

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO DEL ORIGEN Y RELACIONES GENÉTICAS  
DE LA OVEJA CRIOLLA MEXICANA (*Ovis aries*)  
MEDIANTE LA SECUENCIACIÓN DEL ADN  
MITOCONDRIAL**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**P R E S E N T A**  
**DALILA CAROLINA DE ASCENCAO RODRÍGUEZ**

**TUTOR:**  
**ROGELIO A. ALONSO MORALES**

**COMITÉ TUTORAL:**  
**RAÚL ULLOA ARVIZU**  
**LUIS EGUIARTE FRUNS**



**MÉXICO, D.F.**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## DECLARACIÓN

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

  
M.V. DALILA CAROLINA DE ASCENCAO RODRÍGUEZ

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: DALILA CAROLINA DE ASCENCAO RODRIGUEZ

FECHA: 01/04/2004

FIRMA: Dalila Ascencao



## DEDICATORIA

A Dios, por colmarme de tantas bendiciones y por haberme dado la gran fuerza de voluntad para alcanzar esta meta en mi vida.... gracias Señor.

A mis padres, Rosa y Juan, por haberme concebido y a quienes les debo todo lo que soy... gracias por ser mis padres, los amo.

A mi amado Fernando, quien con su amor, apoyo y comprensión me dio fortaleza para culminar esta importante faceta.... gracias por ser parte de mi vida, te amo.

A mis hermanos Cándida, Arturo, Juan Carlos y Rosa María.... aún en la distancia han sido un gran apoyo para mi y lo seguirán siendo, los amo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Refugio Cortés, Noé Reyes, Felicitas Vázquez, Raúl Ulloa, Belem Huerta, Addi Oropeza, Cristina López, Silvia Reyes, David Reynoso, Simone Iwabe, Mario Espinosa, Espiridión Ramos y Alejandro Valdez. Gracias a todos por los buenos momentos y por haberme brindado su apoyo y amistad.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales, por todo su apoyo y ayuda para la culminación de este bonito y novedoso proyecto de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A la secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México, por el importante apoyo financiero para la realización y culminación de mis estudios de maestría.

Al Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado el espacio y proporcionado los recursos para cubrir las necesidades experimentales de mi proyecto.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales por haberme dado la oportunidad de estar dentro de su equipo de trabajo, por todo su apoyo académico y gran colaboración, por haber dirigido mi tesis y siempre estar atento de mi trabajo.... muchísimas gracias.

A los Doctores Raúl Ulloa Arvizu y Luis Eguiarte Fruns, por su ayuda y asesoramiento como parte de mi comité tutorial.

A los Doctores, Raúl Perezgrovas Garza de la Universidad Autónoma de Chiapas, José Solís Ramírez de la Universidad Autónoma de Chapingo, Adán Reygadas Casas y Maximino Méndez Mendoza de la Universidad Autónoma de Puebla, Antonio Hernández Ortiz y Alberto Ríos Torres del CEIEPO; a las comunidades de Coajumulco en el Estado de Morelos, Tepexi de Rodríguez y Huacalzingo del Estado de Puebla. A todos muchísimas gracias por su valiosa ayuda y colaboración para la recolección de muestras.

A la Dra. Refugio Cortés por toda su ayuda técnica, sus enseñanzas y también por ser una gran y valiosa amiga.... mil gracias.

Al Biol. Noé Reyes por siempre estar allí para ayudar, orientar y compartir sus conocimientos.... gracias Noé por tu apoyo y sincera amistad.

A la Dra. Patricia de La Torre por su importante participación en las tareas de secuenciación, y a la Biol. Amanda Castillo por su amable orientación para la realización de los análisis de variación genética.

## RESUMEN

El origen y relaciones genéticas de la oveja criolla mexicana (OCM) fueron investigados mediante el análisis de la secuencia completa del *D-Loop* mitocondrial (1180 pb). El fragmento de ADN fue amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciado en 33 OCM procedentes de los estados de Chiapas (10), Puebla (10), Morelos (3), Hidalgo y Veracruz (10). Las 33 secuencias obtenidas fueron identificadas como ADN mitocondrial (ADNmt) europeo o haplogrupo B, mediante análisis de PCR-RFLP's del gen Citocromo Oxidasa I (COI). El alineamiento de las secuencias reveló 21 haplotipos diferentes. El análisis filogenético entre los haplotipos encontrados en OCM y los haplotipos previamente reportados en ovejas de razas comerciales de origen europeo (GenBank) identificó 53 haplotipos diferentes incluidos los de OCM, los cuales no habían sido reportados anteriormente. El análisis incorporando secuencias previamente reportadas del *D-Loop* (GenBank) en ovejas de orígenes europeo y asiático, además de las ovejas silvestres muflón (*O. musimon*), urial (*O. vignei arkal*, *O. v. bocharensis*), argali (*O. ammon ammon*, *O. a. darwini*, *O. a. collium*, *O. a. nigrimontana*) y cimarrón (*O. canadensis canadensis*), reveló dos linajes de ascendencia materna: el linaje asiático y el linaje europeo. Todas las OCM estudiadas se incluyeron dentro del linaje europeo, formando un grupo claramente separado y divergente del resto de ovejas europeas. Los valores de  $\pi$  ( $0.02001 \pm 0.00143$ ) y  $\theta$  ( $0.02488 \pm 0.00664$ ) para las subpoblaciones de *Ovis aries* sugieren selección purificadora. Se observó mayor diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) en ovejas europeas ( $0.00946 \pm 0.00052$ ), seguida por las asiáticas ( $0.00686 \pm 0.00105$ ) y OCM ( $0.00378 \pm 0.00060$ ); contribuyendo en 47 %, 34 % y 19 % respectivamente, a la diversidad genética estudiada de *O. aries*. Los datos obtenidos en este estudio muestran el origen europeo de la OCM y la existencia de una alta diversidad genética, con probabilidades potenciales de contener alelos únicos e importantes para su estudio zootécnico y científico. Por tanto, representa un reservorio de biodiversidad que eventualmente podría evaluarse y preservarse como fuente de nuevos alelos para el enriquecimiento de poblaciones comerciales y para la selección, mejora y creación de líneas mexicanas nativas.

**Palabras clave:** oveja criolla (*Ovis aries*), ADN mitocondrial, *D-Loop*, diversidad genética.

## ABSTRACT

The origin and genetics relationships of the Mexican Creole Sheep were investigated by DNA sequence analysis of mitochondrial control region (*D-Loop*). A segment of 1180 pb was amplified by Polymerase Chain Reaction and sequenced from 33 Mexican Creole Sheeps DNA collected from 5 states of the republic. The obtained sequences were identified as European mitochondrial DNA or type B, by PCR-RFLP's analysis of the Cytochrome C Oxidase subunit I gene (COI). DNA sequence analysis revealed 21 different haplotypes. Phylogenetic analysis including mitochondrial DNA sequence information of european sheep breeds (GenBank), identified 53 different haplotypes included those of Mexican Creole Sheeps, those which had been reported previously. The analysis incorporating sequences previously reported (GenBank) of ewes of European and Asian origin, besides the wild sheeps muflon (*O. musimon*), urial (*O. vignei arkal*, *O. v. boharensis*), argali (*O. ammon ammon*, *O. a. darwini*, *O. a. collium*, *O. a. nigrimontana*) and bighorn (*O. canadensis canadensis*), revealed two lineages of maternal ancestry: the Asian lineage and the European lineage. All the Mexican Creole Sheep populations were included in the European lineage, forming a group clearly separate and divergent of the remainder European ewes. The values of  $\pi$  ( $0.02001 \pm 0.00143$ ) and  $\theta$  ( $0.02488 \pm 0.00664$ ) for *Ovis aries* subpopulations suggest purifying selection. The major nucleotide diversity ( $\pi$ ) was observed in European ewes ( $0.00946 \pm 0.00564$ ), continued for Asian ( $0.00686 \pm 0.00105$ ) and Mexican Creole Sheep ( $0.00378 \pm 0.00060$ ); contributing in 47 %, 34 % and 19 % respectively, to *O. aries* studied genetic diversity. This data show the European origin of the Mexican Creole Sheep and the significant level of the genetic diversity in this populations, which did not participate in the foundation of the modern sheep breeds. We concluded that the Mexican Creole Sheep populations represents a reservoir of genetic diversity that is important to evaluate and preserved as a source of novel alleles for the improvement of the commercial populations and selection, progress and creation of native mexican lines.

**Key words:** Creole sheep (*Ovis aries*), Mitochondrial DNA, *D-Loop*, Genetic Diversity.

# INDICE

	Página
Declaración.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Indice de cuadros.....	ix
Indice de figuras.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1.1. Origen.....	2
1.1.2. Distribución.....	3
1.1.3. Conservación.....	4
1.1.4. Diversidad Genética.....	5
1.1.5. Análisis Filogenéticos.....	12
1.1.6. Justificación.....	18
1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
1.2.1. Hipótesis.....	20
1.2.2. Objetivos.....	20
1.3. METAS.....	21
II. MATERIALES Y METODOS.....	22
2.1. PCR-RFLP's (Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción) del gen COI.....	22
2.1.1. Material biológico.....	22
2.1.2. Purificación de ADN total.....	23
2.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23
2.1.4. Digestión de productos de PCR.....	24
2.1.5. Análisis de PCR-RFLP's.....	24
2.2. SECUENCIACIÓN DEL <i>D-LOOP</i> .....	24
2.2.1. Material Biológico.....	24
2.2.2. Purificación de ADN total.....	24
2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	25
2.2.4. Purificación de fragmentos amplificados.....	26
2.2.4. Obtención de la secuencia.....	26
2.2.5. Análisis de secuencias.....	27
2.2.6. Identificación de haplotipos.....	27
2.2.7. Análisis filogenéticos.....	28
III. RESULTADOS.....	30
3.1. PURIFICACIÓN DEL ADN TOTAL.....	30
3.2. PCR-RFLP's.....	30
3.2.1. Amplificación del gen COI.....	30

3.2.2. Análisis de PCR-RFLP's.....	31
3.3. SECUENCIACIÓN DEL <i>D-LOOP</i> .....	32
3.3.1. Amplificación y purificación del <i>D-Loop</i> .....	32
3.3.2. Secuenciación de fragmentos amplificados.....	33
3.3.3. Análisis filogenéticos de las variedades de oveja criolla mexicana.....	34
IV. DISCUSIÓN.....	51
V. CONCLUSIONES.....	57
VI. LITERATURA CITADA.....	59
VII. ANEXOS.....	65
<i>Anexo 1:</i> Purificación de ADN total a partir de sangre periférica.....	65
<i>Anexo 2:</i> Preparación de geles de agarosa.....	66
<i>Anexo 3:</i> Cuantificación de ADN.....	67
<i>Anexo 4:</i> Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del <i>D-Loop</i> ovino.....	68
<i>Anexo 5:</i> Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	69
<i>Anexo 6:</i> Reacción de secuencia.....	70
<i>Anexo 7:</i> Filtrado de secuencias en columnas de sephadex G50.....	71
<i>Anexo 8:</i> Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del gen COI.....	72
<i>Anexo 9:</i> Protocolo de digestión de productos de PCR gen COI (PCR-FLP's).....	73
<i>Anexo 10:</i> Números de acceso al GenBank para los haplotipos identificados en oveja criolla mexicana.....	74
<i>Anexo 11:</i> Ubicación de primers internos diseñados para secuenciación del <i>D-Loop</i> de <i>Ovis aries</i> .....	75
<i>Anexo 12:</i> Alineamiento de las posiciones nucleotídicas variables en el <i>D-Loop</i> de ovejas domésticas del haplogrupo Europeo.....	76
<i>Anexo 13:</i> Distancias genéticas promedio dentro y entre grupos del género <i>Ovis</i> .....	77

## INDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.1.1.</b> Descripción de los tres principales fenotipos observados en el borrego de Chiapas....	2
<b>Cuadro 2.1.1.</b> Procedencia de las muestras.....	22
<b>Cuadro 2.2.1.</b> Muestras seleccionadas para secuenciación.....	25
<b>Cuadro 2.2.2.</b> Primers utilizados en la reacción de secuenciación.....	26
<b>Cuadro 3.3.1.</b> Identificación de muestras secuenciadas.....	34
<b>Cuadro 3.3.2.</b> Haplotipos y sitios polimórficos presentes en el <i>D-Loop</i> de las variedades de oveja criolla mexicanas estudiadas.....	35
<b>Cuadro 3.3.3.</b> Distribución de los haplotipos del <i>D-Loop</i> identificados en oveja criolla mexicana....	36
<b>Cuadro 3.3.4.</b> Sustituciones nucleotídicas observadas en el <i>D-Loop</i> de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas.....	37
<b>Cuadro 3.3.5.</b> Ubicación de la región más polimórfica dentro de la secuencia del <i>D-Loop</i> en oveja criolla mexicana.....	38
<b>Cuadro 3.3.6.</b> Porcentaje de divergencia nucleotídica y número absoluto de diferencias de nucleótidos por alineamiento comparativo entre los 21 haplotipos identificados en el <i>D-Loop</i> de oveja criolla mexicana.....	39
<b>Cuadro 3.3.7.</b> Sitios polimórficos presentes en el <i>D-Loop</i> de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas con relación a la secuencia de oveja Kivircik.....	40
<b>Cuadro 3.3.8.</b> Sustituciones nucleotídicas observadas en el <i>D-Loop</i> de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas con relación a la secuencia de oveja Kivircik.....	41
<b>Cuadro 3.3.9.</b> Sitios polimórficos observados en el <i>D-Loop</i> de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas y ovejas de razas comerciales de origen europeo.....	42
<b>Cuadro 3.3.10.</b> Haplotipos presentes en el <i>D-Loop</i> de ovejas criollas mexicanas y ovejas de razas comerciales de origen europeo.....	43
<b>Cuadro 3.3.11.</b> Distancias genéticas promedio dentro y entre grupos.....	49

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.1.1.</b> Relaciones filogenéticas entre especies del género <i>Ovis</i> .....	11
<b>Figura 3.1.1.</b> Integridad del ADN total.....	30
<b>Figura 3.2.1.</b> Amplificación del gen COI.....	30
<b>Figura 3.2.2.</b> Productos de PCR gen COI digeridos con HinfI: haplogrupo europeo.....	31
<b>Figura 3.2.3.</b> Productos de PCR gen COI digeridos con HinfI: haplogrupo europeo y asiático.....	31
<b>Figura 3.3.1.</b> Amplificación del <i>D-Loop</i> ovino.....	32
<b>Figura 3.3.2.</b> Purificación del <i>D-Loop</i> ovino.....	32
<b>Figura 3.3.3.</b> Evaluación de fragmentos purificados.....	33
<b>Figura 3.3.4.</b> Mapa del empalme de secuencias.....	33
<b>Figura 3.3.5.</b> Distribución de sitios polimórficos (S) en la secuencia completa del <i>D-Loop</i> en ovejas criollas mexicanas.....	38
<b>Figura 3.3.6.</b> Relaciones filogenéticas de ovejas criollas mexicanas con ovejas del Haplogrupo europeo.....	46
<b>Figura 3.3.7.</b> Relaciones filogenéticas entre ovejas del linaje europeo (incluyendo oveja criolla mexicana) y ovejas del linaje asiático.....	47
<b>Figura 3.3.8.</b> Relaciones filogenéticas entre ovejas de linajes europeo (incluyendo oveja criolla mexicana), asiático y ovejas silvestres.....	48



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. MARCO TEÓRICO.

La generación de razas ovinas es un proceso dinámico, ya que derivan de ancestros provenientes de diversas regiones geográficas. Desde el punto de vista histórico es evidente la ascendencia española de la oveja criolla mexicana (*Ovis aries*), y a su vez las razas autóctonas de ovejas ibéricas descienden de otras razas ovinas provenientes de troncos primitivos ancestrales e introducidas en el mediterráneo durante el desarrollo de esas culturas (ver 1.1.1)

Según datos de la FAO (2002), la oveja criolla mexicana se conoce también localmente como “Chusco” y está considerada como una raza local. Su estado actual es de domesticación, explotándose principalmente en tierras altas del país. Su principal uso es para alimentación (carne) y obtención de fibra (lana). El peso vivo de los machos adultos es de 32.8 kg promedio, y en las hembras adultas es de 26.1 kg promedio. Son animales multicolores (negro, blanco multicolor: overo negro y blanco) productores de lana de tipo tosca/alfombra y altamente resistentes a endoparásitos. Desde el punto de vista reproductivo, su prolificidad es baja pero son de elevada fertilidad, con un tamaño promedio de camada de 1.02. La producción de vellón es de 1.06 kg/año promedio. La misma fuente menciona una variedad conocida como oveja “Lucero”, encontrándose hacia el sur del país, en zonas montañosas. Son animales productores de lana, de color negro, pudiendo presentar una mancha blanca en la cabeza. La oveja “Tarhumara” se menciona igualmente como una variedad de la oveja criolla.

La especie ovina tiene una gran importancia socioeconómica en muchos países. Se ha estimado que en México, alrededor de 5,000 productores a nivel nacional se dedican a la cría de ovinos, aunque únicamente el 34 % de ellos vive totalmente de esta especie. Por otra parte, aproximadamente 120,000 artesanos trabajan la lana (Medrano, 2000).

La variedad criolla de la oveja mexicana más estudiada (fenotípicamente) hasta hoy es el borrego de Chiapas. Esta variedad, descendiente de las razas autóctonas españolas Churra, Manchega, Lacha, Rasa Aragonesa, Castellana y Canaria entre otras (Perezgrovas, 1990), posee características fenotípicas que la hacen única, ya que a través de varios siglos de adaptación ha logrado sobrevivir bajo condiciones extremas. El estudio de las características externas y morfológicas de este borrego identificó ocho grupos fenotípicos (Sarmiento y Perezgrovas, 1990), de los cuales los más importantes son las variedades blanca (fenotipo 1), negra (fenotipo 2) y café (fenotipo 3) (Cuadro 1.1.1).

**Cuadro 1.1.1.** Descripción de los tres principales fenotipos observados en el borrego de Chiapas

Fenotipo	Color <sup>1</sup>	Peso <sup>2</sup> (kg)	Alzada <sup>2</sup> (cm)	Vellón	Características generales
1	Blanco con manchas definidas de color negro alrededor de ojos, hocico, ollares y parte distal de las orejas. En extremidades pueden presentarse manchas o punteado negro.	27.8	59.8	Largo y grueso, con mechones definidos.	Tamaño mediano, bien proporcionados. Cara y extremidades desprovistas de lana. Perfil subconvexo, machos pueden presentar cuernos. Orejas medianas con inserción horizontal. Tronco largo con línea dorso-lumbar ascendente hacia la grupa. Extremidades delgadas.
2	Negro uniforme con un mechón de lana blanca en la parte alta de la frente y en el extremo distal de la cola.	28.0	60.2	Largo y grueso formando mechones.	Tamaño mediano, bien proporcionados. Cara y extremidades desprovistas de lana. Perfil subconvexo, machos pueden presentar cuernos. Tronco largo con línea dorso-lumbar plana. Extremidades largas y cañas fuertes.
3	Del amarillo claro al café oscuro. En el dorso es de color cremoso, con mezclas de fibras cafés o negras, mencionándose también tonalidades grises.	25.3	58.4	Partido en la región del dorso.	Ligeros, de tamaño medio o pequeño, pero bien proporcionados. Perfil recto o subconvexo, tanto machos como hembras pueden presentar cuernos. Línea dorso-lumbar ligeramente ascendente hacia la grupa. Extremidades finas pero fuertes.

<sup>1</sup> piel y vellón. <sup>2</sup> promedio en animales adultos .

Fuente: Sarmiento y Perezgrovas, 1990.

La caracterización fenotípica del borrego criollo de Chiapas relaciona a la variedad blanca con la raza Churra española, y a la variedad café con la raza Lacha. La variedad negra tiene características que sugieren su parentesco con la raza Castellana y otros que indican la influencia de la Manchega y la Canaria (Sarmiento y Perezgrovas, 1990). Estos tres fenotipos conforman el 57 % de los borregos criollos representantes en Chiapas (Blanco 17 %, negro 27 % y café 13 %). Los restantes 5 fenotipos probablemente se hayan formado a través del cruzamiento de los tres fenotipos anteriores o en combinación con algunas otras razas autóctonas españolas (Perezgrovas, 1990).

### 1.1.1. Origen

Las ovejas del continente americano tienen su origen en las razas europeas introducidas poco después de los viajes de conquista y colonización, desde principios del siglo XVI. Es posible que durante los primeros viajes al nuevo mundo las ovejas no fueran traídas con el objeto de introducirlas, sino como abastecimiento para la tripulación de las naves y para los conquistadores. Estas eran embarcadas en los puertos de Sevilla y Cádiz o en los

reabastecimientos de las Islas Canarias (España). Las ovejas que lograron resistir las grandes travesías de aproximadamente 124 días pudieron reproducirse en las islas de Cuba, Santo Domingo, San Juan de Borinquen y Jamaica, de donde pasaron a tierra firme durante la conquista y los primeros años de la colonia (Saucedo, 1984). Desafortunadamente, no existen registros del número ni del tipo de ovinos introducidos para la época, debido a que se consideraban de muy poca importancia económica.

Martínez (1983) indica la entrada de ovejas españolas a México entre 1493 y 1539, mientras Matesanz (1965) refiere que esto sucedió poco después de la conquista, por lo menos desde 1525, pues el cabildo de la ciudad concedió las primeras estancias laneras a varios conquistadores desde noviembre de 1526. Sin embargo, está documentado que en 1521 el Virrey Gregorio López introdujo un lote de borregos a playas mexicanas. Posteriormente se llevaron a cabo otras importaciones, trayendo animales del mismo origen español: Merino, Lacha y Churra, de raza fina el primero y de vellones y fibras gruesas los segundos. Las reseñas históricas ponen énfasis únicamente en estas razas, pero existe la posibilidad de que otras razas autóctonas fueran embarcadas, tales como la Manchega, la Castellana y la Rasa de Aragón. La raza Canaria es también de participación posible debido al reabastecimiento de las naves en el archipiélago de Las Canarias, pudiendo facilitar su salida (Saucedo, 1984; Perezgrovas, 1990; Medrano, 2000).

Se sugieren tres rutas principales de introducción de ovejas a México: 1. A través del puerto de Veracruz (Villa Rica de la Vera Cruz), en donde según Gómez (1978) desembarcaban ovejas Merino, Churra y Lacha, que luego eran transportadas al centro y norte del país; 2. A través de la península de Yucatán, donde está reportado que para el año 1527 Francisco de Montejo introduce ovinos (Gómez, 1978); 3. La ruta Honduras-Guatemala-México, en donde se realizaba el reabastecimiento de las naves españolas que se dirigían hacia América del Sur, en el Puerto de Caballos (hoy Punta Caballos). Existen reportes de introducción de ovinos a Centroamérica en 1521 (Ryder, 1983) y 1530 (Villacorta, 1942; McLeod, 1973).

Con todas las influencias raciales españolas, el país se fue poblando y ya en 1910 gran parte del territorio contaba con variedades de ovejas criollas descendientes de las razas españolas traídas originalmente (Saucedo, 1984).

