

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA OVEJA CHURRA ESPAÑOLA,
MEDIANTE SECUENCIACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

FERNANDO CHÁVEZ MAYA

Asesores:

Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales
Dr. Raúl Ulloa Arvizu



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.

DEDICATORIA

A Bárbara y Fernando, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Rogelio, Raúl, Amanda y Pablo.

CONTENIDO

Resumen.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1.1. Origen de los ovinos.....	2
1.1.2. Churra.....	6
1.1.3. La oveja en México.....	7
1.1.4. Diversidad Genética.....	8
1.1.5. Genética de poblaciones.....	11
1.1.6. Marcadores moleculares.....	12
1.1.7. ADNmt.....	14
1.1.8. Análisis filogenéticos.....	16
1.1.9. Dendrograma.....	18
1.1.10. Justificación.....	21
1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
1.2.1. Hipótesis.....	22
1.2.2. Objetivos.....	22
1.3. Metas.....	23
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
2.1. Material biológico.....	24
2.2. Obtención del ADN total.....	24
2.3. Amplificación del D-Loop.....	24
2.4. Secuenciación del fragmento de 350 pb.....	25
2.5. Secuencias.....	28
2.6. Análisis.....	30
3. RESULTADOS.....	32
3.1 Purificación del ADN total.....	32
3.2. Secuenciación del D-Loop.....	32
3.2.1. Amplificación y purificación del D-Loop.....	32
3.2.2. Secuenciación del fragmento de 350 pb.....	33
3.3. Número y distribución de sitios polimórficos en el D-Loop de ovejas.....	34
3.4. Evaluación del segmento mas polimórfico del D-Loop.....	35
3.4. Análisis filogenético de ovejas churras españolas.....	38
4. DISCUSIÓN.....	44
5. CONCLUSIONES.....	46
6. LITERATURA CITADA.....	47
7. ANEXOS.....	51
Anexo 1. Purificación de ADN total a partir de sangre periférica.....	51
Anexo 2. Preparación de geles de agarosa.....	52
Anexo 3. Cuantificación de ADN.....	53
Anexo 4. Protocolo de PCR.....	54
Anexo 5. Filtrado de secuencias en columnas de sephadex G-50.....	55
Anexo 6. Reacción de secuencia.....	56
Anexo 7. Secuencias de ovejas Churras españolas.....	57
Anexo 8. Alineación del D-loop.....	60
Anexo 9. Alineación de 350 pb del D-Loop.....	70
Anexo 10. Alineación de 350 pb de 211 haplotipos.....	75
Anexo 11. 1000 replicas de la figura 3.4.1.....	81
Anexo 12. 1000 replicas de la figura 3.4.2.....	82
Anexo 13. 1000 replicas de la figura 3.5.1.....	83

FIGURAS

Figura 3.1. Evaluación del ADN total purificado de sangre.....	31
Figura 3.2.1. Amplificación del D-Loop ovino.....	31
Figura 3.2.2. Secuenciación del fragmento de 350 pb.....	32
Figura 3.3.1. Histograma de sitios polimórficos.....	33
Figura 3.4.1. Dendrograma a.....	36
Figura 3.4.2. Dendrograma b.....	37
Figura 3.5.1. Análisis filogenético de ovejas Churras españolas.....	43

CUADROS

Cuadro 1.1.1. Ovejas silvestres.....	2
Cuadro 2.3.1. Iniciadores D-Loop.....	25
Cuadro 2.4.1. Iniciadores secuenciación.....	26
Cuadro 3.5.1. sitios polimórficos de ovejas de raza Churra española.....	39
Cuadro 3.5.2. Mutaciones puntuales.....	40
Cuadro 3.5.3. Distancias genéticas.....	42

RESUMEN

CHÁVEZ MAYA FERNANDO. Análisis filogenético de la oveja churra española, mediante secuenciación del ADN mitocondrial (bajo la dirección del Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales y del Dr. Raúl Ulloa Arvizu).

