, complete cds

GenBank: MW587027.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

```
LOCUS      MW587027      954 bp      mRNA      linear      MAM 06-MAR-2021
DEFINITION  Vicugna pacos isolate Alpaca 3 melanocortin 1 receptor
(MC1R) mRNA, complete cds.
ACCESSION  MW587027
VERSION    MW587027.1
KEYWORDS
SOURCE      Vicugna pacos (alpaca)
ORGANISM    Vicugna pacos
              Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Artiodactyla;
Tylopoda; Camelidae; Vicugna.
REFERENCE   1 (bases 1 to 954)
AUTHORS     Pinares,R., Cruz,A., Daverio,M.S., Gutierrez,J.P., Ponce De
Leon,F.A., Wurzinger,M., Di Rocco,F. and Gutierrez,G.A.
TITLE       Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the MC1R gene in
black and brown alpacas
JOURNAL     Rev Peru Biol 28 (1) (2021)
REMARK      Publication Status: Available-Online prior to print
REFERENCE   2 (bases 1 to 954)
AUTHORS     Pinares,R.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (04-FEB-2021) Produccion Animal, Universidad
Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina s/n, Lima 12, Peru

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..954
                       /organism="Vicugna pacos"
                       /mol_type="mRNA"
                       /isolate="Alpaca 3"
                       /db_xref="taxon:30538"
     gene              1..954
                       /gene="MC1R"
     CDS              1..954
                       /gene="MC1R"
                       /note="MC1R*black; controls which type of melanin
is produced by melanocytes"
```

```
/codon_start=1
/product="melanocortin 1 receptor"

/protein_id="QSG01070.1"
```

```
/translation="MPVLGPQRRLGSLNSTPQATTHLGLATNQTGPQCLEVSVPDGL
FLSLGLVSLVENVLVVAAITKNRNLHSPMYFYFICCLAASDLLMSMSNVLETAVMLLLE
AGALATWATVVQQLDNVMDVLISSMVSSLCSLGAIAMDYRISIFYALRYHSIVTLPR
AWRAIAAIWVASVLSSTLFITYYDHTAVLLCLVSVFFVAMLALMAVLYVHMLARACQHA
RGIAQLHKRQRPIHQGFGLKGVATLTILLGIFFLCWGPFPLHLFLIVLCPQHPTCGCI
FKNFNLFALALICNSIVDPLIYAFRSQELRKTLEVLQCSW"
```

ORIGIN

```
1 atgctgtgc tcggcccca gaggaggctg ctgggctccc tcaactccac cccccaagcc
61 accaccacc tcggactggc caccaaccag acggggcccc agtgcctgga ggtgtctgtt
121 cccgatgggc tgttcctcag cctggggctg gtgagcctcg tggagaacgt gctgggtggtg
181 gctgcatca ccaagaaccg caacctgcat tctcccatgt attacttcat ctgctgcctg
241 gccgcgtcgg acctgctgat gagcatgagc aacgtgctgg agacggccgt catgctgctg
301 ctggaggctg gcgccctggc cacatgggct acgggtggtg agcagctgga caatgtcatg
361 gatgtgctca tctgcagctc catggtgtcc agcctctgct ctctgggtgc tatcgccgtg
421 gaccgctaca tctccatctt ctatgactg cgctaccaca gcatcgtgac gctgcctcgg
481 gcatggcggg ccatcgcggc catctgggtg gccagcgtcc tctccagcac cctcttcatc
541 acctactatg atcacacagc cgtcctcctc tgtctcgtca gcttttttgt agccatgctg
601 gcgctcatgg cggtgctgta tgtccacatg ctggcccggg cgtgccagca tgcccggggc
661 atgcccagc tccacaagag acagcgcgcc atccaccagg gctttggcct caagggcgtg
721 gccacgctca ccatcctgct gggcatctt ttcctctgct gggggccctt cttcctgcac
781 cttttctca tcgtcctctg tcctcagcac cccacctgtg gctgcatctt caagaattt
841 aacctcttc ttgccctcat catctgcaac tccatcgtgg acccctcat ctatgcctt
901 cgcagccagg agctccgga gacactccag gaggtgctgc agtgctcctg gtga
```

//