### **1.1.2. Distribución**

Generalmente las explotaciones ovinas se localizan en las zonas altas de la topografía mexicana, aunque no se encontró ninguna revisión detallada sobre la distribución actual en relación con los diferentes estados del país. En el informe sobre la Situación de los

Recursos Genéticos Pecuarios (RGP) de México (SAGARPA, 2002), se indica la presencia de ovinos criollos en las regiones semiáridas y templadas del país, apuntando los estados de Chiapas, Chihuahua, Oaxaca, Puebla y Veracruz. Según Medrano (2000), el inventario nacional de ovinos cuenta con seis millones de cabezas, siendo la mayoría de tipo criollo y solamente un porcentaje pequeño es de razas definidas.

### 1.1.3. Conservación

En las últimas décadas ha ocurrido la entrada masiva de animales provenientes de otros países, principalmente Australia y Estados Unidos, promovida por programas gubernamentales con el propósito de incrementar la producción de carne y lana para satisfacer el mercado nacional, importando en 1997 trescientos mil ovinos vivos para repoblación (Medrano, 2000). En la importación de razas exóticas, estas son comercializadas como pie de cría para la cruce con ovinos de variedades criollas o de otras razas y producir animales para el abasto. Sin embargo, los animales producto de estas cruces también son empleados como sementales para “mejorar” los rebaños criollos, lo cual es muy cuestionable. Actualmente, existen 19 razas comerciales de ovinos en el país, de las cuales la Hampshire, Pelibuey y Suffolk son las más usadas. La Rambouillet se considera como moderadamente usada y las 15 restantes (Black Belly, Columbia, Dorper, Dorset, Katahdin, Merino, Poly Pay, Romanov, Saint Croix, Ile de France, Charolais, East Friesian, Texel y Corriedale) son poco usadas (SAGARPA, 2002).

La principal razón para la conservación de la oveja criolla es que sin una intervención apropiada, estas podrían perder la flexibilidad para adaptarse a circunstancias cambiantes (enfermedades, demandas del mercado, etc.) y poner en riesgo su sobrevivencia. Según el sistema de información de la diversidad en animales domésticos (DAD-IS) de la FAO (2002), no se han realizado planes de conservación *in situ* ni *ex situ* (semen y/o embriones). Sin embargo, Medrano (2000) ha reportado algunos proyectos que se están ejecutando actualmente en el borrego de Chiapas, tales como la conservación de gametos y desarrollo de pruebas de laboratorio para predecir la fertilidad del semen congelado, entre otros.

En el último análisis de la FAO (2002) se indica que por lo menos una tercera parte de las especies domésticas de las que se cuenta con datos precisos sobre su población -un total de 1,350-, corre peligro de extinción. De 199 se ha confirmado oficialmente su extinción y hay otras 620 registradas en esta misma condición, entre las cuales se cita el borrego criollo de Chiapas.

En cuanto a las acciones de conservación y utilización de la oveja criolla, realizadas por el Instituto de Investigaciones Indígenas de la Universidad Autónoma de Chiapas y la

Universidad Nacional Autónoma de México, se cuenta desde 1992 con un rebaño que funciona como núcleo abierto de selección en donde se aplican criterios de selección y se definen los animales que servirán como progenitores para su distribución en las comunidades indígenas (SAGARPA, 2002).

#### **1.1.4. Diversidad Genética**

La diversidad genética se describe como la variación en la constitución genética existente entre y dentro de poblaciones, debido a cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN por mutaciones tales como: deleciones, inserciones, inversiones o translocaciones. La FAO (2002) define la diversidad genética animal como la variabilidad genética de los diferentes tipos de recursos animales a nivel de especies, razas y genes, de los que se deben conservar tantos alelos o variantes como sea posible. En términos más amplios, la biodiversidad es definida como la variedad de todas las formas de vida, el papel ecológico que ellas realizan y la diversidad genética que contienen (Erlich and Wilson, 1991).

El estudio genético de poblaciones se basa en conocer la variación genética, siendo las técnicas en biología molecular las que permiten utilizar gran cantidad de recursos metodológicos para evaluar el grado de diversidad y las distancias genéticas presentes dentro y entre poblaciones determinadas (Kirby, 1995). En principio, cualquier gen que muestre polimorfismo (dos o más alelos) se puede utilizar como referencia de la diversidad en estudios de conservación genética. A los diferentes genes se les denomina marcadores genéticos, los cuales son factores hereditarios generalmente polimórficos (presencia de dos o más variantes –alelos- de cualquier sistema de genes) (Peñalosa, 1994).

Los marcadores genéticos pueden ser morfológicos o moleculares. Los morfológicos se basan en las características fenotípicas del organismo como: tamaño, color, forma, etc. Desafortunadamente, estos marcadores son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar el efecto del gen o genes de interés. Además, es frecuente observar epistasis, es decir, que un gen puede enmascarar la acción de otro gen. Los marcadores moleculares tienen ventajas sobre los marcadores morfológicos ya que no son afectados por condiciones ambientales y pueden presentar codominancia (algunos son dominantes), permitiendo así la identificación de todos los posibles genotipos. Estos se dividen en dos tipos: marcadores proteicos y marcadores de ADN (Kirby, 1995).

Los marcadores proteicos se basan en el análisis de distintos tipos de proteínas. Los cambios en la composición de aminoácidos y como consecuencia en la estructura, alteran la movilidad electroforética de la proteína, lo que permite observar el polimorfismo. La desventaja de estos marcadores es que requieren procedimientos de extracción y tinción



específicas para cada sistema enzimático, además, el número de marcadores que se obtiene es insuficiente porque presentan poco polimorfismo (Kirby, 1995).

Entre los marcadores de ADN se encuentran los RFLP's ("Restriction Fragment Length Polymorphisms") nucleares o mitocondriales, los minisatélites o VNTR ("Variable Number Tandem Repeat"), los microsátélites o STR's ("Short Tandem Repeats"), los RAPDS ("Random Amplified Polymorphic DNA Sequence"), los AFLP's ("Amplified Fragment Length Polymorphisms") y dentro del ADN mitocondrial (ADNmt) la región control o "*D-Loop*". La variación natural de estos marcadores se puede detectar por medio de enzimas de restricción, amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR ("Polymerase Chain Reaction") y secuenciación directa de los nucleótidos del ADN (Kirby, 1995).

Los RFLP's involucran la purificación del ADN de un individuo y su digestión con enzimas de restricción, formando una mezcla de fragmentos que difieren en longitud debido a la distribución específica de los sitios de corte, los cuales son separados de acuerdo con su tamaño por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. El análisis de los fragmentos se lleva a cabo mediante la técnica denominada "Southern blot", que consiste en transferir los fragmentos del gel a un filtro de nitrocelulosa que posteriormente es hibridizado con una sonda radiactiva (fragmento de ADN marcado) la cual reconocerá secuencias complementarias al ADN que ha sido transferido al filtro. Los fragmentos reconocidos por la sonda son visualizados por medio de una autorradiografía (Griffiths *et al.*, 2000) Actualmente los RFLP's también se analizan por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-RFLP's).

Los minisatélites y microsátélites son secuencias de ADN altamente repetidas de baja complejidad, organizadas en tandem y dispersas en todo el genoma. Se caracterizan por presentar un extenso polimorfismo genético debido a la variación en el número de repetidos presentes, por eso son también conocidos como variantes en el número de repetidos en tandem (VNTR). La unidad de repetición en los minisatélites es de 9-64 pares de bases (pb), que llegan a extenderse por varios kilobases (kb) y su polimorfismo se revela mediante experimentos tipo Southern. Muchas veces, al utilizar los minisatélites como sonda, se generan bandas sumamente polimórficas que en conjunto forman patrones exclusivos de un individuo, a lo que se le ha denominado huellas digitales del ADN o "DNA fingerprints". En los microsátélites, la unidad de repetición es de 1-5 pb y llegan a extenderse por regiones no mayores a 200 pb. Al igual que los minisatélites, cuando los microsátélites se emplean como sondas revelan patrones tipo "fingerprints". También el polimorfismo de los microsátélites se puede detectar fácilmente por PCR, donde se observa la variación de los repetidos dentro de una población (Kirby, 1995).

Los RAPDS se basan en la técnica de PCR en donde se utilizan pequeños iniciadores (10 pb) que amplifican fragmentos al azar a partir del genoma completo de un organismo. Posteriormente, los fragmentos amplificados son separados por electroforesis en geles de agarosa o de acrilamida. El polimorfismo se determina por la presencia o ausencia y tamaño variable de los fragmentos amplificados (Kirby, 1995).

Los AFLP's están basados en la amplificación selectiva por PCR, de fragmentos de restricción a partir de ADN genómico mediante tres pasos: digestión del ADN con dos enzimas de restricción distintas, ligamiento (DNA ligasa) de adaptadores oligonucleótidos (secuencias cortas de unos 20 nt de doble cadena sintetizadas *in vitro*) a los extremos de los fragmentos producidos y amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante PCR. Tras el análisis de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se obtienen patrones de bandas complejos pero repetibles de un experimento a otro. En esta técnica, la PCR es específica e independiente de la concentración de ADN molde y se eliminan los problemas de repetibilidad que presentan los RAPDS. Los polimorfismos que se detectan corresponden a mutaciones puntuales, inserciones o deleciones que afectan a blancos de restricción. Se manifiestan como ausencia o presencia de bandas por lo que son marcadores dominantes y por tanto, son menos informativos para ser usados en análisis de ligamiento que los marcadores codominantes (Griffiths *et al.*, 2000).

Otro marcador molecular sumamente útil es el ADNmt, localizado en el compartimiento matricial de la mitocondria. En el caso de mamíferos, es una molécula circular de aproximadamente 16.5 Kb y de doble cadena, una conocida como la cadena pesada (H), la cual es rica en purinas y la otra es la cadena ligera (L), conformada principalmente de pirimidinas (Darnell, 1980; Karp, 1987; Rus, 1993).

El ADNmt se hereda de forma materna y no sufre recombinación genética, por consiguiente todos los descendientes de una hembra heredan la misma molécula, estableciéndose un linaje materno que permite trazar el posible origen de los individuos y de poblaciones animales (Huchinson *et al.*, 1974). Por otro lado, la tasa de sustitución nucleotídica es de 5 a 10 veces más rápida que la del ADN nuclear. En mamíferos se ha encontrado una tasa de divergencia de aproximadamente 2 % por millón de años, correspondiente a una sustitución nucleotídica de  $1 \times 10^{-8}$  sustituciones/sitio/año en cada linaje (Brown *et al.*, 1979), lo que incrementa el nivel de cambios en la secuencia nucleotídica. Estos parámetros son útiles para el estudio de diversidad genética en poblaciones (Watanobe *et al.*, 1985, 1986; Lan and Shi, 1993).

El genoma de la mitocondria se divide principalmente en dos regiones, una región larga y una corta. Dentro de la región larga se encuentran genes que codifican proteínas

involucradas en la fosforilación oxidativa, tales como: 3 subunidades de la citocromo C oxidasa (COI, CO2, CO3), subunidades 6 y 8 del complejo ATPasa, 7 subunidades para la NADH deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) y el gen citocromo B. También contiene dos genes de ARN ribosomal (ARNr 12S y 16S) y 22 de ARN de transferencia (ARNt). La región corta es conocida como región control o "*D-Loop*", la cual contiene secuencias que controlan los mecanismos tanto de replicación como de transcripción y es típicamente la región más variable (casi 10 veces mayor que el resto de la molécula) del ADNmt (Awise, 1994).

Los estudios iniciales utilizando ADNmt ovino se basaron en análisis mediante el empleo de enzimas de restricción, tanto de tipo comparativo (Upholt and Dawid, 1977; Chen y Leibenguth, 1995) como de caracterización (Villalta *et al.*, 1992).

La región *D-Loop* presenta una elevada variación específica, de gran utilidad para establecer el origen de las especies. Murray *et al.* (1995) analizaron esta variación en especies de ungulados a través de PCR-RFLP's. Entre las especies estudiadas se encontraban ovejas (*Ovis canadensis*, *O. dalli*, *O. aries* y *O. musimon*), cabras (*Oreamnos americanus* y *Capra hircus*), bovinos (*Bos taurus*) y bisonte (*Bison bison*).

Al analizar la filogenia mediante el empleo de ADNmt de especies domésticas tales como bovinos, ovinos, porcinos y búfalo (MacHugh and Bradley, 2001) la característica más notoria es que las secuencias invariablemente se distribuyen dentro de dos grupos separados por una rama interna dominante. Una segunda característica importante es que, en cada caso, los dos clusters tienen una tendencia a estar geográficamente distribuidos en dirección este-oeste. La divergencia cuantitativa entre cada par de clusters combinados con sus separaciones geográficas este-oeste apoyan fuertemente al menos dos centros de domesticación para estas especies.

A este respecto, se han identificado mediante secuenciación del *D-Loop* (Zardoya *et al.*, 1995; Wood and Phua, 1996; Hiendleder *et al.*, 1998b) y por PCR-RFLP's (Hiendleder *et al.*, 1999), dos haplogrupos de ADNmt en ovejas domésticas: tipo A o haplogrupo asiático y tipo B o haplogrupo europeo. Ambos reflejan la derivación de las ovejas modernas de dos diferentes orígenes maternos ancestrales. La comparación del *D-Loop* de ambos linajes muestra una divergencia nucleotídica de 4.34 %, mientras que las regiones codificadoras difirieron por 0.44 % (Hiendleder, 1998).

Hiendleder *et al.* (1998b), en estudios filogenéticos basados en RFLP's que incluyen ovejas representantes de los haplogrupos asiático y europeo, además de ejemplares de muflón (*Ovis musimon*), urial (*O. vignei bochariensis*) y argali (*O. ammon nigrimontana*, *O. a. collium*), señalan que el linaje europeo contiene la mayoría de los haplotipos



detectados entre ovejas domésticas europeas y asemejan a haplotipos de muflón; mientras que el linaje asiático consiste de haplotipos encontrados en Asia Central y en algunas ovejas domésticas europeas. La comparación de secuencias mostró que los linajes de ovejas domésticas difirieron por 4.43 %, en tanto que la secuencia de muflón diverge del tipo A por 4.52 %, pero por sólo 1.36 % del tipo B.

Los datos HinfI RFLP's del ADNmt ovino sugieren una antigua mutación, la cual diferencia entre los dos haplogrupos mitocondriales (Hiendleder *et al.*, 1999). Esta mutación se asignó al gen Citocromo Oxidasa I (COI), desarrollando una PCR basada en análisis discriminante entre las dos ramas filogenéticas. El patrón de fragmentos ubica el sitio polimórfico de reconocimiento HinfI en las posiciones nucleotídicas 5562-5566 del gen COI, revelando fragmentos de ~ 1.8 kb para el haplogrupo A y de ~ 1.3 kb y ~ 0.5 kb para el haplogrupo B. La digestión de productos de PCR del gen COI genera fragmentos de restricción de 836 pb (haplogrupo A) o 477 pb y 359 pb (haplogrupo B). Los datos de secuencia también hicieron posible comparar la divergencia entre los dos haplogrupos de ADNmt ovino con la correspondiente diferencia entre *B. indicus* y *B. taurus* (Loftus *et al.*, 1994; Kikkawa *et al.*, 1995; Pegoraro *et al.*, 1996).

La longitud del ADNmt ovino completo (europeo) es de 16,616 nt, la cual no es absoluta debido a heteroplasmia causada por la ocurrencia de repeticiones en tandem en el *D-Loop*, el cual tiene aproximadamente 1180 nt de longitud, con cuatro copias del motivo repetido de 75 nt de longitud próximas al ARNt-Pro hacia el extremo 5'. Esta longitud varía de 1031 nt (*O. canadensis canadensis*) a 1333 nt (*O. ammon nigrimontana*) debido a diferentes números de copias del elemento repetido en tandem. Cada repetido contiene dos secuencias octaméricas de simetría observable (TTAATGTA, TACATTAA). Los motivos G/ACCCC (tipo A) y ACCC/TC (haplogrupo B) están localizados inmediatamente corriente arriba de esas estructuras y una secuencia conservada (TATGTATAAAGTACATTA) está también presente en cada repetición. Este arreglo en tandem exhibe un número variable de repetidos entre diferentes ADNmt y heteroplasmia con respecto al número de repetidos en un individuo. Sin embargo, se ha encontrado que la mayoría de individuos (95.7 %) muestran ser homoplásmicos para cuatro repetidos y esta parece ser una característica general de ambos haplogrupos ovinos. Con sólo tres repeticiones en tandem incluidas, la diferencia nucleotídica entre el *D-Loop* de haplogrupos A y B fue de 4.25 % (Wood and Phua ,1996; Hiendleder *et al.*, 1998, 1999, 2002). En adición a la región control, diferentes secuencias codificadoras están también disponibles para el análisis de estos haplogrupos, entre las cuales figuran el gen completo Cyt B, tRNAs Trp, Ala, Asn, Cys y Tyr, y el origen de replicación ( $O_L$ ) de la cadena ligera (Hiendleder, 1998).

Al estimar las distancias genéticas entre los haplogrupos de las especies ovina y bovina (Wood and Phua, 1996) mediante UPGMA, se encontró que la diferencia entre *B. indicus* y *B. taurus* es de 1.4 veces mayor que entre los haplogrupos A y B de ovinos. Las diferencias entre la región *D-Loop* completa de los haplogrupos A y B ovinos tuvieron un rango de 3.3 a 4.5 %, mientras que en *B. taurus* y *B. indicus* difieren de 4.7 a 5.3 %. La diferencia entre el *D-Loop* de *Bos* y *Ovis* excluyendo la región repetida es de 27.6 %, y entre las restantes porciones de la molécula es de 13.6 %.

Datos recientes sobre el origen y filogenia de la oveja doméstica (Hiendleder *et al.*, 2002) reportan que las ovejas silvestres y domésticas se presentan en cuatro ramas claramente separadas (Figura 1.1.1). Dos de ellas contienen los dos haplogrupos de oveja doméstica, cluster A y cluster B, formando cada uno un patrón en forma estrellada. El cluster B incluye al Muflón (*O. musimon*) en un nodo separado, entre las ovejas domésticas de dicho grupo. En los dos clusters restantes se agrupan las especies silvestres, encontrándose *O. ammon collium*, *O. ammon nigrimontana* y *O. vignei arkal* en uno de ellos. El otro cluster claramente separado agrupa a *O. ammon ammon*, *O. ammon darwini*, *O. vignei boharensis* y *O. canadensis canadensis*, esta última con una gran separación de las anteriores y del resto de los grupos. La posición del Muflón (*O. musimon*) concuerda con el punto de vista de Zeuner (1963) donde una línea de oveja doméstica deriva del stock Muflón (*O. musimon*, *O. orientalis*), la cual fue luego introducida en Europa. El cluster A no incluye, como lo esperado en la hipótesis de domesticación de Zeuner (1963), al Urial o alguna otra secuencia de oveja silvestre. Esto excluye al Urial (*O. vignei spp.*) como un origen matrilineal para el cluster A de oveja doméstica. La topología del árbol, distancia y tiempos de divergencia también excluyen al Argali (*O. ammon spp.*) como ancestro materno de *O. aries*. Las distancias genéticas y los datos moleculares basados en la región control y secuencias codificadoras de proteínas del ADNmt proveen de fuerte evidencia de domesticación a partir de dos subespecies de Muflón (Hiendleder *et al.*, 2002).

Complementariamente al uso del ADNmt para el estudio genético de poblaciones, se ha probado la utilidad de los marcadores microsatélites para establecer las interrelaciones genéticas dentro y entre diferentes poblaciones (Diez-Tasco *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2001) indicando que los microsatélites son útiles para rastrear cambios relativamente recientes en la estructura de las poblaciones.

Los parentescos genéticos entre poblaciones de ovejas Merino han sido investigados usando microsatélites (Diez-Tasco *et al.*, 2000), para determinar su utilidad en el seguimiento de diferencias cuando las poblaciones se derivan de la misma raza en una escala de tiempo relativamente corto. Todas las poblaciones exhibieron diversidad genética

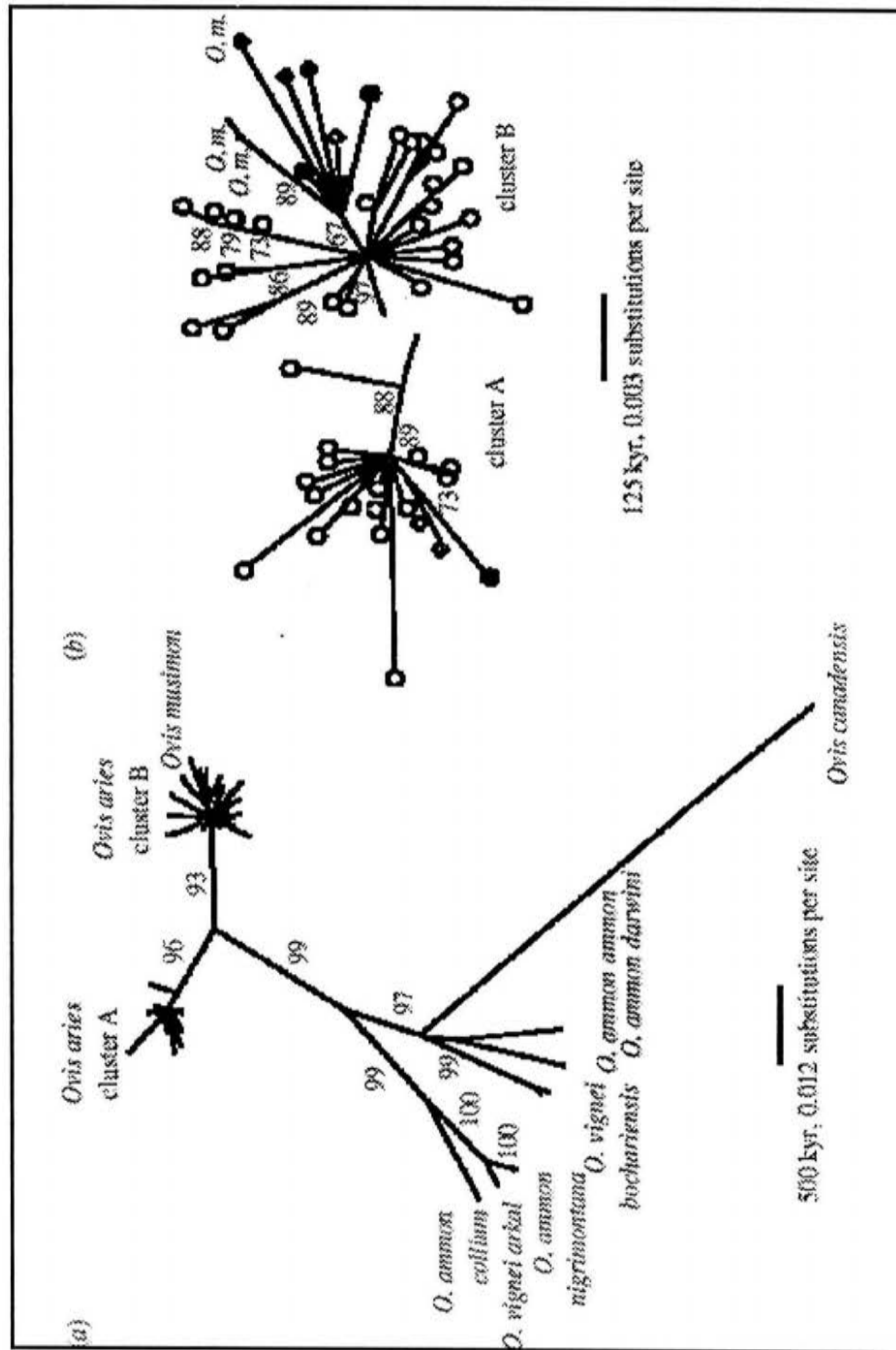


Figura 1.1.1. Relaciones Filogenéticas entre especies del género *Ovis* (Hiendleder *et al.* 2002)

similar, indicando que la variación presente dentro de las poblaciones origen se ha mantenido en las poblaciones que se han derivado de ellas.

En otro estudio similar, analizando la variabilidad genética en ovejas de razas españolas Churra, Lacha, Castellana, Rasa-Aragonesa y Merino (Arranz *et al.*, 2001), el análisis filogenético mostró un notable patrón de agrupamiento racial, tomando en cuenta el parentesco cercano entre las razas españolas analizadas. Las ovejas Lachas fueron las únicas agrupadas juntas en un cluster y las ovejas Churra, Castellana, Rasa Aragonesa y Merino se encontraron fuera de ese grupo, lo cual es indicativo de una mayor uniformidad dentro de la raza Lacha que puede ser resultado del fondo histórico particular de los fundadores, indicando un mayor aislamiento que otras ovejas españolas durante el proceso evolutivo. Por lo contrario, la oveja Churra mostró un nivel mas bajo de agrupamiento con varios animales esparcidos entre las otras razas españolas, sugiriendo un flujo de genes más grande entre Churras y otras ovejas españolas.

Los datos disponibles hasta el presente en estas líneas de investigación son indicativos de que el uso del *D-Loop* y los microsatélites funcionan como herramientas complementarias para proveer de información genética valiosa, lo cual puede ayuda a clarificar y analizar los orígenes e interrelaciones genéticas existentes dentro y entre poblaciones o razas, y contribuir con la caracterización y conservación de las razas criollas.

#### **1.1.5. Análisis Filogenéticos**

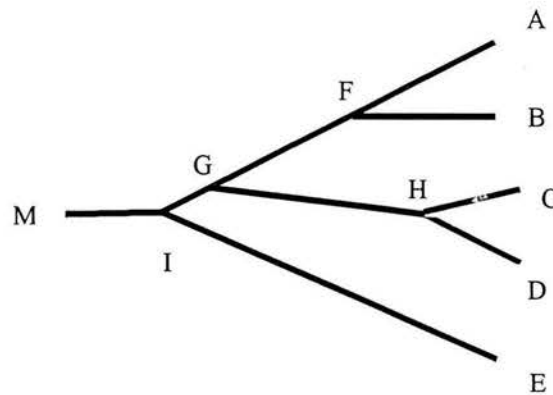
La medición de la diversidad genética entre poblaciones se suele hacer mediante las medidas de distancias genéticas. Las distancias se basan en la teoría clásica de genética de poblaciones, según la cual una población o raza puede ser definida mediante las frecuencias alélicas que se segregan en dicha población.

No existe un consenso general sobre cual de las distintas medidas de distancia genética es la más apropiada para análisis de poblaciones dentro de especies, como es el caso de razas de animales domésticos. No obstante, las correlaciones entre varias medidas de distancia generalmente son bastante altas, particularmente cuando se aplican a poblaciones locales. La distancia estándar de Nei (Nei, 1972) ha sido la más usada en estudios de evolución genética de poblaciones naturales. Las medidas de distancia basadas en el estadístico  $F_{ST}$  de Wright (Reynolds, 1983) son más apropiadas para procesos evolutivos a corto plazo, como es el caso de divergencia entre variedades, especialmente si el tamaño efectivo de las poblaciones varía en el tiempo y entre razas (Nei, 1984).

Puesto que las propiedades matemáticas y las bases biológicas de las distintas medidas de distancia genética difieren, es comprensible que el uso de las mismas pueda conducir a

diferentes interpretaciones de las relaciones filogenéticas entre varias razas, sin poder determinar cual es la mejor "filogenia", es decir, cual de ellas se acerca más a la realidad. Cada método asume una serie de características acerca de los datos y de los procesos evolutivos que los genera, y a veces es imposible saber si las poblaciones muestreadas reúnen estas características y si no lo hacen, cuánto se desvían de ellas. En la práctica, se aconseja calcular dos o más distancias genéticas y examinar las similitudes y las diferencias entre ellas, para determinar en qué grado las conclusiones obtenidas dependen de la elección de la distancia genética y saber si estas conclusiones son robustas (Nei and Kumar, 2000).

El propósito de los estudios filogenéticos, entre otros, es la reconstrucción correcta de la genealogía y la estimación del tiempo de divergencia entre un grupo organismos. Estas relaciones evolutivas son ilustradas a través de un árbol filogenético, que es una representación gráfica compuesta por nodos y ramas que los interconectan. Los nodos representan las unidades taxonómicas y las ramas definen las interrelaciones evolutivas entre las unidades taxonómicas en términos de ancestro-descendiente (Nei and Kumar, 2000). Las unidades taxonómicas representadas por los nodos pueden ser especies, poblaciones, individuos o genes (Avice, 1994; Li, 1997).

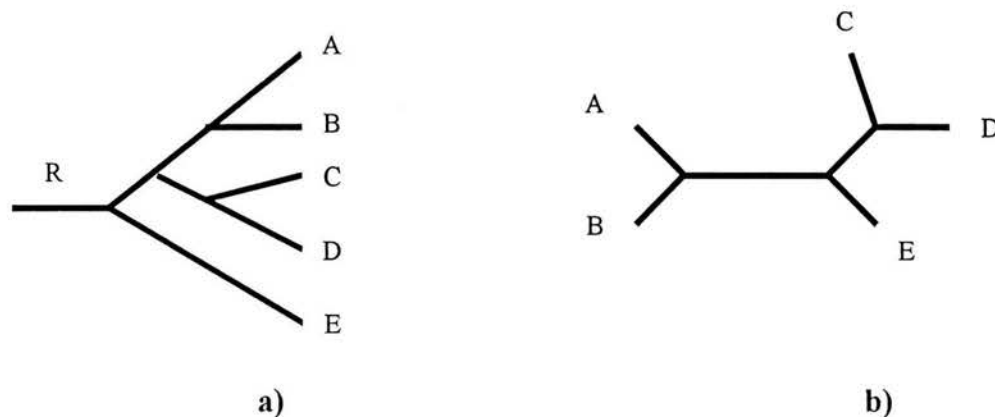


Esquema 1.1.1. Representación gráfica de un árbol filogenético.

Los nodos en un árbol filogenético son de dos tipos: internos y externos. En el esquema 1.1.1 los nodos A, B, C, D y E son externos y representan las unidades taxonómicas bajo comparación, denominadas "unidades taxonómicas operacionales" (OTUs). El resto de los nodos son internos y representan las unidades ancestrales de los OTUs (Li, 1997). Las ramas también se clasifican en: ramas internas y externas. Por ejemplo, las ramas

principales a los nodos A, B, C, D y E son externas, mientras que las ramas internas son las que conectan a los nodos internos (Esquema 1.1.1).

Los árboles filogenéticos pueden presentar raíz o carecer de ella. En un árbol enraizado existe un nodo particular llamado raíz (R en el esquema 1.1.2 a) que representa el ancestro común de todos los OTUs bajo estudio. En cambio, un árbol sin raíz solo especifica las interrelaciones entre los diferentes OTUs sin definir un ancestro común (Esquema 1.1.2 b).



Esquema 1.1.2. Representación gráfica de un árbol con (a) o sin (b) raíz.

Un grupo o taxa se dice que es monofilético si está derivado de un simple ancestro común, por ejemplo, en el esquema 1.1.1 los OTUs A y B se derivan de un ancestro común F. Al contrario, si se derivan de más de un ancestro común se denominan polifiléticos, como se observa en el esquema 1.1.1 en donde los OTUs A y C se derivan de dos diferentes ancestros F y H respectivamente. Un grupo o taxa se denomina parafilético si se deriva de un ancestro común, pero el grupo no incluye a todos los descendientes: Por ejemplo, en el esquema 1.1.1 los OTUs A, B y E son parafiléticos, ya que no incluyen a todos los descendientes del ancestro común I. En estudios de sistemática, un “clado” es definido como un grupo monofilético que incluye a todas las especies descendientes de un ancestro común (Li, 1997).

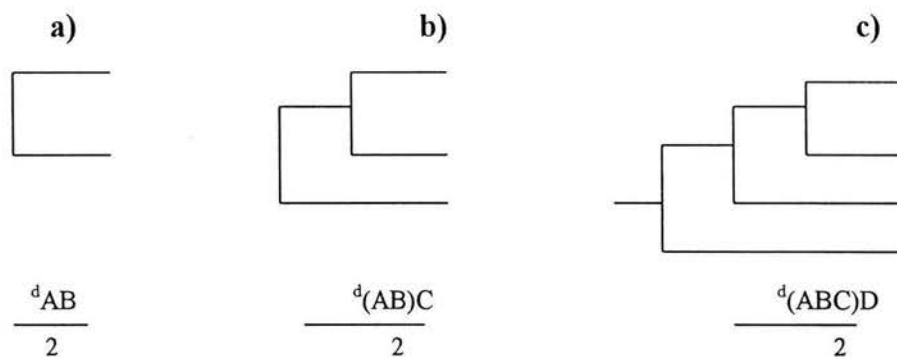
En estudios de evolución y variación genética, las secuencias de ADN son mucho más informativas que las secuencias de proteínas porque muchos cambios a nivel nucleotídico no se reflejan en un cambio a nivel de proteína. Además, una gran parte de las secuencias de ADN no codifican proteínas y hay degeneración del código genético. La variación genética en regiones de ADN no codificantes como intrones, regiones intergénicas, etc., o las sustituciones nucleotídicas en las regiones codificantes, pueden ser estudiadas



únicamente mediante el análisis de las secuencias de ADN. También, las secuencias de ADN revelan información detallada del grado y tipo de polimorfismos, debidos a los mecanismos de delección, inserción, sustitución nucleotídica, transposición de genes, conversión de genes y transferencia de genes horizontales (Nei and Kumar, 2000).

Existen varios métodos estadísticos para construir árboles filogenéticos o dendrogramas a partir de las secuencias de ADN, clasificados en métodos de carácter discreto y métodos de distancia. La distancia genética se define como la magnitud de las diferencias génicas o genómicas entre poblaciones y es medida con alguna cantidad numérica. El número de sustituciones de nucleótidos por sitio o número de sustitución génica por locus es una medida de distancia genética (Nei, 1987). En los métodos de distancia, las distancias genéticas ( $d$ ) son calculadas y el árbol filogenético es construido usando algoritmos basados en alguna interrelación funcional entre los valores de distancia (Li, 1997). Los más comunes son el método de neighbor-joining (NJ) y el método de medias aritméticas no ponderado (UPGMA).

El método UPGMA se usa para construir árboles filogenéticos si la tasa de evolución es aproximadamente constante entre los diferentes linajes evolutivos, de modo que existe una relación aproximadamente lineal entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia (Takesaki and Nei, 1996).

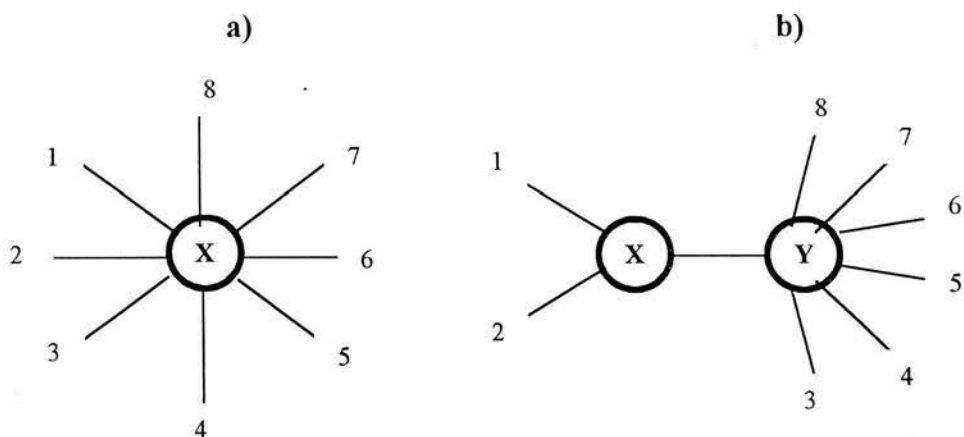


**Esquema 1.1.3.** Construcción de un árbol filogenético por el método de UPGMA.

El método UPGMA emplea un algoritmo secuencial de agrupamiento en donde la interrelación topológica local esta basada en orden de similitud decreciente, es decir, en identificar a los dos OTUs que sean más similares, con la menor distancia (Esquema 1.1.3 a). Esta agrupación es considerada como un simple OTU compuesto a partir del cual se empieza un nuevo cálculo y el siguiente OTU con la distancia más pequeña es agrupado

con el OTU compuesto (Esquema 1.1.3 b). Este procedimiento se repite hasta contemplar todos los OTUs bajo estudio (Esquema 1.1.3 c).

El principio del método de NJ supone que la tasa de evolución no es constante entre los diferentes linajes de estudio y se basa en encontrar continuamente "vecinos" que pueden minimizar la longitud total de árbol (Li, 1997). El método empieza con un árbol en forma de estrella en donde no existe agrupación de OTUs (Esquema 1.1.4 a). El primer paso consiste en separar un par de OTUs de todos los demás, escogidos por el valor más pequeño en la longitud de la rama. En este árbol sólo hay una rama interna que conecta los nodos X y Y, donde X es el nodo común para los OTUs 1 y 2 (Esquema 1.1.4 b) y Y es el nodo común para los demás OTUs. Este par de OTUs es considerado entonces como un simple OTU y las distancias medias aritméticas entre los OTUs son calculadas para formar una nueva matriz de distancia. El próximo par de OTUs con la suma más pequeña en la longitud de la rama es seleccionado para formar la siguiente ramificación del árbol. El procedimiento se repite hasta que todas las ramas internas son encontradas.



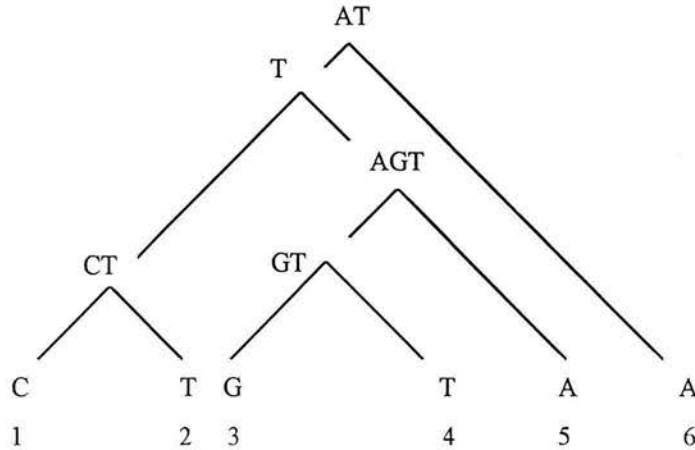
**Esquema 1.1.4.** Ilustra la construcción de un árbol filogenético por el método NJ.

En los métodos de carácter discreto, el árbol es construido considerando las relaciones evolutivas de las secuencias de ADN en cada sitio nucleotídico (Takesaki and Nei, 1996). Uno de los métodos más representativos en esta categoría es el método de máxima parsimonia (MP), que se basa en la búsqueda del árbol con el menor número de cambios evolutivos para explicar las diferencias observadas entre los OTUs bajo estudio.

Para determinar el árbol de MP (Esquema 1.1.5), primero se identifican todos los sitios informativos. Un sitio nucleotídico es filogenéticamente informativo sólo si favorece



algunos árboles sobre los otros. Debe tener al menos dos diferentes tipos de nucleótidos y se deben de repetir al menos dos veces en las secuencias bajo estudio. Si se utilizan pocos nucleótidos o aminoácidos (sitios), la probabilidad de obtener un árbol erróneo es alta (Li, 1997). Posteriormente se determina el número mínimo de sustituciones en cada sitio informativo y se suma el número total de cambios presentes en los sitios informativos con la finalidad de escoger el árbol de MP que posea el menor número de sustituciones nucleotídicas.



**Esquema 1.1.5.** Ilustra la construcción de un árbol filogenético por el método MP.

El método de máxima verosimilitud (ML) requiere un modelo probabilístico para el proceso de sustituciones nucleotídicas. Esto es, se debe especificar la probabilidad de transición de un estado nucleotídico a otro en un tiempo de intervalo en cada rama. El método consiste en calcular la máxima verosimilitud de la secuencia de nucleótidos en los grupos. Se calculan varias topologías y finalmente se escoge aquella que obtenga el mayor valor de verosimilitud (Nei, 1987; Li, 1997).

En general, es difícil construir el verdadero árbol filogenético con la información de las poblaciones actuales. Se pueden cometer errores, bien sea en la topología o en el patrón de ramificación del árbol. Sin embargo, podemos obtener un árbol cercano al verdadero y la exactitud del método escogido dependerá del tipo de datos utilizados y de los objetivos de la investigación (Nei, 1987).

Actualmente para realizar análisis filogenéticos a partir de un gran número de datos moleculares existen programas computacionales que permiten calcular matrices de distancia y algoritmos filogenéticos de una manera rápida (Avice, 1994). Existe una gran

cantidad de paquetes de software, algunos de ellos gratuitos y disponibles a través de internet (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>). Los más comúnmente empleados son PHYLIP (Joseph Felsenstein, University of Washington; disponible en <http://evolution.gs.washington.edu/>), PAUP\* (David Swofford, Florida State University. Distribuido por Sinauer Associates of Sunderland, Massachusetts; disponible en <http://paup.csit.fsu.edu/>), Mega2 (Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Masatoshi Nei and Ingrid Jakobsen; disponible en <http://www.megasoftware.net/>), Arlequín (Laurent Excoffier, University of Geneva, Switzerland; disponible en <http://acasun1.unige.ch/arlequin/>), DnaSP (Julio Rozas and Ricardo Rozas, Universidad de Barcelona, España; disponible en <http://www.bio.ub.es/-julio/DnaSP.html>), BioEdit (Tom Hall, North Carolina State University; disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/RnaseP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>), entre otros.

Considerando las características del *D-Loop* como herramienta útil en el estudio genético de poblaciones, en el presente trabajo se utilizó la secuencia completa de dicha región (Wood and Phua, 1996; Hiendleder *et al.*, 1998b, 1999) para evaluar el origen y relaciones genéticas de la oveja criolla mexicana (*Ovis aries*) con la finalidad de aportar mayor información y contribuir con el estudio y conservación de este recurso genético animal.

#### **1.1.6. Justificación**

La oveja criolla mexicana (OCM), al igual que otros recursos genéticos pecuarios del país, está en riesgo de iniciar un proceso de extinción por sustitución genética al aumentar la frecuencia de genes exóticos -absorción y reemplazo por razas comerciales especializadas- en los rebaños con fines de incrementar la productividad. Como especie local, además de su adaptabilidad a diversas condiciones del medio ambiente (clima, topografía, alimentación, parásitos, etc) es importante desde el punto de vista ecológico y de diversidad genética. Además de ser parte de costumbres y tradiciones agrícolas, cumple un importante papel como medio de subsistencia de gran número de familias del sector rural.

La importancia del estudio de la OCM radica en conocer su diversidad genética, las posibles interrelaciones existentes entre las diferentes poblaciones y qué tan variables u homogéneas pueden ser en base a su localización. En este sentido, constituye un recurso que puede presentar características genéticas de resistencia natural a las condiciones del medio ambiente, representando una fuente de germoplasma valioso y potencial para la identificación de genes importantes para la industria pecuaria, médica y biotecnológica.

Todo ello permitiría una mejor adecuación a condiciones agroecológicas, culturales y económicas, así como al mejor uso de este recurso genético animal.

Este trabajo representa una contribución al estudio del patrimonio genómico nacional para el rescate, preservación, manejo y explotación racional de recursos genéticos autóctonos, indispensables para impulsar el desarrollo de una ganadería competitiva y una industria pecuaria nacional. Los resultados generados constituirán un punto de partida para el estudio y caracterización genética de la oveja criolla.

## 1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

### 1.2.1. HIPÓTESIS

Debido a que las poblaciones de oveja criolla mexicana se originaron a partir de una muestra de ovejas de razas ibéricas introducidas en la colonia, podría esperarse la existencia de un número reducido de haplotipos ancestrales, los cuales probablemente no se encuentren en las poblaciones comerciales contemporáneas.

### 1.2.2. OBJETIVOS

#### **Objetivo General**

Analizar el origen y las relaciones genéticas de la oveja criolla mexicana (*Ovis aries*) en comparación con otras poblaciones descritas, utilizando como marcadores genéticos la secuencia de nucleótidos del *D-Loop* del ADN mitocondrial y el polimorfismo del gen de la Citocromo Oxidasa I (COI).

#### **Objetivos Particulares**

- a) Obtener muestras de ADN de variedades de oveja criolla mexicana procedentes del sur, centro y costa este del país.
- b) Amplificar el *D-Loop* por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y un segmento incluyendo parte del gen COI.
- c) Obtener la secuencia de nucleótidos del *D-Loop* y evaluar el polimorfismo del gen COI por PCR-RFLP's.
- d) Determinar el nivel de diversidad genética presente en las variedades de oveja criolla mexicana muestreadas.
- e) Establecer los orígenes y analizar las relaciones filogenéticas de las variedades de oveja criolla mexicana muestreadas y ovejas de otras poblaciones previamente descritas.

### 1.3. METAS.

Con la finalidad de conocer los niveles de diversidad genética en ovejas criollas mexicanas, su origen y las relaciones genéticas que guardan entre sí y con las razas comerciales, se obtuvieron muestras sanguíneas de poblaciones del sur (Chiapas), centro (Morelos y Puebla) y costa este (Hidalgo y Veracruz) del país. A partir de cada una de las muestras se obtuvo el ADN total.

Para evaluar el origen de la oveja criolla mexicana, en todas las muestras obtenidas (N=152) incluidas ovejas mestizas y de razas comerciales, se amplificó por PCR un segmento de 1053 pares de bases del gen COI. Este fragmento fue digerido con la enzima de restricción HinfI que permite distinguir entre haplotipos europeos (B) y asiáticos (A).

Para establecer los niveles de diversidad y las relaciones genéticas que guardan entre sí las ovejas criollas mexicanas y con respecto a razas comerciales previamente descritas, se amplificó en al menos 10 individuos por región, la totalidad del *D-Loop*, el cual fue secuenciado en ambas direcciones.

A partir de las secuencias se identificaron los diferentes haplotipos, estableciéndose los niveles de diversidad nucleotídica presentes en cada grupo genético. Adicionalmente se calcularon las distancias genéticas entre los haplotipos identificados y con respecto a los encontrados en la base de datos del GenBank. Con esta información se construyeron dendrogramas, mostrando las relaciones genéticas y evolutivas que guardan todos los haplotipos entre sí.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. PCR-RFLP's (Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción) del gen COI.

#### 2.1.1. Material biológico.

Se emplearon 152 muestras de sangre periférica colectadas en tubos con EDTA obtenidas de OCM procedentes de cinco estados del país; así como también de ovejas mestizas y de razas comerciales procedentes de granjas rurales, académicas y/o comerciales (Cuadro 2.1.1).

Cuadro 2.1.1. Procedencia de las muestras

Oveja	Número	Procedencia / raza	Identificación*
Criolla N = 106	43	Chiapas	OCC01 a OCC43
	17	Puebla	OCP01 a OCP17
	6	Morelos	OCM01 a OCM06
	2	Hidalgo	OCH01, OCH02
	3	Veracruz	OCV01, OCV02, OCV03
	35	Hidalgo-Veracruz	OCHV01 a OCHV35
Mestiza	23	Suffolk/criolla de Morelos	OMM01 a OMM23
Raza pura N = 23	6	Black Belly	OBB01 a OBB06
	15	Pelibuey	OPP01 a OPP15
	2	Merino	OME01, OME02
Total	152		

\* *OCC*: oveja criolla de Chiapas, *OCP*: oveja criolla de Puebla; *OCM*: oveja criolla de Morelos, *OCH*: oveja criolla de Hidalgo, *OCV*: oveja criolla de Veracruz, *OCHV*: oveja criolla de Hidalgo-Veracruz, *OMM*: oveja mestiza Suffolk/criolla de Morelos, *OBB*: oveja Black Belly, *OPP*: oveja Pelibuey, *OME*: oveja Merino.

Como se indica en el cuadro 2.1.1, las ovejas criollas fueron muestreadas en los estados de Chiapas (Altos de Chiapas), Morelos (Coajumulco), Puebla (Tepexi de Rodríguez, Huacalzingo y Moralillo), Hidalgo (Valle del Mezquital) y Veracruz (Sierra de Zongolica). Cabe destacar que las muestras identificadas como “Hidalgo-Veracruz” (OCHV) corresponden a ovejas criollas descendientes de animales criollos de dichos estados y que no fue posible confirmar su ascendencia exacta.

### 2.1.2 Purificación de ADN total.

A partir de las muestras de sangre, se obtuvo el ADN total mediante la técnica de Miller *et al.* (1989) modificada (anexo 1). La integridad del ADN se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1% + TBE 1X (anexo 2) utilizando como marcador de peso molecular ADN del bacteriófago  $\lambda$  digerido con BstEII ( $\lambda$ /BstEII 100 ng/ $\mu$ l), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (UV) en un fotodocumentador UVP mod. White/UV TMW-20 Transiluminator. La concentración de ADN se determinó en un fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200 (Low Range, 10 – 500 ng de concentración final de ADN) siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 3).

### 2.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la reacción de PCR se utilizó como molde el ADN total purificado para amplificar un segmento incluyendo parte (58.7 %) del gen COI (5,332 a 6,876) del ADNmt ovino. Para amplificar un segmento de 1053 pb donde se encuentra el sitio polimórfico de reconocimiento para la enzima HinfI en la posición 5562-5566 del gen COI, se empleó un par de iniciadores: COIF (<sup>5,203</sup> 5' GCAGAGTTTGAAGCTGCT 3') y COIR (<sup>6,255</sup> 5' AGCTGACGTGAAGTAAGC 3') en direcciones "forward" y "reverse" respectivamente (Hiendleder *et al.*, 1999). Para cada uno de los iniciadores se indica la posición correspondiente en la secuencia completa del ADNmt ovino (Hiendleder *et al.*, 1998b).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C/3'; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/30'', alineación a 56°C/30'' y extensión a 72°C/1'; y 1 ciclo de extensión final a 72°C/3'. La reacción se realizó en 20  $\mu$ l conteniendo: 80 ng de ADN molde, 0.5 pM de ambos iniciadores, 0.2 mM de dNTPs, 0.15 mg/ml de BSA, tritón 0.1%, buffer C 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10  $\mu$ g/ml de gelatina, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Biotecnologías Universitarias, México D.F.) (anexo 8). Las reacciones se realizaron en un termociclador Omn-E de HYBAID limited, mod. HBTRE02HL110. La evaluación de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % + TBE 1X (anexo 2) teñidos con bromuro de etidio, utilizando como marcador de peso molecular el ADN  $\lambda$ /BstEII (100 ng/ $\mu$ l) y visualizados con luz UV.

#### 2.1.4. Digestión de productos de PCR.

Para la digestión se utilizó la enzima HinfI (BioLabs) (*Haemophilus influenzae* Rf) como lo reportado por Hiendleder *et al.* (1999), cuya diana de reconocimiento es la siguiente secuencia:



Las condiciones de digestión fueron las siguientes: 5 µl de producto de PCR, NE Buffer2 1X (50mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol pH 7.9), espermidina 1 mM (Sigma-Aldrich) y 2 U/Rx (unidades por reacción) de enzima HinfI en un volumen total de 20 µl (anexo 9). Las condiciones de temperatura para la reacción de digestión se proporcionaron mediante baño maría a 37°C durante 12 a 16 horas.

#### 2.1.5. Análisis de PCR-RFLP's.

Los productos de digestión se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 3 % + TBE 1X (anexo 2) con bromuro de etidio (10 mg/ml), usando como marcadores de peso molecular el ADN pBR322 digerido con MspI (pBR322/MspI 50 ng/µl) y el ADN λ/BstEII (100 ng/µl), conjuntamente con una muestra del producto amplificado sin digerir y visualizados por luz UV. El patrón de fragmentos obtenidos por electroforesis, luego de la digestión, mostró el haplogrupo específico (Asiático –A- o Europeo –B-) al cual pertenecen las muestras analizadas. En el caso de haplogrupo A, el fragmento de 1053 pb generó luego de la digestión, tres fragmentos: 836 pb, 144 pb y 73 pb. Para el haplogrupo B la digestión del mismo fragmento de 1053 pb resultó en cuatro fragmentos: 477 pb, 359 pb, 144 pb y 73 pb. Los fragmentos de 144 y 73 pb son comunes a ambos haplogrupos.

### 2.2. SECUENCIACIÓN DEL D-LOOP.

#### 2.2.1. Material Biológico.

Se seleccionaron, del total de muestras procesadas (Ver 2.1.1 y cuadro 2.2.1), 33 muestras de ADN de ovejas criollas mexicanas no emparentadas, procedentes de los estados muestreados.

#### 2.2.2. Purificación de ADN total.

Ver el procedimiento descrito en el punto 2.1.2.



**Cuadro 2.2.1.** Muestras seleccionadas para secuenciación

Procedencia	Núm.	Identificación*
Chiapas	10	OCC01, OCC09, OCC15, OCC16, OCC17, OCC27, OCC34, OCC37, OCC39, OCC40
Puebla	10	OCP01, OCP02, OCP03, OCP04, OCP05, OCP06, OCP07, OCP10, OCP13, OCP14
Morelos	3	OCM01, OCM02, OCM05
Hidalgo	2	OCH01, OCH02
Veracruz	3	OCV01, OCV02, OCV03
Hidalgo-Veracruz	5	OCHV28, OCHV29, OCHV30, OCHV33, OCHV34
<b>Total</b>	<b>33</b>	

\* OCC: oveja criolla de Chiapas, OCM: oveja criolla de Morelos, OCH: oveja criolla de Hidalgo, OCV: oveja criolla de Veracruz, OCHV: oveja criolla de Hidalgo-Veracruz, OCP: oveja criolla de Puebla.

### 2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la reacción de PCR se utilizó como molde el ADN total purificado para amplificar el *D-Loop*. Para ello se empleó un par de iniciadores: Mit3 (<sup>15,321</sup> ATATACTGGTCTTGTAACC) en “forward” y Mit4 (<sup>26</sup> AGGCATTTTCAGTGCCTTG) en “reverse”, que se localizan en los genes de ARN de transferencia para prolina y fenilalanina, respectivamente. Para cada uno de los iniciadores se indica la posición correspondiente para la secuencia completa del ADNmt (Hiendleder *et al.*, 1998b).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C/3’; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C/30’’, alineación a 62°C/30’’ y extensión a 72°C/1’; y 1 ciclo de extensión final a 72°C/3’. La reacción de amplificación se realizó en 20 µl conteniendo: 80 ng de ADN molde, 0.5 pM de ambos iniciadores, 0.2 mM de dNTPs, 0.15 mg/ml de BSA, tritón 0.1 %, buffer C 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10 µg/ml de gelatina, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Biotecnologías Universitarias, México D.F.) (anexo 4). Las reacciones se realizaron en un termociclador Omn-E de HYBAID limited, mod.HBTRE02HL110. La evaluación de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % + TBE 1X (anexo 2) utilizando como marcador de peso molecular el ADN λ/BstEII (100 ng/µl), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con UV.

#### 2.2.4. Purificación de fragmentos amplificados.

Los productos amplificados de PCR se purificaron luego de electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % + TAE 1X (anexo 2), empleando como marcador de peso molecular el ADN  $\lambda$ /BstEII (100ng/ $\mu$ l), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con UV. Los fragmentos se cortaron del gel para su purificación mediante sílica o método de “perlas” (Boyle and Lew, 1995) según procedimiento anexo (anexo 5), y posteriormente se evaluó su integridad por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % + TBE 1X (anexo 2). La concentración del fragmento de ADN se determinó en un fluorómetro (Hoefer, DyNA Quant 200) siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 3).

#### 2.2.5. Obtención de la secuencia.

El fragmento purificado de ADN se empleó como molde para obtener la secuencia de nucleótidos correspondientes al *D-Loop* ovino completo (*O. aries*). Para la reacción de secuencia se usó el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos, utilizando para ello el KIT comercial "BigDye™ terminator Cycle Sequencing" (PE, Applied Biosystems Foster, CA USA), siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 6).

Para obtener la secuencia completa del *D-Loop* en cada individuo, se utilizaron los siguientes iniciadores: Mit3 y Mit4 como externos; MitO1F, MitO2F y MitO1Rv como internos. En caso de ser necesario se emplearon los iniciadores internos MitO3F y MitO2Rv (Cuadro 2.2.2). Los iniciadores internos se diseñaron utilizando el alineamiento de las secuencias completas del *D-Loop* de *O. aries* reportadas y depositadas en el GenBank mediante el programa Multalin: Multiple Sequence Alignment (Corpet, 1988), y el Software Primer Designer versión 1.02 (Scientific and Educational Software, 1990).

**Cuadro 2.2.2.** Iniciadores utilizados en la reacción de secuenciación

Tipo	Dirección	Nombre	Secuencia	Posición*
Externo	Forward	Mit3	ATATACTGGTCTTGTAACC	15,321
	Reverse	Mit4	AGGCATTTTCAGTGCCTTG	26
Interno	Forward	MitO1F	GGACAYGAGCGTTCATAAAC	15,592
		MitO2F	CACTTCACTGAAGCATGTAG	15,956
		MitO3F	TTAACTGCATCTTGAGCATC	16,373
	Reverse	MitO1Rv	GACACCACAGTTATGTTAGG	16,263
		MitO2Rv	TGTACTATGTACGGTCAAGC	15,987

\* posición correspondiente para la secuencia completa del ADN mitocondrial ovino

La reacción de secuencia se trabajó por PCR en un termociclador Techne modelo FTGENE2D, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 25 ciclos a 96°C/10 seg, 50°C/5 seg y 60°C/4 min, con un ciclo final a 4°C. Al término, los reactivos no incorporados en la reacción de secuencia se eliminaron por filtración a través de columnas de Shepadex G50 según protocolo anexo (anexo 7). El volumen recuperado se colocó en un concentrador de ADN (Automatic SpeedVac mod. VR1) hasta secarse completamente (aproximadamente 45 minutos). Posteriormente, cada muestra fue resuspendida en 20 µl de formamida desionizada y cargada en un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City USA) para la lectura de las secuencias.

#### **2.2.6. Análisis de las secuencias.**

Las secuencias de cada muestra se registraron de forma electrónica y en electroferogramas impresos. El primer paso del análisis fue identificar la calidad de las secuencias, lo que requirió editar los errores presentados en la lectura original a partir de la identificación de nucleótidos no definidos en los electroferogramas, conservando las regiones de secuencia de calidad. Se utilizaron los programas Chromas versión 1.62 (Technelysium, Pty Ltd) (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), Aling (Scientific and Educational Software, PA USA) y MultAlin: Multiple Sequence Alignment (Corpet, 1988) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Las lecturas obtenidas de las cadenas “forward” y “reverse” luego de su edición y análisis, se empalmaron para construir la secuencia consenso del *D-Loop* empleando la subrutina Contig Manager del programa DNAsis for Windows versión 2.6 (DNA and Protein Sequence Analysis System. Hitachi Software Engineering Co., Ltd. Copyright © 1994-1998).

#### **2.2.7. Identificación de haplotipos.**

La identificación de los diferentes haplotipos presentes en el *D-Loop* de las variedades de OCM analizadas se realizó mediante la alineación múltiple de las secuencias en los programas Aling (Scientific and Educational Software. PA USA) y MultAlin (Corpet, 1988) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) con los haplotipos previamente descritos en ovejas y depositados en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El polimorfismo en la región se analizó comparando las diversas sustituciones nucleotídicas a lo largo de la secuencia de los diferentes haplotipos.

### 2.2.8. Análisis filogenético de las variedades de oveja criolla mexicana.

Con la finalidad de estudiar el origen y las relaciones genéticas de la oveja criolla mexicana se compararon los haplotipos encontrados en las 33 muestras analizadas con los haplotipos correspondientes al *D-Loop* previamente reportados en ovejas domésticas de diferentes orígenes, disponibles en la base de datos del GenBank. Igualmente se incorporaron en el análisis secuencias de ovejas de especies silvestres obtenidas del GenBank.

Los números de acceso (indicados entre paréntesis) de las secuencias que se emplearon para el análisis son: **Haplogrupo B (europeo)**: Merinolandschaf: AL01 (AF010406), AL02 (AF039577); Kivircik: TU01 (AY091495); Daglic: TU02 (AY091496); Akkaraman: TU03 (AY091497); Edilbey: KA01 (AY091499); Rasa Aragonesa: ES (L29055); Awassi: SI (AF089809); ovejas Neocelandesas: NZ01 (Z35239), NZ02 (Z35259), NZ03 (Z35235), NZ04 (Z35232), NZ05 (Z35236), NZ06 (Z35267), NZ07 (Z35241), NZ08 (Z35234), NZ09 (Z35257), NZ10 (Z35233), NZ11 (Z35240), NZ12 (Z35238), NZ13 (Z35249), NZ14 (Z35237), NZ15 (Z35248), NZ16 (Z35263), NZ17 (Z35266), NZ18 (Z35293), NZ19 (Z35262), NZ20 (Z35231), NZ21 (Z35228), NZ22 (Z35229), NZ23 (Z35268), NZ24 (Z35265).

**Haplogrupo A (asiático)**: Merinolandschaf: AL03 (AF010407); Gizarr: TA (AY091498); Astrachan: KA02 (AY091500); ovejas Neocelandesas: NZ25 (Z35244), NZ26 (Z35243), NZ27 (Z35250), NZ28 (Z35255), NZ29 (Z35264), NZ30 (Z35256), NZ31 (Z35230), NZ32 (Z35251), NZ33 (Z35253), NZ34 (Z35258), NZ35 (Z35252), NZ36 (Z35245), NZ37 (Z35246), NZ38 (Z35247), NZ39 (Z35242).

Para las especies de **oveja silvestre** se utilizaron: *O. musimon*: Om01 (AF039579), Om02 (AY091487), Om03 (AY091488); *O. vignei bochariensis*: Ovb01 (AF039580), Ovb02 (AY091490), Ovb03 (AY091491); *O. vignei arkal*: Ova (AY091489); *O. ammon ammon*: Oaa (AF242347); *O. ammon darwini*: Oad (AF242348); *O. ammon collium*: Oac (AY091492); *O. ammon nigrimontana*: Oan01 (AY091493), Oan02 (AY091494) y *O. canadensis canadensis*: Occ (AY091486).

Para analizar las relaciones filogenéticas se realizó la alineación múltiple en el programa ClustalW 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) de los haplotipos identificados en OCM y las secuencias antes mencionadas. El resultado del alineamiento se analizó en el paquete de computación PHYLIP versión 3.57 (Felsenstein, 1995). Primeramente, las distancias genéticas entre las diferentes secuencias se calcularon por el modelo de 2 parámetros de Kimura (Kimura, 1980), empleando la subrutina DNADIST. Con los valores de distancias genéticas se construyeron dendrogramas por el método de "neighbor-joining" (Saitou and

Nei, 1987) utilizando la subrutina NEIGHBOR. La confiabilidad en la topología del árbol se calculó con 1000 réplicas generadas por el método de "bootstrapping" (Felsenstein, 1985) dentro de la subrutina SEQBOOT. El árbol consenso se obtuvo por el método "Majority rule" (Margush and McMorris, 1981), empleando la subrutina CONSENSE. La gráfica del árbol se obtuvo por medio del programa "Tree View", versión 1.2 (Page, 1996).

Adicionalmente se realizaron alineamientos múltiples en el programa ClustalW 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) incluyendo diferentes subpoblaciones (Europeas + OCM / europeas + OCM + asiáticas / europeas + OCM + asiáticas + silvestres) para analizar el polimorfismo de ADN en la secuencia completa del *D-Loop*. Para ello se identificaron los sitios polimórficos en forma manual mediante los alineamientos y luego se observó, para su confirmación, con el programa BioEdit (Hall, 1999).

Con el programa Mega2 (Kumar *et al.*, 2001) se calcularon las distancias genéticas promedio dentro y entre subpoblaciones de oveja doméstica (Europa, Asia y México) y ovejas silvestres, la diversidad promedio intra e interpoblacional y el coeficiente de diferenciación. Se emplearon tres diferentes modelos de distancia a modo de comparación (2 parámetros de Kimura (1980), Tamura y Nei (1993), Tajima y Nei (1982)) y el error estándar se calculó por Bootstrap (500 réplicas).

Utilizando el programa DnaSP (Rozas and Rozas, 1999) se obtuvieron los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y polimorfismo nucleotídico ( $\theta$ ) a diferentes niveles (subpoblaciones), y el resultado de la prueba de neutralidad mediante la prueba de Tajima (Tajima, 1989).

### III. RESULTADOS

#### 3.1. PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL.

Se obtuvo ADN total a partir de las 152 muestras de sangre ovina colectadas (ver Cuadro 2.1.1). El rendimiento promedio obtenido a partir de 2 ml de sangre por muestra fue de 33.57  $\mu$ g de ADN total. Todas las integridades fueron óptimas al no observarse barridos indicativos de degradación del material genético (Figura 3.1.1).

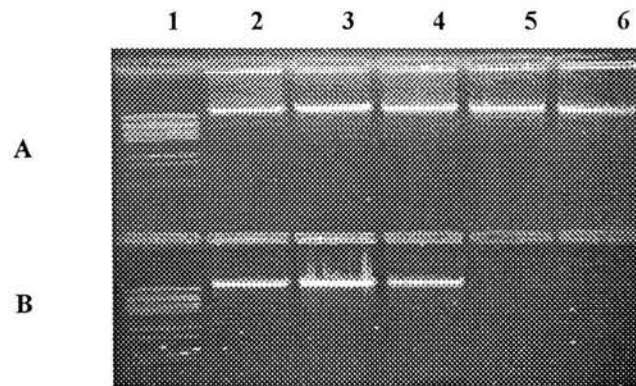


Figura 3.1.1. Integridad del ADN total. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular ADN  $\lambda$ BstEII. En los carriles 2A al 6A y 2B al 4B se observan integridades del ADN total en oveja criolla de Chiapas.

#### 3.2. PCR-RFLP's.

##### 3.2.1. Amplificación del gen COI.

En la Reacción de PCR para la amplificación del gen COI se observó la amplificación de un fragmento único de aproximadamente 1053 pb (Figura 3.2.1).

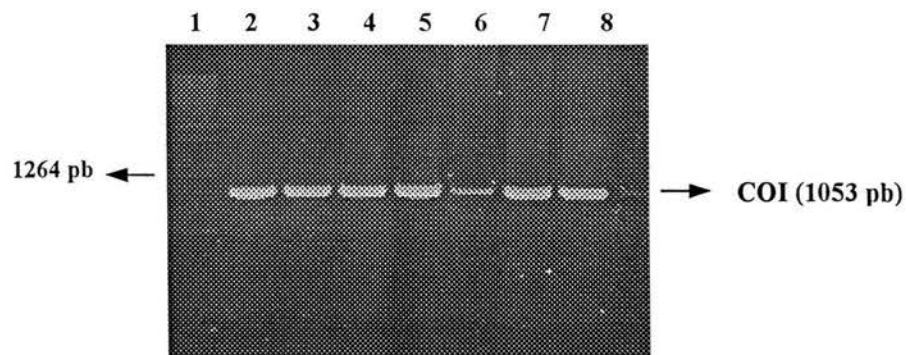
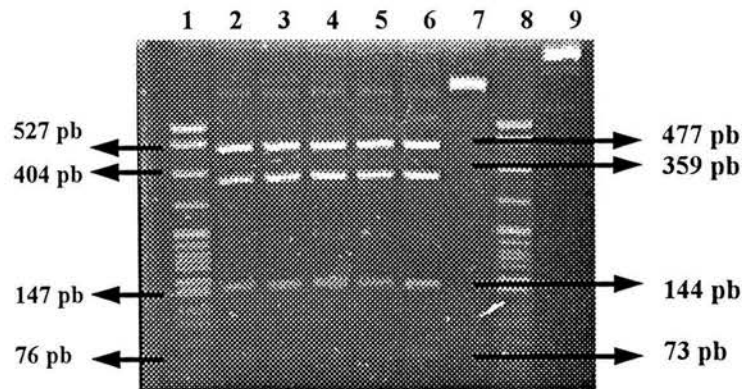


Figura 3.2.1. Amplificación del gen Citocromo Oxidasa I (COI). El carril 1 muestra el marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ BstEII. Del carril 2 al 8 se muestra la amplificación del gen COI en oveja criolla de Chiapas y Morelos.



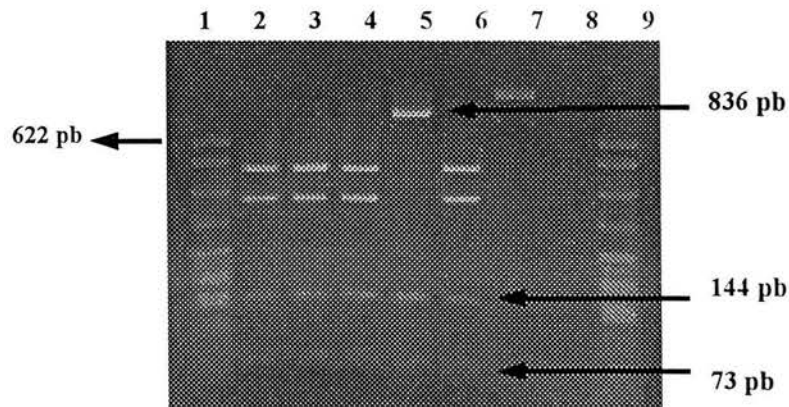
### 3.2.2. Análisis de PCR-RFLP's.

El análisis de los patrones de fragmentos generados por PCR-RFLP's de las variedades de OCM examinadas revelaron fragmentos *HinfI* polimórficos que corresponden con el haplogrupo europeo (tipo B), observándose fragmentos de 477 pb y 359 pb específicos de este haplogrupo, y fragmentos de 144 pb y 73 pb comunes a ambos haplogrupos (asiático y europeo) (Figura 3.2.2).



**Figura 3.2.2.** Productos de PCR gen COI digeridos con *HinfI*. Los carriles 1 y 8 muestran el marcador de peso molecular ADN pBR322/*MspI*, y ADN  $\lambda$ BstEII en el carril 9. Del carril 2 al 6 se muestran los patrones de fragmentos *HinfI* (haplogrupo europeo) en oveja criolla de Puebla. En el carril 7 se muestra el gen COI (1053 pb) sin digerir.

Al analizar el resto de las muestras, representadas por ovejas mestizas Suffolk/criolla y ovejas de raza Pelibuey, BlackBelly y Merino; se observó la presencia del patrón de fragmentos *HinfI* correspondiente al haplogrupo asiático (tipo A) en dos individuos: una oveja Blackbelly y una Merino (Figura 3.2.3). En este caso, el fragmento de 1053 pb generó luego de la digestión, tres fragmentos: 836 pb, 144 pb y 73 pb. El resto de ovejas presentaron, al igual que las OCM, el patrón característico del haplogrupo europeo (tipo B).

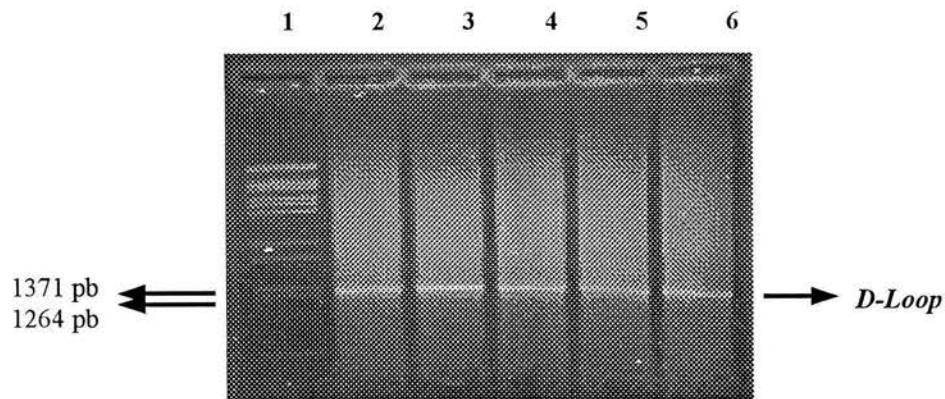


**Figura 3.2.3.** Productos de PCR gen COI digeridos con *HinfI*. Los carriles 1 y 9 muestran el marcador de peso molecular ADN pBR322/*MspI*, y ADN  $\lambda$ BstEII en el carril 8. En los carriles 2, 3, 4 y 6 se muestra el patrón de fragmentos *HinfI* en oveja BlackBelly haplogrupo europeo y en el carril 5 el haplogrupo asiático. El carril 7 muestra el gen COI (1053 pb) sin digerir.

### 3.3. SECUENCIACIÓN DEL *D-LOOP*.

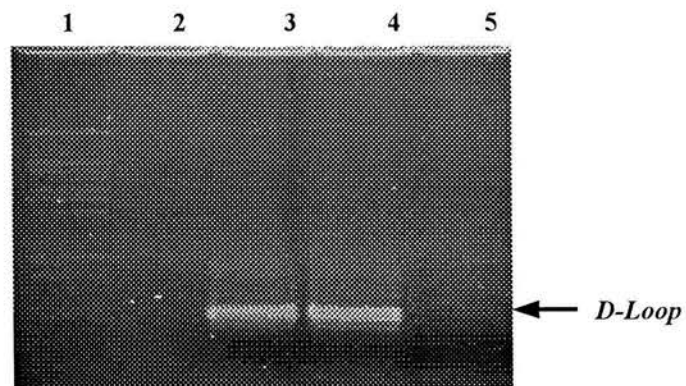
#### 3.3.1. Amplificación y purificación del *D-Loop*.

En la Reacción de PCR para la amplificación del *D-Loop* se observó un fragmento predominante de aproximadamente 1300 pb (Figura 3.3.1).



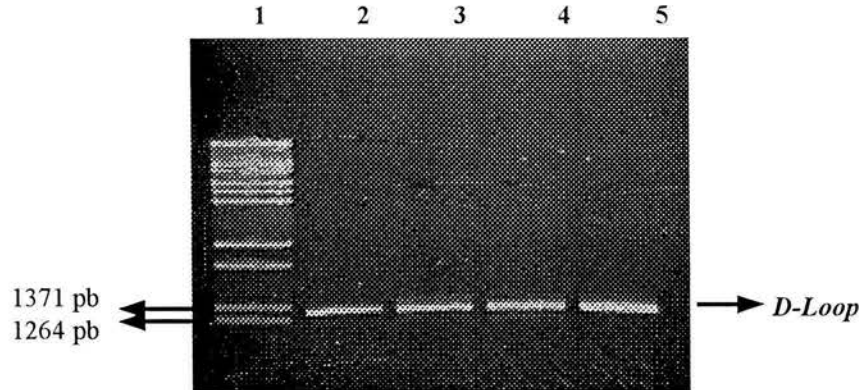
**Figura 3.3.1.** Amplificación del *D-Loop* ovino. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular  $\lambda$ BstEII. Del carril 2 al 6 se muestran los fragmentos amplificados de aproximadamente 1300 pb en oveja criolla de Chiapas.

En algunas de las amplificaciones para purificación de fragmentos se observó una banda de menor tamaño y menos densa, muy próxima a la banda predominante representativa del *D-Loop* y que puede corresponder a ADNmt heteroplásmico con un menor número de repetidos. Para la purificación se consideró la banda predominante, la cual es representativa del ADNmt total en cada una de las muestras analizadas (Figura 3.3.2). En la evaluación de fragmentos, después de la purificación, se observó una sola banda (Figura 3.3.3).



**Figura 3.3.2.** Purificación del *D-Loop* ovino. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ BstEII. Los carriles 3 y 4 muestran fragmentos amplificados de oveja criolla de Chiapas de aproximadamente 1300 pb.

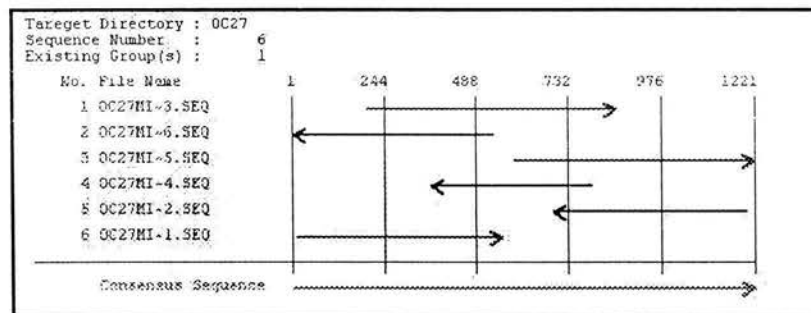




**Figura 3.3.3.** Evaluación de fragmentos purificados. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ BstEII. Del carril 2 al 5 se muestran la integridad de los fragmentos purificados en oveja criolla de Chiapas.

### 3.3.2. Secuenciación de fragmentos amplificados.

A partir de los fragmentos purificados se obtuvieron las secuencias parciales para ambas cadenas. Los electroferogramas generados se utilizaron para evaluar la calidad de las secuencias mediante la legibilidad de las mismas y editar los errores de lectura reduciendo el número de nucleótidos no definidos. A partir de las secuencias parciales obtenidas en ambas direcciones (cinco secuencias por individuo) se construyeron las secuencias consenso del *D-Loop* en cada individuo (Figura 3.3.4).



**Figura 3.3.4.** Mapa del empalme de secuencias realizado para el individuo OCC27 (Chiapas), en donde se observan tres secuencias en dirección forward y tres en reverse (Ver cuadro 2.2.2) y la secuencia consenso final.

Se obtuvo una longitud total de 1180 pb correspondientes al *D-Loop* completo, a excepción de un individuo con 1181 pb (Cuadro 3.3.1). Todas las muestras analizadas presentaron 4 repetidos en tandem de 75 nt de longitud cada uno.

**Cuadro 3.3.1. Identificación de muestras secuenciadas**

Procedencia	Muestra*	Longitud consenso
Chiapas	OCC01	1180 nt
	OCC09	1180 nt
	OCC15	1180 nt
	OCC16	1180 nt
	OCC17	1180 nt
	OCC27	1180 nt
	OCC34	1180 nt
	OCC37	1180 nt
	OCC39	1180 nt
	OCC40	1180 nt
Hidalgo	OCH01	1180 nt
	OCH02	1180 nt
Veracruz	OCV01	1180 nt
	OCV02	1180 nt
	OCV03	1180 nt
Morelos	OCM01	1180 nt
	OCM02	1180 nt
	OCM05	1180 nt
Hidalgo-Veracruz	OCHV28	1180 nt
	OCHV29	1181 nt
	OCHV30	1180 nt
	OCHV33	1180 nt
	OCHV34	1180 nt
Puebla	OCP01	1180 nt
	OCP02	1180 nt
	OCP03	1180 nt
	OCP04	1180 nt
	OCP05	1180 nt
	OCP06	1180 nt
	OCP07	1180 nt
	OCP10	1180 nt
	OCP13	1180 nt
	OCP14	1180 nt

\* OCC: oveja criolla de Chiapas, OCH: oveja criolla de hidalgo, OCV: oveja criolla de Veracruz, OCM: oveja criolla de Morelos, OCHV: oveja criolla de Hidalgo-Veracruz, OCP: oveja criolla de Puebla, nt: nucleótidos

### 3.3.3. Análisis filogenético de las variedades de oveja criolla mexicana.

El análisis de alineamiento de las 33 secuencias del *D-Loop* de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas evidenció 21 haplotipos diferentes (Números de acceso al GenBank: AY582800-AY582820. Ver anexo 10), de los cuales sólo 7 se presentaron en más de una oveja (HP02: 18.18 %; HP04: 9.09 %; HP05, HP07, HP08, HP12 y HP17: 6.06 % c/u) y 14 en una sola oveja (3.03 % c/u) (Cuadros 3.3.2 y 3.3.3).

Se observaron 29 sitios polimórficos de tipo transicional a lo largo de la secuencia completa del *D-Loop*, de los cuales 17 (58.62 %) se presentaron dentro de la zona de repetidos; no hubo transversiones. Además, se presentó un sitio de inserción (0.085 %) de un solo nucleótido en uno de los haplotipos (HP09) (Cuadro 3.3.2). El porcentaje de polimorfismo observado fue de 2.46 % (29/1180). Las diferentes sustituciones nucleotídicas y sus posiciones se muestran en el cuadro 3.3.4. En el cuadro 3.3.6 se presentan las distancias genéticas y el número absoluto de diferencias nucleotídicas entre los 21 haplotipos identificados en el *D-Loop* de OCM.

La composición de bases de la secuencia consenso (Anexo 11) fue de: 32.97 % Adenina (389/1180), 22.46 % Citosina (265/1180), 14.49 % Guanina (171/1180) y 30.08 % Timina (355/1180).

**Cuadro 3.3.2.** Haplotipos y sitios polimórficos presentes en el *D-Loop* de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas

HP	Secuencias	Sitios Polimórficos																																						
		15476	15515	15644	15656	15670	15708	15719	15723	15759	15778	15783	15798	15818	15828	15858	15871	15881	15893	15895	15931	15956	15985	15993	16042	16097	16192	16217	16244	16445	16472-73									
01	OCC01	T	C	A	G	T	C	A	T	A	T	T	C	T	A	T	C	G	T	T	C	T	T	C	T	A	T	C	G	T	-									
02	OCC09, OCC15, OCC17, OCP06, OCP13, OCP14																														C	-								
03	OCHV03																					T										C	-							
04	OCP05, OCP07, OCP10			G																		T											C	-						
05	OCC27, OCC34		T																			T											C	-						
06	OCHV01																				C	T												C	-					
07	OCM01, OCHV34														G							T												C	-					
08	OCM02, OCM05													G	C							T													C	-				
09	OCHV29																					T													C	-				
10	OCHV30									G												T		C												C	-			
11	OCP04																T		C			T														C	-			
12	OCC16, OCV02																					T															C	-		
13	OCC37					C																T															C	-		
14	OCC39																					T																C	-	
15	OCP01																					T																C	-	
16	OCH01																					T																C	-	
17	OCP02, OCP03																					T																	C	-
18	OCHV28									G												T																	C	-
19	OCHV33									G												T																	C	-
20	OCC40	C						T														T																	C	-
21	OCH02				A			T														T																	C	-
	consenso	t	c	a	g	t	c	a	t	a	t	t	c	t	a	t	c	g	t	t	t	t	t	t	c	t	a	t	c	g	t	-	-	-	-	-	-	-		

HP: haplotipo, OCC: oveja criolla de Chiapas, OCP: oveja criolla de Puebla, OCV: oveja criolla de Veracruz, OCH: oveja criolla de Hidalgo, OCHV: oveja criolla de Hidalgo-Veracruz, OCM: oveja criolla de Morelos

En cuanto a la distribución geográfica de los haplotipos de OCM, 5 fueron únicos de Chiapas (HP01, HP05, HP13, HP14 y HP20), 4 de Puebla (HP04, HP11, HP15 y HP17), 1 de Morelos (HP08), 2 de Hidalgo (HP16 y HP21), 2 de Veracruz (HP03 y HP06) y 4 de Hidalgo-Veracruz (HP09, HP10, HP18 y HP19). Hubo 3 haplotipos compartidos entre regiones: HP02 se presentó en Chiapas y Puebla, HP12 en Chiapas y Veracruz, y HP07 en Morelos e Hidalgo-Veracruz (Cuadro 3.3.3).

**Cuadro 3.3.3.** Distribución de los haplotipos del *D-Loop* identificados en oveja criolla mexicana

Haplotipo	ESTADO *						Total n (%)
	Chiapas	Puebla	Morelos	Hidalgo	Veracruz	Hidalgo- Veracruz	
HP01	1 (10)	-	-	-	-	-	1 (3.03)
<b>HP02</b>	<b>3 (30)</b>	<b>3 (30)</b>	-	-	-	-	6 (18.18)
HP03	-	-	-	-	1 (33.3)	-	1 (3.03)
HP04	-	3 (30)	-	-	-	-	3 (9.09)
HP05	2 (20)	-	-	-	-	-	2 (6.06)
HP06	-	-	-	-	1 (33.3)	-	1 (3.03)
<b>HP07</b>	-	-	<b>1 (33)</b>	-	-	<b>1 (20)</b>	2 (6.06)
HP08	-	-	2 (67)	-	-	-	2 (6.06)
HP09	-	-	-	-	-	1 (20)	1 (3.03)
HP10	-	-	-	-	-	1 (20)	1 (3.03)
HP11	-	1 (10)	-	-	-	-	1 (3.03)
<b>HP12</b>	<b>1 (10)</b>	-	-	-	<b>1 (33.3)</b>	-	2 (6.06)
HP13	1 (10)	-	-	-	-	-	1 (3.03)
HP14	1 (10)	-	-	-	-	-	1 (3.03)
HP15	-	1 (10)	-	-	-	-	1 (3.03)
HP16	-	-	-	1 (50)	-	-	1 (3.03)
HP17	-	2 (20)	-	-	-	-	2 (6.06)
HP18	-	-	-	-	-	1 (20)	1 (3.03)
HP19	-	-	-	-	-	1 (20)	1 (3.03)
HP20	1 (10)	-	-	-	-	-	1 (3.03)
HP21	-	-	-	1 (50)	-	-	1 (3.03)
Total (N)	10	10	3	2	3	5	33 (100)

\* número de animales y porcentaje del haplotipo por estado. Se indican en negritas los haplotipos que se compartieron entre dos estados

**Cuadro 3.3.4.** Sustituciones nucleotídicas observadas en el *D-Loop* de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas

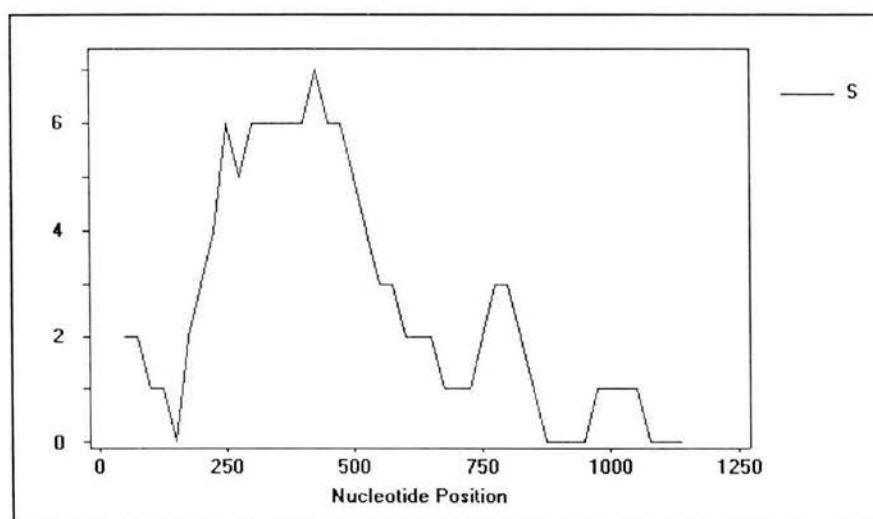
Tipo de cambio	Sustitución nucleotídica	Posición (pb)	Nº de haplotipos que cambiaron	Nº de sitios	Cambios totales	Porcentaje	
Transición	T por C	15,476	1	14	28	48.28	
		15,670	1				
		15,723	3				
		15,778	1				
		15,783	6				
		15,818	1				
		15,858	2				
		15,893	1				
		15,895	2				
		15,931	4				
		15,956	1				
		15,985	3				
		16,042	1				
		16,192	1				
	C por T		15,515	1	7	12	24.14
			15,708	2			
15,798			4				
15,871			1				
15,993			3				
16,217			1				
A por G		16,445	1	5	7	17.24	
		15,644	1				
		15,719	2				
		15,759	1				
G por A		15,828	2	3	7	10.34	
		16,097	1				
		15,656	1				
Transversión	-	16,881	2	0	0	0.00	
		16,244	4				
		-	0				
<b>Total</b>				<b>29</b>	<b>54</b>	<b>100</b>	

La región más polimórfica dentro de la secuencia de 1180 nt de longitud del *D-Loop* en OCM se ubicó entre las posiciones 208 a 557 (15644 a 15993 en la secuencia del ADNmt), lo que corresponde a una región de 350 pb (29.7 % de la longitud total del *D-Loop*) con 21 sitios polimórficos, representando 72.4 % (21/29) del total de sitios polimórficos identificados. En el cuadro 3.3.5 se muestran algunos datos al respecto. En la figura 3.3.5 se muestra la distribución de los sitios polimórficos (S) a lo largo de la secuencia completa del *D-Loop* en OCM.

**Cuadro 3.3.5.** Ubicación del polimorfismo observado en la secuencia completa del *D-Loop* en oveja criolla mexicana.

Extensión de la región <sup>1</sup>	Posición dentro del <i>D-Loop</i> <sup>2</sup>	Número de sitios polimórficos	Porcentaje (%) <sup>3</sup>	Tamaño de la región (pb)
15,644 a 15,993	208 a 557	21	72.4	350
15,644 a 16,097	208 a 661	23	79.3	454
15,644 a 16,244	208 a 808	26	89.7	601
15,437 a 16,616	1 a 1,180	29	100.0	1180

<sup>1</sup> Con relación a la secuencia completa (16616 pb) del ADNmt ovino (Hiendleder *et al.* 1998b). <sup>2</sup> En base a una longitud total de 1180 nt. <sup>3</sup> Con relación al total de sitios polimórficos identificados (29 sitios).



**Figura 3.3.5.** Distribución de sitios polimórficos (S) en la secuencia completa del *D-Loop* en oveja criolla mexicana. En el eje de las X's se indica la posición nucleotídica en la secuencia de 1180 pb. En el eje de las Y's se indica el número de sitios polimórficos.

**Cuadro 3.3.6.** Porcentaje de divergencia nucleotídica (diagonal inferior) y número absoluto de diferencias de nucleótidos (diagonal superior) por alineamiento comparativo entre los 21 haplotipos identificados en el *D-Loop* de oveja criolla mexicana (2 parámetros de Kimura).

HP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
HP01	-	1	3	3	3	4	4	5	2	5	3	4	5	5	5	3	5	4	6	4	12
HP02	.09	-	2	2	2	3	3	4	1	4	2	3	4	4	4	2	4	3	5	3	11
HP03	.25	.17	-	2	2	3	3	4	1	4	4	3	4	4	4	2	4	3	5	5	11
HP04	.25	.17	.17	-	2	3	3	4	1	4	4	3	4	4	4	2	4	3	5	5	11
HP05	.25	.17	.17	.17	-	3	3	4	1	4	4	3	4	4	4	2	4	3	5	5	11
HP06	.34	.25	.25	.25	.25	-	2	3	2	5	5	4	5	5	5	3	5	4	6	6	8
HP07	.34	.25	.25	.25	.25	.17	-	1	2	5	5	4	5	5	5	3	5	4	6	6	10
HP08	.42	.34	.34	.34	.34	.25	.09	-	3	6	6	5	6	6	6	4	6	5	7	7	9
HP09	.17	.09	.09	.09	.09	.17	.17	.25	-	3	3	2	3	3	3	1	3	2	4	4	10
HP10	.42	.34	.34	.34	.34	.42	.42	.51	.25	-	6	5	6	6	4	4	6	5	7	7	11
HP11	.25	.17	.34	.34	.34	.42	.42	.51	.25	.51	-	5	6	6	6	4	6	5	7	5	13
HP12	.34	.25	.25	.25	.25	.34	.34	.42	.17	.42	.42	-	1	1	1	1	3	4	6	6	12
HP13	.42	.34	.34	.34	.34	.42	.42	.51	.25	.51	.51	.09	-	2	2	2	4	5	7	7	13
HP14	.42	.34	.34	.34	.34	.42	.42	.51	.25	.51	.51	.09	.17	-	2	2	4	5	7	7	13
HP15	.42	.34	.34	.34	.34	.42	.42	.51	.25	.34	.51	.09	.17	.17	-	2	4	5	7	7	11
HP16	.25	.17	.17	.17	.17	.25	.25	.34	.09	.34	.34	.09	.17	.17	.17	-	2	3	5	5	11
HP17	.42	.34	.34	.34	.34	.42	.42	.51	.25	.51	.51	.25	.34	.34	.34	.17	-	5	7	5	8
HP18	.34	.25	.25	.25	.25	.34	.34	.42	.17	.42	.42	.34	.42	.42	.42	.25	.42	-	2	6	12
HP19	.51	.42	.42	.42	.42	.51	.51	.60	.34	.60	.60	.51	.60	.60	.60	.42	.60	.17	-	8	14
HP20	.34	.25	.42	.42	.42	.51	.51	.60	.34	.60	.42	.51	.60	.60	.60	.42	.42	.51	.68	-	10
HP21	1.02	.93	.93	.93	.93	.68	.85	.76	.85	.93	1.10	1.02	1.10	1.10	.93	.93	.76	1.02	1.19	.85	-

Al alinear las 33 secuencias de las variedades de OCM estudiadas con una secuencia de referencia del haplogrupo B (europea) de *O. aries* raza Kivircik, se observaron 37 sitios polimórficos (Cuadro 3.3.7) a lo largo de la secuencia completa del *D-Loop*; 35 transicionales (94.59 %) y 2 transversionales (5.41 %), con un total de 71 cambios. Se presentaron 5 tipos de sustituciones nucleotídicas: 4 de transición (T/C, C/T, A/G y G/A) y una de tranversión (T/G), además de un sitio de inserción (0.085 %) de un solo nucleótido (T) (Cuadro 3.3.8). El porcentaje de polimorfismo observado fue de 3.14 %.

Cuadro 3.3.7. Sitios polimórficos presentes en el *D-Loop* de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas con relación a la secuencia de oveja Kivircik (AY091495)

HP	Secuencias	Sitios Polimórficos																																					
00	TU01	T	C	A	G	T	A	C	T	A	T	C	A	T	C	A	T	C	A	T	C	T																	
01	OCC01																																						
02	OCC09, OCC15, OCC17, OCP06, OCP13, OCP14																																						
03	OCV03																																						
04	OCV05, OCP07, OCP10																																						
05	OCC27, OCC34																																						
06	OCV01																																						
07	OCM01, OCHV34																																						
08	OCM02, OCM05																																						
09	OCHV29																																						
10	OCHV30																																						
11	OCP04																																						
12	OCC16, OCV02																																						
13	OCC37																																						
14	OCC39																																						
15	OCP01																																						
16	OCH01																																						
17	OCP02, OCP03																																						
18	OCHV28																																						
19	OCHV33																																						
20	OCC40																																						
21	OCH02																																						
	consenso	T	C	A	G	T	A	C	T	A	T	C	A	T	C	A	T	C	A	T	C	T																	
		15476	15515	15644	15656	15670	15708	15719	15721	15723	15745	15759	15778	15783	15798	15818	15828	15858	15871	15881	15893	15895	15923	15931	15956	15977	15985	15993	16021	16042	16097	16192	16217	16238	16244	16264	16427	16445	16472-73

HP: haplotipo, OCC: oveja criolla de Chiapas, OCM: oveja criolla de Morelos, OCH: oveja criolla de Hidalgo, OCP: oveja criolla de Veracruz, OCHV: oveja criolla de Hidalgo-Veracruz, OCP: oveja criolla de Puebla



**Cuadro 3.3.8.** Sustituciones nucleotídicas observadas en el *D-Loop* de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas con relación a la secuencia de oveja Kivircik (AY091495)

Tipo de cambio	Sustitución nucleotídica	Posición (pb)	Nº de haplotipos que cambiaron	Nº de sitios	Cambios totales	Porcentaje					
Transición	T por C	15,476	1	17	36	45.95					
		15,670	1								
		15,723	4								
		15,745	1								
		15,778	1								
		15,783	7								
		15,818	1								
		15,858	2								
		15,893	1								
		15,895	2								
		15,931	5								
		15,956	1								
		15,985	4								
		16,021	1								
		16,042	2								
		16,192	1								
	16,264	1									
	C por T		15,515	2	8	16	21.62				
			15,708	3							
			15,721	1							
15,798			4								
15,871			1								
15,993			3								
16,217			1								
16,445			1								
A por G				15,644				1	5	7	13.51
				15,719				2			
	15,759	1									
	15,828	2									
	16,097	1									
G por A		15,656	1	5	10	13.51					
		16,881	2								
		15,923	1								
		15,977	1								
		16,244	5								
Transversión	G por T	16,238	1	2	2	5.41					
		16,427	1								
<b>Total</b>				<b>37</b>	<b>71</b>	<b>100</b>					

El análisis de alineamiento entre los 21 haplotipos de OCM y 32 secuencias correspondientes a la misma región en ovejas de origen europeo (haplogrupo B), permitió identificar 103 sitios polimórficos a lo largo de la secuencia completa del *D-Loop* (Anexo 12), 98 sitios transicionales (95.15 %) y 5 transversionales (4.85 %), con un total de 396 cambios y un porcentaje de polimorfismo de 8.73 %. También se identificaron 3 sitios de inserción y 3 de delección de un solo nucleótido y 4 eventos

de delección de 4 nucleótidos (0.59 %), con un total de 22 indeles (Cuadros 3.3.9 y 3.3.10).

Los cambios nucleotídicos revelaron 53 haplotipos diferentes, de los cuales 32 corresponden a secuencias ya reportadas en ovejas de razas comerciales y 21 a las secuencias de OCM (Cuadro 3.3.10). Ninguno de los haplotipos identificados en las variedades de OCM estudiadas (HP01 – HP21) fue compartido con las ovejas de razas comerciales previamente reportadas.

**Cuadro 3.3.9.** Sitios polimórficos observados en el *D-Loop* de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas y ovejas de razas comerciales de origen europeo (Haplogrupo B)

Tipo de cambio	Sustitución nucleotídica	Nº de sitios	Nº de eventos	Porcentaje	Nº de sitios totales	Porcentaje
Transición	T por C	36	141	34.62	98	95.15
	C por T	20	107	19.23		
	A por G	28	64	26.92		
	G por A	14	55	13.46		
Transversión	G por T	2	2	1.92	5	4.85
	T por A	1	25	0.96		
	A por T	1	1	0.96		
	C por A	1	1	0.96		
<b>Total</b>			<b>396</b>	<b>100</b>	<b>103</b>	<b>100</b>

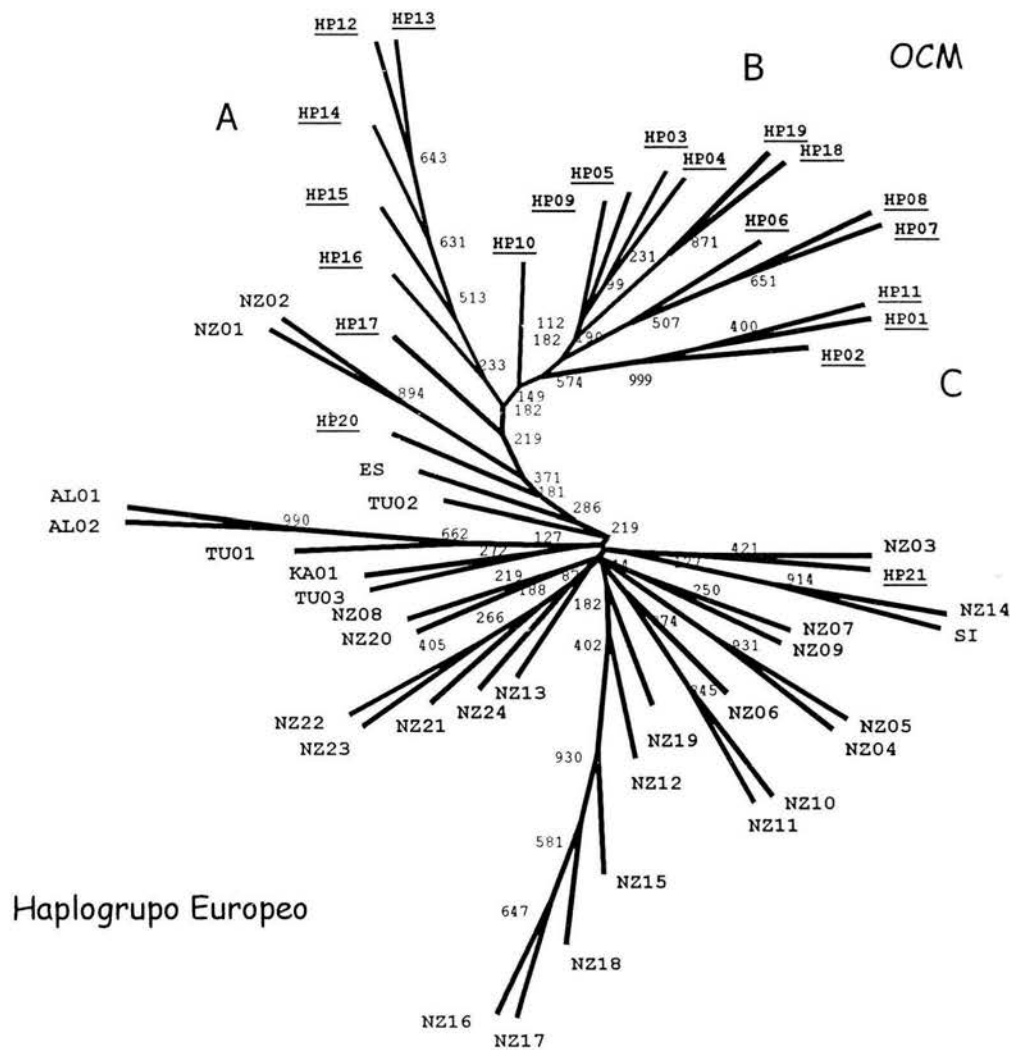




Continuación cuadro 3.3.10.

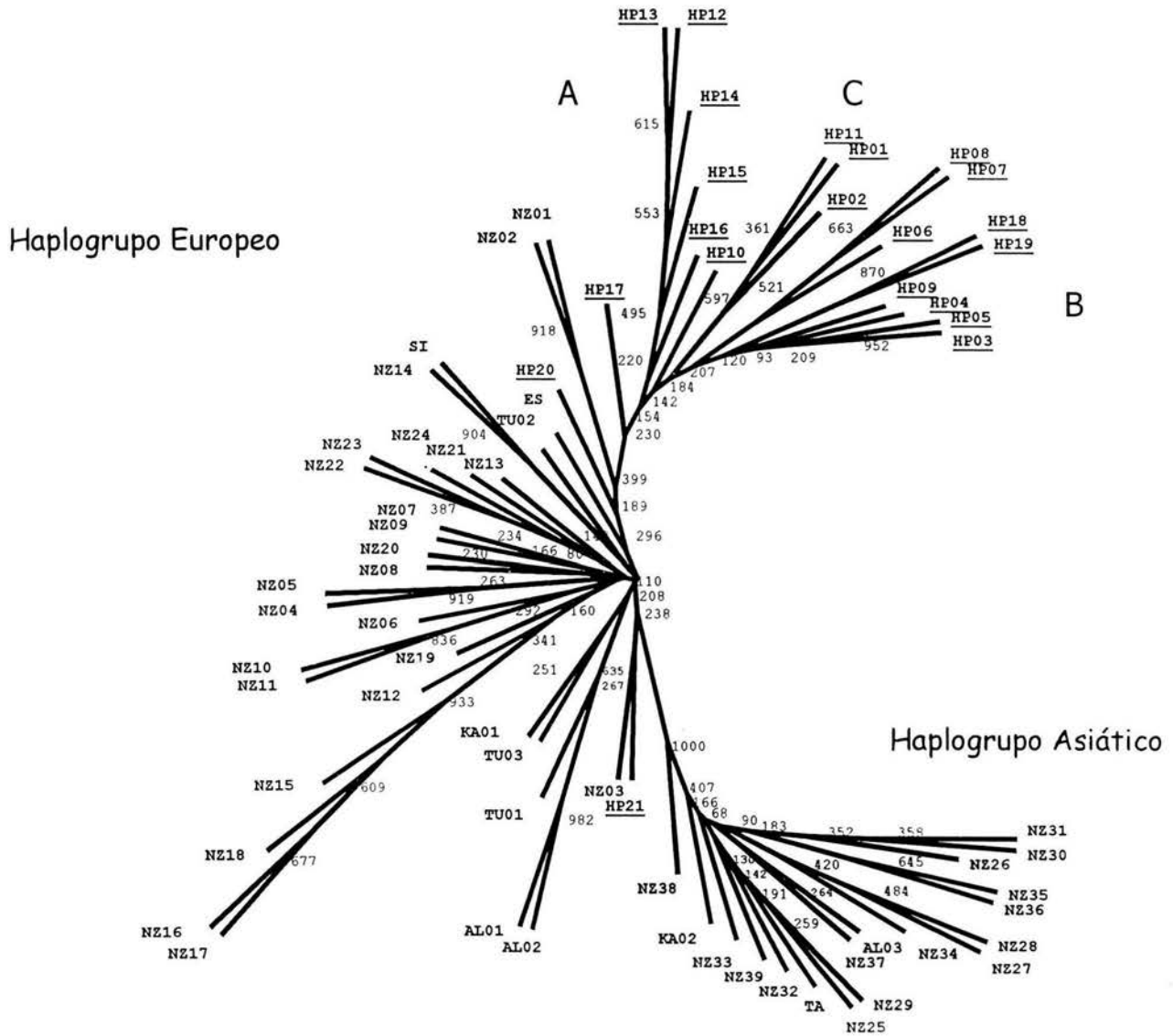
HP	SECUENCIA	16048	16097	16128	16130	16144	16147	16165	16192	16195	16217	16222	16238	16244	16264	16273	16343	16344	16357	16358	16393	16401	16427	16445	16454	16472-73	16502	16546	16571	16602
00	TU01	T	A	T	A	C	T	G	T	T	C	A	T	A	C	T	C	C	G	A	T	G	T	C	G	T	T	C	A	C
01	OCC01											G	G	T									G	T	-					
02	OCC09, OCC15, OCC17, OCP06, OCP13, OCP14											G	G	T									G	-						
03	OCV03							C				G	G	T									G	-						
04	OCP05, OCP07, OCP10											G	G	T									G	-						
05	OCC27, OCC34											G	G	T									G	-						
06	OCV01											G	T										G	-						
07	OCM01, OCHV34											G	T										G	-						
08	OCM02, OCM05											G	T										G	-						
09	OCHV29											G	G	T									G	-						
10	OCHV30											G	G	T									G	-						
11	OCP04											G	G	T									G	-						
12	OCC16, OCV02											G	G	T									G	-						
13	OCC37											G	G	T									G	-						
14	OCC39											G	G	T									G	-						
15	OCP01											G	G	T									G	-						
16	OCH01											G	G	T									G	-						
17	OCP02, OCP03											G	G	T									G	-						
18	OCHV28											G	G	T									G	-						
19	OCHV33											G	G	T									G	-						
20	OCC40											G	G	T									G	-						
21	OCH02	G								T		G	T										G	-						
22	NZ01			T								G	G	T	A								G	-	C					
23	NZ02			T								G	G	T	A								G	-	C					
24	NZ03											G	T	A									G	-	C					
25	TU03				C						T	G	T										G	-						
26	KA01					A						G	T										G	A	-	T				
27	TU02	C										G	T										G	-			G			
28	NZ04											G	T	A									G	-	C					
29	NZ05											G	T	A									G	-	C					
30	NZ06											G	T	A									G	-	C					T
31	NZ07											G	T	A									G	-	C					
32	NZ08									T		G	T	A								C	G	-	C					
33	NZ09										G	G	T	A									G	-	C					
34	NZ10											G	T	A				A	G				G	-	C					
35	NZ11											G	T	A									G	-	C					
36	NZ12											G	T	A				A	G				G	-	C				T	
37	NZ13											G	T	A									G	-	C					
38	S1									C		G	T	A									G	A	-					
39	NZ14									C		G	T	A									G	-	C					
40	NZ15											G	A										G	-	C				T	
41	NZ16											G	A									C	G	-	C				T	
42	NZ17											G	A									C	G	-	C				T	
43	NZ18											G	A										G	-	C				T	
44	NZ19			G								G	T	A									G	-	C				T	
45	AL01		C									G	T		T	-							G	-						
46	AL02		C									G	T		T	-							G	-						
47	NZ20											G	T	A								C	A	G	-		C			T
48	ES											G	G	T									G	-						
49	NZ21											G	T	A									G	A	-	C				
50	NZ22											G	T	A									G	A	-	C				
51	NZ23											G	T	A									G	A	-	C				
52	NZ24											G	T	A									G	-	C					T
Consenso		t	a	t	a	c	t	g	t	t	c	a	g	a	t	t	c	c	g	a	t	g	g	c	g	-	t	c	a	c

Con el fin de evaluar el origen de la oveja criolla mexicana se construyeron dendrogramas por el método de “Neighbor-Joining” a partir de los 53 haplotipos del haplogrupo Europeo (incluyendo los 21 haplotipos encontrados en OCM), 18 haplotipos del haplogrupo asiático y 13 secuencias de ovejas silvestres. En el dendrograma construido a partir de los 53 haplotipos europeos, se observó la ubicación de las ovejas criollas mexicanas en una rama separada, a excepción de los haplotipos 20 y 21 que se encontraron dentro de los nodos de ovejas europeas (Figura 3.3.6).



**Figura 3.3.6.** Relaciones filogenéticas de ovejas criollas mexicanas con ovejas del haplogrupo europeo (tipo B) del GenBank. Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de veces que se repite la topología de la rama en 1000 réplicas. Los haplotipos de OCM (HP01 a HP21) se indican en subrayado.

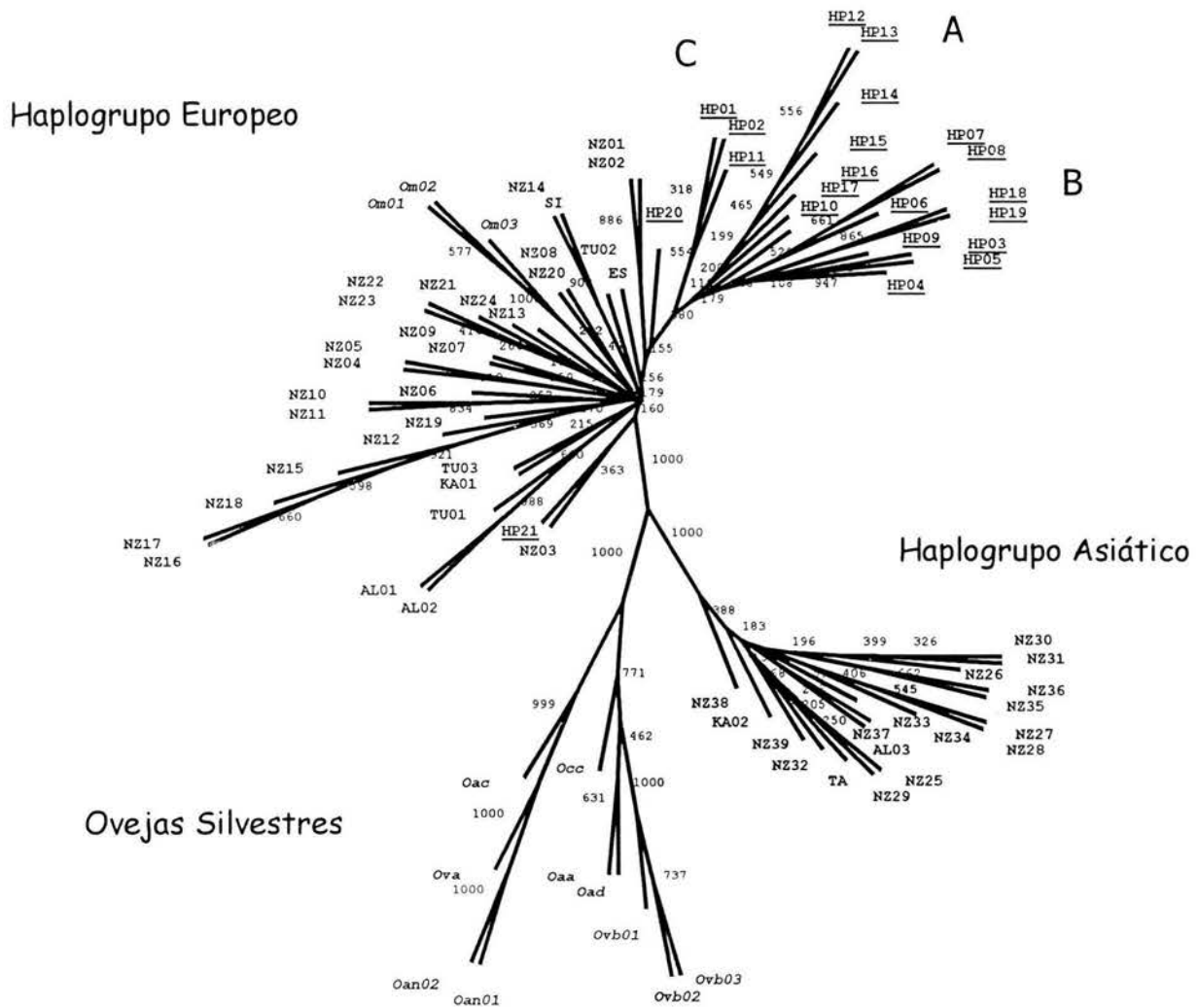
Al representar las relaciones filogenéticas entre los haplogrupos A (asiático) y B (europeo), el dendrograma resultante (Figura 3.3.7) muestra la inclusión de los haplotipos de oveja criolla mexicana dentro del linaje europeo de ovejas domésticas, observándose la misma distribución descrita anteriormente (Figura 3.3.6). Se evidencia la ubicación en un cluster claramente separado de los 18 haplotipos descritos para ovejas del haplogrupo asiático.



**Figura 3.3.7.** Relaciones filogenéticas entre ovejas del linaje europeo, incluidas ovejas criollas mexicanas, y ovejas del linaje asiático. Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de veces que se repite la topología de la rama en 1000 réplicas. Los haplotipos de OCM (HP01 a HP21) se indican en subrayado.



Cuando las secuencias de ovejas silvestres son incorporadas en el análisis, el dendrograma resultante (Figura 3.3.8) muestra una clara diferenciación en clusters separados para ovejas de los haplogrupos europeo y asiático, al igual que las ovejas silvestres de las especies *O. canadensis* (borrego cimarrón), *O. ammon* (argali) y *O. vignei* (urial), con excepción de *O. musimon* (muflón) que se ubicó dentro del cluster de ovejas del haplogrupo europeo. Los haplotipos encontrados en ovejas criollas mexicanas muestran la misma distribución descrita (Figuras 3.3.6 y 3.3.7). La separación de los tres clusters correspondientes a los linajes asiático, europeo y ovejas silvestres es representada con una alta confiabilidad en la topología del árbol.



**Figura 3.3.8.** Relaciones filogenéticas entre ovejas de linajes europeo (incluyendo oveja criolla mexicana), asiático y ovejas silvestres. Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de veces que se repite la topología de la rama en 1000 réplicas. Los haplotipos de OCM (HP01 a HP21) se indican en subrayado. Las ovejas silvestres se indican en cursiva.

Los resultados de las distancias genéticas promedio dentro y entre subpoblaciones de oveja doméstica (OCM, europeas y asiáticas) y silvestres, utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura (1980), se presentan en el cuadro 3.3.11. Estos valores no difirieron de los obtenidos con los modelos de Tamura y Nei (1993) y Tajima y Nei (1982) (Anexo 13). En las subpoblaciones de *O. aries* la mayor distancia dentro de grupos se observó en ovejas europeas, mientras que entre grupos esta fue mayor para las asiáticas en relación a OCM y europeas. En cuanto a las ovejas silvestres, estas presentaron las mayores distancias dentro y entre grupos. La diversidad promedio total fue de  $0.032 \pm 0.003$ . En oveja doméstica, la diversidad promedio dentro de subpoblaciones fue de  $0.007 \pm 0.001$ , la total fue de  $0.021 \pm 0.002$ , y la interpoblacional de  $0.014 \pm 0.002$ . El coeficiente de diferenciación en *O. aries* fue de  $0.654 \pm 0.034$ . Estos valores coincidieron para los tres modelos de distancia utilizados.

**Cuadro 3.3.11.** Distancias genéticas promedio (2 parámetros de Kimura) dentro y entre grupos de secuencias de oveja doméstica y silvestre

Grupo	OCM	Europeas	Asiáticas	Silvestres
<b>OCM</b>	$0.004 \pm 0.001$	-	-	-
<b>Europeas</b>	$0.011 \pm 0.002$	$0.010 \pm 0.001$	-	-
<b>Asiáticas</b>	$0.040 \pm 0.005$	$0.039 \pm 0.005$	$0.007 \pm 0.001$	-
<b>Silvestres</b>	$0.056 \pm 0.005$	$0.059 \pm 0.005$	$0.065 \pm 0.005$	$0.061 \pm 0.005$

En la diagonal se presenta la distancia genética promedio dentro de grupos y el error estándar. Debajo de la diagonal se presenta la distancia genética promedio entre grupos y su error estándar, respectivamente.

En el cálculo de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y polimorfismo nucleotídico ( $\theta$ ) incorporando las secuencias de oveja doméstica (OCM, europeas y asiáticas) y ovejas silvestres en base a 1018 sitios (excluyendo gaps), se obtuvieron valores de  $0.02970 \pm 0.00337$  y  $0.04851 \pm 0.01145$  para  $\pi$  y  $\theta$ , respectivamente. En el análisis considerando únicamente la población total de secuencias de *O. aries* (OCM, europeas y asiáticas) para 1098 sitios (excluyendo gaps), el resultado mostró valores de  $\pi = 0.02001 \pm 0.00143$  y  $\theta = 0.02488 \pm 0.00664$ . La prueba de neutralidad

mediante la prueba de Tajima (Tajima, 1989) da un resultado negativo (-0.67289) no significativo estadísticamente ( $P > 0.1$ ).

Los valores obtenidos de  $\pi$  y  $\theta$  para cada subpoblación fueron, respectivamente:  $0.00378 \pm 0.00060$  y  $0.00633 \pm 0.00241$  en OCM;  $0.00946 \pm 0.00052$  y  $0.01764 \pm 0.00564$  en ovejas europeas; y  $0.00686 \pm 0.00105$  y  $0.01430 \pm 0.00525$  en ovejas asiáticas. Con base en los valores de diversidad nucleotídica ( $(\pi_T - \pi_S / \pi_T) - 1$ ) (Nei and Kumar, 2000) por subpoblación, la contribución a la diversidad genética total de *O. aries* (secuencias) fue de 47 % en europeas, 34 % en asiáticas y 19 % en OCM.

#### IV. DISCUSIÓN

Los diferentes cambios nucleotídicos a lo largo de la secuencia de 1180 pb correspondiente al *D-Loop* completo de *Ovis aries* (Wood and Phua, 1996; Hiendleder *et al.*, 1998b) permitieron identificar 21 haplotipos diferentes (HP01 a HP21) en las 33 ovejas criollas mexicanas analizadas (0.64). El nivel de polimorfismo encontrado es comparable al reportado por Wood y Phua (1996) quienes investigando la cantidad y distribución de la variabilidad en la secuencia del *D-Loop* de *O. aries*, identificaron 39 haplotipos diferentes (24 europeos –B- y 15 asiáticos –A-). Ellos analizaron las secuencias de 50 animales (0.78) de cuatro razas europeas (Merino, Romney, Coopworth y Perendale-Rommey), una de ellas compuesta. En cambio, en análisis RFLP's del *D-Loop* realizados por Hiendleder *et al.* (1998a) para investigar los orígenes y relaciones filogenéticas de la oveja doméstica, se identificaron tan sólo 14 haplotipos diferentes (entre asiáticos y europeos) en 243 ovejas (0.058) de cinco razas europeas (Merinolandschaf, East Friesian Milk Sheep, Rhoenschaf, Schwarzkoepfiges Fleischschaf y Skudde), una africana (Awassi) y cuatro asiáticas (Camerún, Edilbey, Gizarr y Astrachan). Por tanto, los 21 haplotipos encontrados en este estudio sugieren la existencia de un alto grado de diversidad genética en las variedades de OCM, comparable a otras razas en conjunto.

Todos los haplotipos identificados en OCM presentaron 4 repetidos en tandem de 75 nt cada uno, lo cual concuerda con lo reportado por Wood y Phua (1996) y Hiendleder *et al.* (1998b) para el ADNmt europeo (haplogrupo B). La frecuencia nucleotídica en la secuencia consenso fue de: 32.97 % A, 22.46 % C, 14.49 % G y 30.08 % T; semejando los valores reportados por Hiendleder *et al.* (2002) para la frecuencia nucleotídica en *Ovis* estandarizada a 2 repetidos en tandem de: 31.9 % A, 24 % C, 14.6 % G y 29.5 % T.

El haplotipo más frecuente fue HP02 (18.18 %) en 6 ovejas criollas: 3 de Chiapas y 3 de Puebla, seguido por el haplotipo HP04 (9.09 %) con 3 ovejas criollas de Puebla. Hubo 5 haplotipos con 2 ovejas cada uno (6.06 % c/u). Los 14 haplotipos restantes estuvieron representados por una sola oveja (3.03 % c/u). En cuanto a la distribución geográfica, cinco haplotipos fueron únicos de Chiapas, cuatro de Puebla, uno de Morelos, dos de Hidalgo, dos de Veracruz y cuatro de Hidalgo-Veracruz. Hubo tres haplotipos compartidos entre regiones. Por tanto, hubo un 85.7 % de haplotipos únicos de región (18/21) y un 14.3 % de haplotipos compartidos entre regiones (3/21).

El análisis filogenético entre los 21 haplotipos encontrados en OCM y los haplotipos previamente descritos en ovejas de razas comerciales del haplogrupo europeo y depositados en la base de datos del GenBank, permitió identificar 53 haplotipos totales. Los haplotipos encontrados en OCM fueron descritos por primera vez, no encontrándose en ovejas de razas comerciales. Se observaron 103 sitios polimórficos (8.73 % de polimorfismo) de los cuales 53 sitios (51.46 %) se presentaron en la zona de repetidos. Esto se puede comparar con lo encontrado por Wood y Phua (1996), quienes en 50 secuencias del *D-Loop* identificaron 121 sitios variables (10.25 % de polimorfismo) con 58 de ellos (47.93 %) mostrándose en la zona de repetidos, considerando que estos autores incluyeron en sus análisis a animales representantes de ambos haplogrupos mitocondriales ovinos, es decir, asiático y europeo.

Por otra parte, se evidenció que las OCM se agrupan formando un subcluster separado del resto de las ovejas de tipo europeo, lo cual puede sugerir que los ancestros (haplotipos) de las poblaciones de OCM no participaron en la formación de las razas comerciales modernas y representan una población única, previamente no descrita.

En el subcluster de OCM se pueden apreciar tres nodos de diferenciación genética. El nodo A agrupó a haplotipos encontrados en Chiapas, Puebla, Hidalgo y Veracruz; y en el nodo B se observaron haplotipos encontrados en Veracruz, Puebla, Chiapas, Morelos e Hidalgo-Veracruz. El nodo C agrupó sólo haplotipos encontrados en Chiapas y Puebla. Fuera de estos nodos, pero incluidos dentro del subcluster de OCM, se ubicó un haplotipo de Hidalgo-Veracruz y uno de Puebla. Se observó que dos haplotipos, uno de Chiapas y uno de Hidalgo, fueron los únicos de OCM localizados cercanos a las secuencias de ovejas de razas comerciales europeas; el primero cercano al subcluster de OCM y próximo a una oveja Rasa Aragonesa (ES), mientras el segundo se ubicó alejado del resto de haplotipos de OCM. La posición de estos dos haplotipos en el dendrograma puede deberse a cruzamiento de ovejas criollas con animales de razas comerciales introducidas, o bien pueden corresponder con haplotipos ancestrales que participaron en la formación de algunas razas modernas.

Como puede evidenciarse, no se observó una tendencia en la distribución geográfica de los haplotipos de OCM, lo cual puede ser el resultado del flujo de genes de diferentes razas autóctonas españolas introducidas en la época de la conquista, que luego pudieron distribuirse por el territorio, formando un “mosaico genético” que actualmente conocemos como oveja criolla. También debe considerarse cierto grado

de interrelación genética existente entre las ovejas autóctonas españolas introducidas en la época de la conquista. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Arranz *et al.* (2001) mediante el empleo de microsatélites, en donde sugieren un flujo de genes entre la raza Churra y otras razas de ovejas españolas: Castellana, Rasa Aragonesa y Merino, mostrado por la presencia de varios animales esparcidos dentro de los grupos de las otras razas. Por otra parte, se debe tomar en cuenta el efecto del transporte de animales criollos de un estado a otro para ser utilizados como pie de cría, ya que debido a su resistencia y adaptabilidad en comparación con las razas comerciales, es preferido por ovinocultores que manejan sistemas extensivos tradicionales.

Cuando en el análisis filogenético se incorporan las secuencias de ovejas de razas comerciales de haplogrupo asiático, el dendrograma resultante evidenció dos principales líneas de ascendencia materna: el linaje europeo y el linaje asiático. Esta genealogía concuerda con lo descrito previamente en los trabajos realizados por Wood y Phua (1996) basados en la secuencia completa del *D-Loop*; y Hiendleder *et al.* (1998a, 1999) mediante análisis RFLP's, PCR-RFLP's y secuenciación del *D-Loop* completo (1998b). Este patrón bifilético en los orígenes de animales domésticos no es raro. Los dos distintos linajes, el europeo y el asiático, también han sido identificados en bovinos (Loftus *et al.*, 1994; Bradley *et al.*, 1996), cerdos (Watanobe *et al.*, 1999; Giuffra *et al.*, 2000) y búfalos (Tanaka *et al.*, 1996; Lau *et al.*, 1998).

Los valores de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y polimorfismo nucleotídico ( $\theta$ ) obtenidos en cada subpoblación de *O. aries*, muestran la existencia de una mayor diversidad en ovejas europeas, seguida por ovejas asiáticas y ovejas criollas mexicanas. A este respecto, Piper y Ruvinsky (1997) señalan que las regiones de Europa, Asia y el Pacífico son las más ricas en términos de "diversidad racial", en donde juntas suman más del 70 % de las razas documentadas mundialmente. Mientras que América Latina, Norte América y el Caribe son las regiones con el menor número de razas. Sin embargo, hablando en términos de diversidad nucleotídica, la OCM exhibe un valor considerable tomando en cuenta que representa a una sola raza ovina local con diferentes variedades en base a su localización geográfica, en comparación de las (no menos de) 12 razas de origen europeo y 7 de origen asiático con secuencias reportadas actualmente. Basándonos en estos resultados, la contribución a la diversidad genética total estudiada (secuencias) de *O. aries* es de 47 % en europeas, 34 % en asiáticas y 19 % en OCM.

En la población total estudiada de *O. aries* (OCM, europeas y asiáticas), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue de 0.02001 y el polimorfismo nucleotídico ( $\theta$ ) de



0.02488. La prueba de neutralidad dio un resultado negativo, lo que sugiere “selección purificadora”, es decir, se están eliminando alelos mutantes en la población. Sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo ( $P > 0.1$ ) por lo que no se puede rechazar la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras (Kimura, 1983).

Recientemente, Hiendleder *et al.* (2002) fortalecen los estudios previos sobre el origen de *O. aries*, incorporando un mayor número de secuencias en los análisis e incluyendo secuencias de las especies silvestres Muflón (*O. musimon*), Urial (*O. vignei*), Argali (*O. ammon*) y borrego Cimarrón (*O. canadensis*). Ellos evidenciaron, como lo reportado por Hiendleder *et al.* (1998a), que los haplotipos de Muflón se incluyen dentro del cluster de ovejas domésticas con mitocondria europea, sugiriendo que diferentes subespecies de Muflón pudieron haber participado en el origen de la oveja doméstica. Este mismo patrón de agrupación del Muflón dentro del linaje europeo de *O. aries* se pudo observar en nuestro trabajo al incorporar las secuencias de ovejas silvestres en el análisis filogenético.

Los 21 haplotipos encontrados en este trabajo se ubicaron dentro del conjunto de ovejas del linaje europeo o haplogrupo B, lo cual apoya el origen europeo de la oveja criolla mexicana (Matesanz, 1965; Saucedo, 1984), específicamente de las ovejas de razas españolas autóctonas tales como Churra, Lacha, Manchega, Rasa Aragonesa y Canaria (Pedraza *et al.*, 1992; Perezgrovas, 1998), mencionándose también la participación de la raza Merino (Gómez, 1978; Perezgrovas, 1990). Estos haplotipos se ubicaron –como se mencionó previamente– en un grupo separado, lo cual sugiere que la OCM corresponde a un linaje genético divergente de las ovejas de razas comerciales. Sin embargo, deben considerarse varios aspectos, entre ellos que las variedades de OCM podrían ser más semejantes genéticamente a las razas autóctonas españolas que llegaron al continente hace aproximadamente 500 años, que a las mismas razas contemporáneas. Otro factor a destacar es la ausencia de secuencias del *D-Loop* de razas autóctonas españolas en la base de datos del GenBank, encontrándose tan sólo una secuencia de oveja rasa aragonesa (Zardoya *et al.*, 1995), la cual se ubicó cercana al subcluster de OCM. Evidentemente, este panorama podría ser mejor explicado al aumentar el volumen de secuencias para realizar las comparaciones.

La distribución y localización de los haplotipos de OCM en el análisis filogenético nos sugiere que estas poblaciones tienen alelos diferentes y únicos en comparación con ovejas de razas comerciales. Estos resultados son un punto de partida para el estudio de la oveja criolla en México y la implementación paralela de programas de



conservación genética de éste y otros recursos genéticos animales locales, bien sea a través de la preservación de poblaciones vivas (*in situ*) o la criopreservación de gametos o embriones (*ex situ*). Las especies criollas bien adaptadas son un recurso favorable para los países en desarrollo, en donde el mejoramiento genético de estas debe estar en compatibilidad con el medio ambiente en el que se desenvuelven. Las poblaciones criollas de ovejas son una fuente de variación genética útil en la investigación genómica para el mapeo, identificación y manipulación de genes individuales involucrados en procesos biológicos asociados a la producción, y este conocimiento potencial estaría en grave riesgo de perderse si la diversidad de las poblaciones fuera seriamente reducida.

Para todo ello se requiere de programas nacionales y esfuerzos regionales para la descripción y monitoreo de las variedades de oveja criolla mexicana existentes, su caracterización a nivel molecular para establecer las relaciones genéticas entre ellas, el desarrollo de una base de datos nacional, la provisión de guías e información para la preservación (*in situ* y *ex situ*), eventos con fines de conservación y la comunicación con las comunidades a fin de dar a conocer la importancia de proteger este recurso genético. Todos estos aspectos deben ser cuidadosamente tratados ya que el mantenimiento de las razas locales puede ser percibido como un “impedimento al progreso” por los criadores. Sin embargo, el desarrollo de políticas nacionales puede influenciar grandemente el curso de este tipo de programas y, por ende, de la diversidad genética en la oveja criolla mexicana y otras especies locales en los próximos años.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las poblaciones de OCM presentan una alta diversidad genética, sin embargo, se requiere de la realización de más estudios a nivel molecular. En este sentido, a pesar de que la genética molecular de la oveja está en sus inicios, existe cierto número (más de 250) de marcadores microsatélites disponibles (recopilados en *The Genetics of Sheep*, de Piper and Ruvinsky, 1997). La información genética obtenida por loci microsatélites sería una herramienta útil para estudiar las diversas poblaciones de oveja criolla mexicana, mediante el análisis basado en los genotipos en forma individual y las interrelaciones genéticas entre las variedades de acuerdo a su localización geográfica, pudiendo determinar además el grado de diferenciación. Las distancias entre individuos basadas en la proporción de alelos compartidos permitirían la construcción de dendrogramas mostrando gráficamente las relaciones genéticas entre las diversas variedades, caracterizar la diversidad existente dentro y entre subpoblaciones, identificar si han ocurrido cruzamientos entre ellas y asignar individuos a grupos genéticamente

similares en la población. Esta información nos conduciría, conjuntamente con los resultados de nuestro trabajo, a obtener un conocimiento más amplio y dinámico de la oveja criolla mexicana, así como la contrastación con datos de marcadores genéticos derivados de razas autóctonas españolas para tener una visión más objetiva sobre esta interesante especie local.

## V. CONCLUSIONES

- Se identificaron 21 haplotipos en la secuencia del *D-Loop* completo de las variedades de oveja criolla mexicana estudiadas.
- Se evidenció un grado de diversidad genética considerablemente alto en las variedades de oveja criolla mexicana analizadas (63.64 %), la cual probablemente no se encuentre en poblaciones comerciales.
- Los haplotipos encontrados en ovejas criollas mexicanas no habían sido descritos previamente en ovejas de razas comerciales y pertenecen a un linaje genético divergente de estas.
- Se encontró que la diversidad nucleotídica observada en las variedades de oveja criolla mexicana, constituye el 19 % de la diversidad nucleotídica total actualmente descrita en *Ovis aries*.
- Los resultados del análisis filogenético confirman el origen europeo de la oveja criolla mexicana, ubicando todos los haplotipos identificados dentro del linaje europeo de oveja doméstica.
- Los datos obtenidos muestran que la oveja criolla mexicana puede ser considerada como un importante reservorio de biodiversidad, en el cual debería evaluarse el potencial productivo para que eventualmente pueda ser empleado como fuente de nuevos alelos que podrían enriquecer a las poblaciones comerciales.

Esta tesis corresponde a los estudios realizados  
con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores  
del gobierno de México.

## VI. LITERATURA CITADA

- Aling 1.62. Scientific and Educational Software. PA, USA.
- Arranz J.J., Bayón Y. and F. San Primitivo. 2001. Differentiation Among Spanish Sheep Breeds Using Microsatellites. *Genet. Evol.* 33: 529-542
- Avise J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Ed Chapman & Hall. New York. USA. 511 pp.
- Boyle J.S. and A.M. Lew. 1995. An Inexpensive Alternative to Glassmilk for DNA Purification. *Trends in Genetics.* 11, 8.
- Bradley D.G., MacHugh D.E, Cunningham P. and R.T. Loftus. 1996. Mitochondrial Diversity and the Origins of African and European Cattle. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5131-5135.
- Brown W.M., George M. and A.C. Wilson. 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1967-1971.
- Brown W.M., Prager A., Wang A. and A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-239
- Chen H. and F. Leibenguth. 1995. Restriction Endonuclease Analysis of Mitochondrial DNA of Three Farm Animal Species: Cattle, Sheep and Goat. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 111(4): 643-649.
- Chromas. version 1.62. available at: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- Corpet F. 1988. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucleic Acids Research;* 16(22):10881-10890. available at: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>
- Darnell J., Lodish H. and D. Baltimore. 1980. Molecular Cell Biology. Ed Omega S.A. 118 pp.
- Diez-Tasco C., Littlejohn R.P., Almeida P.A.R. and A.M. Crawford. 2000. Genetic Variation Within the Merino Sheep Breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics.* 31: 243-251
- DNAsis 2.6 for Windows. Contig manager. DNA and Protein Sequence Analysis System. Hitachi Software Engineering CoLTD.
- Erlich, P.R. and E.O. Wilson. 1991. Biodiversity studies: science and policy. *Science*, 253:75
- FAO. 2002. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS). Available at: <http://www.fao.org.dadis/index.htm>
- Felsenstein J. 1995. Phylogeny Inference Package *PHYLIP*, version 3.57c. Executables for PC. University of Washington, Seattle, USA.

- Giuffra E., Kijas J.M., Amarger V., Carlborg O., Jeon J. and L. Anderson. 2000. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics*. 154: 1785-1791.
- Gómez Q.J.M 1978. Perspectivas del Desarrollo Ovino en el Estado de Chiapas. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México D.F. México.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hiendleder S. 1998. A Low Rate of Replacement Substitutions in Two Major *Ovis aries* Mitochondrial Genomes. *Animal Genetics*. 29(2): 116-22.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. and H. Lewalski. 1998a. Analysis of Mitochondrial DNA Indicates that Domestic Sheep are Derived from Two Different Ancestral Maternal Sources. No Evidence for Contributions from Urial and Argali Sheep. *Journal of Heredity*. 89: 113-120.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R. and A. Janke. 1998b. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *Journal of Molecular Evolution*. 47: 441-448.
- Hiendleder S., Phua H.S. and W. Hecht. 1999. A Diagnostic Assay Discriminating Between Two Major *Ovis aries* Mitochondrial DNA Haplogroups. *Animal Genetics*. 30: 211-213.
- Hiendleder S., Kaupe B. and R. Wassmuth. 2002. Molecular Analysis of Wild and Domestic Sheep Questions Current Nomenclature and Provides Evidence for Domestication from Different Subspecies. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269:893-904.
- Huchinson C.A., Newbold J.E., Potter S.S. and M.H. Edgell. 1974. Maternal Inheritance of Mammalian Mitochondrial DNA. *Nature*. 251: 536.
- Karp G. 1987. *Biología Celular*. Ed McGraw Hill. México. 950 pp.
- Kikkawa Y., Amano T. and H. Suzuki. 1995. Analysis of Genetic Diversity of Domestic Cattle in East and Southeast Asia in Terms of Variation in Restriction Sites and Sequences of Mitochondrial DNA. *Biochem. Genet.* 33: 51-60.
- Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequence. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Kirby R. 1995. Genetic Diversity, Conservation and Sustainable Utilization. *Genetic Engineering and Biotechnology Monitor*. 2: 1-7.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics (submitted).

- Lan H. and L. Shi. 1993. The Origin and Genetic Differentiation of Native Breeds of Pigs in Southwest China: An Approach from Mitochondrial DNA Polymorphism. *Biochemical Genetics*. 31: 51-60.
- Lau C.H. *et al.* 1998. Genetic Diversity of Asian Water Buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial *D-loop* and cytochrome b sequence variation. *Anim. Genet.* 29: 253-264.
- Loftus T.R., Machugh E.D., Bradley G.D., Sharp M.P. and P. Cunningham. 1994. Evidence for Two Independent Domestication of Cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 2757-2761.
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J. D., Bouvet J. and P. Taberlet. 2001. Multiple Maternal Origins and Weak Phylogeographic Structure in Domestic Goats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(10): 5927-5932.
- MacHugh E.D. and G.D. Bradley. 2001. Livestock Genetic Origins: goats buck the trend. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(10):5382-5384.
- Margush T. and F.R. McMorris. 1981. Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology*. 43: 229-24.
- Martínez J.L. 1983. Pasajeros de Indias. 1ra Ed. Alianza Editorial S.A. Madrid, España.
- Matesanz J. 1965. Introducción de la Ganadería en Nueva España 1521- 1535. El Colegio de México. *Historia Mexicana*. 56: 533-566
- McLeod M.J. 1973. Spanish Central America: a socioeconomic history. California University. EUA. 1520-1720.
- Medrano J.A. 2000. Animal Genetic Resources from the Centre of Mexico. *Arch. Zootec.* 49: 385-390.
- Miller S.A., Dykes D. and H.F. Polesky. 1989. A Simple Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1216.
- Murray B.W., McClymont R.A. and C. Strobeck. 1995. Forensic Identification of Ungulate Species Using Restriction Digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. *J Forensic Sci.* 40(6): 943-951.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY. USA.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Page R.D. 1996. Tree View : an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 12:357-8.
- Pedraza P., Peralta M. y R. Perezgrovas. 1992. El Borrego Chiapas: una raza local mexicana de origen español. *Arch. Zootec.* 41(extra): 355-362.



- Pegoraro L., Yang Z., Samake S., Meirelles F.V., Bordignon V., Moquin L.C. and L.C. Smith. 1996. Sequence Comparison of Mitochondrial tRNA Genes and Origin of Light Strand Replication in *Bos taurus* and Nellore (*Bos indicus*) Breeds. *Animal Genetics*. 27(2): 91-94.
- Peñalosa R y F. Salamanca. 1994. Los Marcadores Genéticos y sus Aplicaciones en Biomedicina. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 41:5-9.
- Perezgrovas G.R. 1990. Los Carneros de San Juan; Ovinocultura Indígena de los Altos de Chiapas. Raúl Perezgrovas Garza Editor. Centro de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas. México. 374 pp.
- Perezgrovas G.R. y G.H. Castro. 2000. El Borrego Chiapas y el Sistema Tradicional de Manejo de Ovinos entre las Pastoras Tzotziles. *Arch. Zootec.* 49:391-403.
- Primer Designer version 1.02. 1990. Scientific and Educational Software.
- Ramey R.R. 1995. Mitochondrial DNA Variation, Population Structure, and Evolution of Mountain Sheep in the South-western United States and Mexico. *Mol. Ecol.* 4(4): 429-439.
- Rozas J. and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*. 15: 174-175.
- Rus A. 1993. Evolution by Turnover in the Control Region of Vertebrate Mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetics and Development*. 3: 891-895.
- Ryder M.L. 1984. Sheep. In: Mason S.L. (ed) *Evolution of Domesticated Animals*. Longman, London and New York, 63-85.
- SAGARPA. 2002. Informe sobre la Situación de los Recursos Genéticos Pecuarios (RGP) de México. 50 pp.
- Saitou N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Saitou N. and T. Imanishi. 1989. *Molecular Biology and Evolution*. 6:514-525.
- Sarmiento T. J. y G.R. Perezgrovas. 1990. Caracterización Fenotípica de la Oveja Criolla de los Altos de Chiapas. Memorias. III Congreso Nacional de Producción Ovina. AMTEO. Tlaxcala, Tlax. 35-39.
- Saucedo M.P. 1984. Historia de la Ganadería en México. 1ra Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección General de Publicaciones. México D.F.
- Shackleton, D.M. (ed.) and the IUCN/SSC Caprinae Specialist Group 1997. Wild Sheep and Goats and their Relatives. Status Survey and Conservation Action Plan for Caprinae. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources.
- Sneath P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. WH Freeman, San Francisco, USA.

- Tajima, F. 1989a. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Tajima, F. 1989b. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 597-601.
- Tajima, F. and M. Nei. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1:269-285.
- Takesaki N. and M. Nei. 1984. Genetic Distance and Reconstruction of Phylogenetic Trees from Microsatellite DNA. *Genetics*. 144: 389-399.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Tanaka K., Yamagata T. and J. Masangkay. 1995. Nucleotide Diversity of Mitochondrial DNA between Swamp and the River Types of Domestic Water Buffaloes, based on Restriction Endonuclease Cleavage Patterns. *Biochemical Genetics*. 33: 137-147.
- Tanaka K., Solis C.D., Masangkay J.S., Maeda K., Kawamoto Y. and T. Namikawa. 1996. Phylogenetic Relationship among all Living Species of the Genus *Bubalus* based on DNA Sequences of the Cytocrome b gene. *Biochem. Genet.* 34: 443-452.
- Tateno Y., Takezaki N. and M. Nei. 1994. *Molecular Biology and Evolution* (in Press).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Upholt W.B. and I.B. Dawid. 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the *D-loop* region. *Cell*. 11(3): 571-583.
- Villacorta C.J.A. 1942. *Historia de la Capitanía General de Guatemala*. Tipografía Nacional. Guatemala.
- Villalta M., Fernandez-Silva P., Beltran B., Enguita L., López-Pérez M.J. and J. Montoya. 1992. Molecular Characterization and Cloning of Sheep Mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* 21(3): 235-240.
- Watanobe T., Hayashi Y., Ogasawara N. and T. Tomita. 1985. Polymorphism of Mitochondrial DNA in Pigs Based on Restriction Endonuclease Patterns. *Biochemical Genetics*. 23: 105-113.
- Watanobe T., Hayashi Y., Kimura J., Yasuda Y. and N. Saitou. 1986. Pig Mitochondrial DNA: Polymorphism, Restriction Map Orientation and Sequence Data. *Biochemical Genetics*. 24: 385-396.

- Watanobe T., Okumura N. and N. Ishiguro. 1999. Genetic Relationship and Distribution of the Japanese Wild Boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu Wild Boar (*Sus scrofa riukiuanus*) Analysed by Mitochondrial DNA. *Mol Ecol.* 8:1509-1512.
- Wen-Hsiung Li. 1997. Molecular Evolution. Ed Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts, USA. 487 pp.
- Wood N.J. and S.H. Phua. 1996. Variation in the Control Region Sequence of the Sheep Mitochondrial Genome. *Animal Genetics.* 27(1): 25-33.
- Worley K. Human Genome Center, Baylor Collage of Medicine. Available at: (<http://searchlauncher.bcm.tcm.edu/seq-util/readseq.html>).
- Zardoya R., Villalta M., López-Pérez M.J., Garrido-Pertierra A., Montoya J. and J.M. Bautista. 1995. Nucleotide Sequence of the Sheep Mitochondrial *D-loop* and its Flanking tRNA Genes. *Curr. Genet.* 28: 94-96.
- Zeuner F.E. 1963. A history of Domesticated Animals. Hutchinson, London.
- Zhao X.B., Chu M.X., Li N., Gong G.C. and C.X. Wu. 2001. PCR-SSCP and sequencing analysis on 5' terminal region of mtDNA control region in sheep. *Yi Chuan Xue Bao.* 28(3): 225-228.

## ANEXOS

### **Anexo 1:** Purificación de ADN total a partir de sangre periférica

Emplear 1 ml de sangre y hacer 2 a 3 lavados con un volumen de agua desionizada estéril fría. Para cada lavado, centrifugar a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) por 10 min.

Resuspender perfectamente el botón celular con 500  $\mu$ l de la solución de lisis, añadir RNasa a una concentración final de 10 $\mu$ g/ml e incubar por 1 hora a 37°C. Al término de esta incubación adicionar proteinasa K a una concentración de 50 $\mu$ g/ml e incubar a 55°C por un mínimo de 2 horas.

Agregar cloruro de sodio a una concentración final de 2M y centrifugar 10 min. a 12,000 rpm. Recuperar cuidadosamente el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, precipitar el ADN con un volumen de isopropanol frío al 100%. La pastilla se recupera por centrifugación durante 10 min. a 12,000 rpm.

Realizar 2 lavados a la pastilla de ADN con 500 $\mu$ l de etanol frío al 70% utilizando las mismas condiciones de centrifugación. La pastilla recuperada se seca en ThermoBlock a 55°C durante 25 minutos aproximadamente.

Finalmente la pastilla de ADN se resuspende en 200 $\mu$ l en H<sub>2</sub>O dd estéril, se cuantifica y diluye a una concentración de 20 ó 50ng/ $\mu$ l en tubos eppendorf de 0.5 ml. Almacenar en congelación hasta su utilización.

#### **Soluciones necesarias:**

**Solución de lisis:** Tris-HCL pH 8.0, 400mM NaCl, 20mM EDTA, 0.5% SDS.

**Rnasa:** (20mg/ml)

**Proteinasa K:** (50mg/ml).

## **Anexo 2:** Preparación de geles de agarosa

Agarosa al 1 %: colocar 1g de agarosa en 100 ml de TBE 1X, calentar en baño María hasta que la agarosa se disuelva totalmente. Adicionar la agarosa ya disuelta y aún caliente en un carrito para cámara de electroforesis con el peine ya incorporado, dejando polimerizar el gel.

Agarosa al 0.8 %: colocar 0.8 g de agarosa en 100 ml de TBE 1X (ó TAE 1X) y seguir el mismo procedimiento indicado.

Agarosa al 3.0 %: colocar 3.0 g de agarosa en 100 ml de TBE 1X y seguir el mismo procedimiento indicado.

Agarosa con bromuro de etidio: realizar el procedimiento descrito para la preparación de la agarosa a la concentración deseada y añadir 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 100 ml de agarosa y mezclar agitando suavemente. Almacenar en recipiente protegido de la luz.

Luego de finalizada la electroforesis y corridas las muestras empleando buffer de muestra 1X, teñir el gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml y visualizar por UV.

### **Soluciones necesarias:**

**TBE 5 X:** 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5 molar pH 8.0. Aforar a un volumen de 1000 ml con agua destilada estéril.

**TAE 50X:** 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 molar pH 8.0. Aforar a un volumen de 1000 ml con agua destilada estéril.

**Bromuro de Etidio 0.5 µg/ml:** disolver 25 µl de bromuro de etidio a 10 mg/ml (50 mg de bromuro de etidio en 5 ml de agua estéril) en 500 ml de agua estéril

**Buffer de muestra 5X:** EDTA 0.2 M, Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0.1 %.

### Anexo 3: Cuantificación de ADN

- 1.- Preparar la solución estándar de calibración, colocar 2 ml de esta solución en una cubeta de vidrio como blanco, ponerla dentro del fluorómetro (Hoefer, DyNA Quant 200) y presionar <ZERO>. Cuando la pantalla indique cero remover la cubeta.
- 2.- Calibrar el fluorómetro diluyendo 2 $\mu$ l del ADN estándar (ADN  $\lambda$  100ng/ml) en 2 ml de la solución estándar, presionar el botón de <CALIB>, indicar el valor de calibración (100 ng/ $\mu$ l) y presionar el botón <ENTER> para aceptar la instrucción.
- 3.- Para la lectura de cada muestra problema, se utiliza el blanco para llevar a cero el aparato. Emplear 2 $\mu$ l de la muestra por cada 2 ml de la solución estándar, haciendo las repeticiones que sean necesarias para cada muestra.

#### **Soluciones necesarias:**

**Buffer TNE 10X:** 12.11 g de Tris (100 mM), 3.72 g de EDTA (10 mM), 116.89 g de NaCl (2M). Disolver en 800 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 con HCL concentrado. Aforar a 1000 ml con agua destilada.

**Solución estándar:** 10  $\mu$ l de la solución stock H 33258 (1mg/ml), 10 ml de TNE 10X y 90 ml de agua destilada estéril. Almacenar a 4°C en envase ámbar.

**Solución Stock de Hoechst 33258:** Adicionar 10 ml de agua destilada a 10 mg del colorante H 33258. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

**Anexo 4:** Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del *D-Loop* ovino

	<b>[stock]</b>	<b>[final]</b>	<b>1RX</b>
<b>DNA</b>	20 ng/ $\mu$ l	80 ng	4 $\mu$ l
<b>dNTPs</b>	2 mM	0.2 mM	2 $\mu$ l
<b>Iniciadores</b>	10 pM	0.5 pM	1 $\mu$ l
<b>BSA</b>	3 mg/ml	0.15 mg/ml	1 $\mu$ l
<b>Tritón</b>	2 %	0.1 %	1 $\mu$ l
<b>Buffer C</b>	10 X	1 X	2 $\mu$ l
<b>Taq Polimerasa</b>	5 U/ $\mu$ l	2.5 U	0.5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O dd</b>			8.5 $\mu$ l
<b>Cbp *</b>			20 $\mu$ l

\* cuanto basta para



## **Anexo 5: Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

- 1.- Cortar el fragmento amplificado del gel de agarosa y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 2.- Pesar el fragmento y adicionar 3 veces su peso en volúmenes (peso del fragmento X 3 X 1000  $\mu$ l) de yoduro de sodio (NaI). Colocar en TermoBlock a 55°C durante 5 a 10 minutos hasta que la agarosa este completamente disuelta.
- 3.- Adicionar 15  $\mu$ l de perlas de sílica. Mezclar bien y dejar en hielo durante dos horas mínimo, vortexeando cada 30 minutos aproximadamente.
- 4.- Centrifugar a 12,000 rpm durante 4 minutos y eliminar el sobrenadante. Seguidamente realizar dos lavados con 500  $\mu$ l de solución de New Wash 1X, centrifugando a 12,000 rpm durante 3 minutos y eliminando el sobrenadante.
- 5.- Secar la pastilla en TermoBlock a 55°C durante 10 minutos aproximadamente. Resuspender la pastilla en 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O dd, vortexear y centrifugar a 12,000 rpm durante 3 minutos.
- 6.- Recuperar cuidadosamente el sobrenadante, colocarlo en un tubo eppendorf de 0.5 ml, cuantificar y almacenar en congelación hasta su uso.
- 7.- Evaluar la integridad del fragmento purificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % + TBE 1X, teñidos en bromuro de etidio y visualizados por UV.

### **Soluciones y Reactivos necesarios:**

**Yoduro de Sodio 6M:** 89.93 g de NaI (PM 149.89). Se pesa el polvo y se diluye en 50 ml de H<sub>2</sub>O dd, mezclar hasta disolver y aforar con H<sub>2</sub>O dd cbp 100 ml.

**Perlas de Sílica:** mezclar 10 g de Sílica (Sigma) (S-5631) en 100 ml de PBS e hidratar por 2 horas. Remover el sobrenadante (2 lavados). Centrifugar a 2000 rpm durante 2 minutos y resuspender la pastilla en 3M de NaI a 100mg/ml. Almacenar protegida de la luz a 4°C.

**Solución de New Wash:** 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5mM EDTA, 50% v/v (volumen sobre volumen) etanol. Preparar el buffer a 10X y diluir solución a 1X más etanol 50% v/v.

### Anexo 6: Reacción de secuencia

1.- Preparar una reacción para cada iniciador adicionando los siguientes reactivos:

	[stock]	[final]	1Rx
Buffer de Rx	2.5 X	0.5 X	4.0 $\mu$ l
DNA templado	20 ng/ $\mu$ l	50 ng	2.5 $\mu$ l
Iniciador	2 pM/ $\mu$ l	6.4 pM	3.2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O dd	-	-	10.3 $\mu$ l
cbp			20.0 $\mu$ l

## **Anexo 7. Filtrado de secuencias en columnas de sephadex G50**

- 1.- Armar una columna (Multi-Spin™ 50, Separation Columns. Axygen™ Scientific) por cada secuencia y adicionar 800 µl de sephadex G50 en cada una, cuidando de no dejar burbujas de aire. Dejar sedimentar por espacio de 5 minutos.
- 2.- Retirar el tapón inferior y centrifugar a 2,700 rpm durante 3 minutos. Eliminar el agua del tubo colector y adicionar 50 µl de H<sub>2</sub>O dd sobre la pendiente de la columna (“equilibrar columnas”) sin tocar el sephadex. Centrifugar a 2,700 rpm durante 3 minutos y eliminar el agua del tubo colector. Equilibrar dos o tres veces.
- 3.- Colocar la columna dentro de un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml identificado y adicionar gota a gota el volumen total de la reacción de secuencia sobre la parte central de la pendiente, sin tocar el sephadex ni escurrir por los lados.
- 4.- Centrifugar en la misma posición a 2,700 rpm durante 3 minutos. El volumen recuperado se coloca en un concentrador de DNA (Automatic SpeedVac AS160) hasta secarse completamente (aproximadamente 45 minutos).
- 5.- Mantener la muestra congelada y protegida de la luz hasta su lectura en secuenciador automático (ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer. PE Applied Biosystems, Foster City USA)

### **Soluciones y Reactivos necesarios:**

**Shepadex G50:** 2 g de shepadex G50. Pesar el sephadex y adicionar H<sub>2</sub>O dd cbp 40 ml, mezclar y dejar hidratar durante 12 horas. Decantar el sobrenadante y adicionar nuevamente H<sub>2</sub>O dd cbp 40 ml (2 lavados). Almacenar el shepadex hidratado y refrigerado.

**Anexo 8:** Protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del gen COI

	[stock]	[final]	1RX
<b>DNA</b>	20 ng/ $\mu$ l	80 ng	4 $\mu$ l
<b>dNTPs</b>	2 mM	0.2 mM	2 $\mu$ l
<b>Iniciadores</b>	10 pM	0.5 pM	1 $\mu$ l
<b>BSA</b>	3 mg/ml	0.15 mg/ml	1 $\mu$ l
<b>Tritón</b>	2 %	0.1 %	1 $\mu$ l
<b>Buffer C</b>	10 X	1 X	2 $\mu$ l
<b>Taq Polimerasa</b>	5 U/ $\mu$ l	2.5 U	0.5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O dd</b>			8.5 $\mu$ l
<b>Cbp</b>			20 $\mu$ l

**Anexo 9:** Protocolo de digestión de productos de PCR gen COI (PCR-RFLP's)

	[stock]	[final]	1Rx
<b>Producto PCR</b>	-	-	5 µl
<b>H<sub>2</sub>O dd</b>	-	-	11.8 µl
<b>Buffer de enzima</b>	10X	1X	2 µl
<b>Espermidina</b>	20mM	1mM	1 µl
<b>Enzima (Hinfl)</b>	10 U/µl	2 U/Rx	0.2 µl
<b>cbp</b>			20 µl

**Anexo 10:** Números de acceso al GenBank para los haplotipos identificados en oveja criolla mexicana.

<b>Haplotipo</b>	<b>Número de acceso</b>
HP01	AY582800
HP02	AY582801
HP03	AY582802
HP04	AY582803
HP05	AY582804
HP06	AY582805
HP07	AY582806
HP08	AY582807
HP09	AY582808
HP10	AY582809
HP11	AY582810
HP12	AY582811
HP13	AY582812
HP14	AY582813
HP15	AY582814
HP16	AY582815
HP17	AY582816
HP18	AY582817
HP19	AY582818
HP20	AY582819
HP21	AY582820

**Anexo 11:** Ubicación de iniciadores internos diseñados para secuenciación del *D-Loop* de *Ovis aries*.

1 AATCATTATCAACGATACTTATCAATATATTTCCAAAAATATAAAGAGCC  
51 TCTCCAGTATTAACCTTGCTAAACTCCCAAACATACAACACGGACTTCC  
101 CACTCCACAAGCCCACATAACAACCCATACAAGAAAAGCACAACCACCCA  
151 CCCACGGACATGAGCGTTCATAA **MitO1F** →  
201 ACATGCAAACGAGTACATAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATA  
251 AAGTACATTAATGATTTACCCCATGCATATAAGCATGTACATAGTATTA  
301 ATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTACATTAATGATTTACCTCAT  
351 GCATATAAGCACGTACATAGTATTAATGTAATATAGACATTATATGTATA  
401 AAGTACATTAATGATTTACCTCATGCATATAAGCACGTACATAGTATTA  
451 ATGTAATATAGACATTATATGTATAAAGTACATTAAGTATTTATCCCAT  
501 GCATATAAGCATGTACATT **MitO2F** →  
**MitO2Rv** ←  
551 GCTTGACCGTACATAGTACATGAAGTCAAATCCATTCTAGTCAACATGCG  
601 TATCCTGTCCATTAGATCACGAGCTTGTTACCATGCCGCGTGAAACCAA  
651 CAACCCGCTCAGCAAGGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATTAACTGTG  
701 GGGGTA ACTATTTAATGAACTTTAACAGGCATCTGGTTCTTCTTCAGGG  
751 CCATCTCATCTAAAATCGCCCACTCTTCCCTTAAATAAGACATCTCGA  
801 TGGACTAGTGACTAATCAGCCCATGCCTAACATAACTGTGGTGT CATGCA **MitO1Rv** ←  
851 TTTGGTATTTTTTAATTTTTGGGGATGCTTGGACTCAGCTATGGCCGTCT  
901 GAGGCCCGACCCGGAGCATGAATTGTAGCTGGACTTA **MitO3F** →  
951 GCATCCTCATAATGGTAAGCATGGGCATAATATAATTAATGGTCACAGGA  
1001 CATATCTGCTGTATCGTGCATTTATATATTCTTTTTCCCCCTTCCCCTT  
1051 AAATATTTATCACCATTTTTAACACGCTTCCCCCTAGATATTAATATAAAA  
1101 TTTATCCCGCCCTCAATACTCAAATTCATACTCCAACCGAAGTAAATATA  
1151 TAGGCACCTGGGTCACATACATAACGCATA

La secuencia corresponde al consenso del *D-Loop* mitocondrial completo de los haplotipos encontrados en oveja criolla mexicana. La dirección (flechas) y nombre de los iniciadores son indicados.



**Anexo 12:** Alineamiento de las posiciones nucleotídicas variables en el *D-Loop* de ovejas domésticas del haplogrupo Europeo.

	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111
	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555
	4555556666	6666666666	7777777777	7777777778	8888888888	8888888889	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999	9999999999
	7134681344	4445557789	0112233344	4556777890	0001122233	4578899991	2223335557	8992244923	4469912346	7455902450	470	612	612	612
	6507298034	6785680978	8391301223	5492038380	6787808975	6811234562	3681342687	5231728780	4752572844	3378317542	612	612	612	612
	TCGGCCTGAA	CGAAGATTAA	CCACTAGTAT	TTAATATTCT	GTAATTATAT	ATCGTTATAA	GATCCCTTGG	TACTTTTATA	CTGTTTCAGGT	TGATGGTGT	CAC	CAC	CAC	CAC
HP01	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP02	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP03	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP04	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP05	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP06	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP07	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP08	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP09	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP13	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP16	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP17	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP19	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP20	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
HP21	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ01	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ02	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ03	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TU03	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
KA01	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TU02	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ04	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ05	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ06	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ07	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ08	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ09	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ13	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SI	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ16	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ17	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ18	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ19	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ20	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AL01	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AL02	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TU01	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ES	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ21	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ22	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ23	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
NZ24	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

La posición nucleotídica se indica en relación a la longitud del genoma mitocondrial de *Ovis aries* (Hiendleder *et al.*, 1998b), considerando cuatro copias del elemento repetido en tandem. Los puntos indican identidad con la primera secuencia y los guiones representan los índices (inserciones/deleciones). Los haplotipos de oveja criolla mexicana son indicados (HP01 – HP21).

**Anexo 13:** Distancias genéticas promedio dentro y entre grupos del género *Ovis*.

**Cuadro 13.1.** Distancias genéticas promedio (Tamura y Nei) dentro y entre grupos de secuencias de oveja doméstica y silvestre

Grupo	OCM	Europeas	Asiáticas	Silvestres
<b>OCM</b>	0.004 ± 0.001	-	-	-
<b>Europeas</b>	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.001	-	-
<b>Asiáticas</b>	0.040 ± 0.005	0.039 ± 0.005	0.007 ± 0.001	-
<b>Silvestres</b>	0.057 ± 0.005	0.059 ± 0.005	0.065 ± 0.006	0.061 ± 0.005

En la diagonal se presenta la distancia genética promedio dentro de grupos y el error estándar. Debajo de la diagonal se presenta la distancia genética promedio entre grupos y su error estándar, respectivamente.

**Cuadro 13.2.** Distancias genéticas promedio (Tajima y Nei) dentro y entre grupos de secuencias de oveja doméstica y silvestre

Grupo	OCM	Europeas	Asiáticas	Silvestres
<b>OCM</b>	0.004 ± 0.001	-	-	-
<b>Europeas</b>	0.011 ± 0.002	0.010 ± 0.001	-	-
<b>Asiáticas</b>	0.040 ± 0.006	0.039 ± 0.006	0.007 ± 0.001	-
<b>Silvestres</b>	0.057 ± 0.005	0.059 ± 0.005	0.065 ± 0.005	0.061 ± 0.005

En la diagonal se presenta la distancia genética promedio dentro de grupos y el error estándar. Debajo de la diagonal se presenta la distancia genética promedio entre grupos y su error estándar, respectivamente.