La raza Churra de ovejas españolas junto con algunas variedades de ovejas criollas mexicanas presentan aspectos morfológicos y productivos semejantes que hacen pensar en su posible relación filogenética, es por ello que es importante definir sus relaciones filogenéticas y evolutivas. Se identificó una secuencia altamente polimórfica de 350 pb (29.66% de la longitud total del D-Loop) localizada en las posiciones 208 a la 557 dentro del D-Loop (15644 a la 15993 en la secuencia total del ADNmt) dentro del ADNmt de ovinos domésticos, éste fragmento contiene el 54.5% de todos los sitios polimórficos localizados en el D-Loop. Se realizó la secuenciación de este fragmento de 34 ovinos de raza Churra española, encontrándose 33 haplotipos distintos, de éstos, 31 haplotipos no habían sido reportados. Con el objetivo de hacer un análisis filogenético de ovejas Churras españolas se construyó un dendrograma para identificar posibles relaciones filogenéticas, usando el algoritmo neighbor-joining, la confianza estadística de cada nodo fue estimada sobre 1000 réplicas, se utilizaron 33 haplotipos de ovejas Churras españolas, 35 haplotipos de 7 razas de ovejas Churras portuguesas (Algarvia, Badana, Saloia, Terra Quente, Merino Preto, Mondegueira y Campanica), 30 haplotipos de ovejas neozelandesas (razas Merino, Romney, Perendale y Coopworth) y 18 haplotipos de ovejas criollas mexicanas provenientes de Chiapas, Hidalgo, Morelos, Veracruz y Puebla, se encontró que las ovejas criollas mexicanas se agrupan en una rama claramente definida, también se identificó que las ovejas churra españolas no se agrupan, igual que las portuguesas y neozelandesas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. ORIGEN DE LOS OVINOS

Actualmente no se sabe con certeza el origen geográfico, filogenético ni temporal de las ovejas domésticas (*Ovis aries*). Se piensa que hace 11000 años los ovinos fueron domesticados en la región del suroeste de Asia¹, que actualmente forman parte de países como Turquía, Siria, Irak e Irán, entre otros.

El nombre latino *Ovis aries* se utiliza para hacer referencia a la oveja doméstica, y distinguirla de las especies silvestres de ovinos, que algunos autores¹ dividen en siete especies (cuadro 1.1.1).

Cuadro 1.1.1. Ovejas silvestres. En este cuadro podemos observar el nombre común, nombre científico, ubicación geográfica y número de cromosomas de las ovejas silvestres¹.

<i>Nombre común</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Número de cromosomas</i>
Oveja Argali	<i>Ovis ammon</i>	Montañas de Asia central (Montañas de Atai, Pamirs, Tien Shan, Himalayas y Tíbet).	56
Oveja Urial	<i>Ovis vignei</i>	Asia (montañas que abarcan parte de Irán, India y Afganistán).	58
Muflón asiático	<i>Ovis orientalis</i>	Asia (al oeste de la ubicación del urial).	54
Muflón europeo	<i>Ovis musimon</i>	Europa.	54
Oveja grandes cuernos	<i>Ovis canadensis</i>	América del norte	54
Oveja de las nieves	<i>Ovis nivicola</i>	Siberia.	52
Oveja pequeños cuernos	<i>Ovis dalli</i>	Alaska	54

Existen muchas diferencias entre los ovinos silvestres y los domésticos, debido a la selección a la que fueron sometidos, tanto por la naturaleza como por el hombre, una de las principales es el número de cromosomas, que en el ovino salvaje varía de 52 a 58 (cuadro 1.1.1), el ovino doméstico (*Ovis aries*) únicamente cuenta con 54¹.

Autores como Zeuner (1963) consideraron a la oveja urial (*Ovis vignei*) como una especie que contribuyó en la formación de la oveja doméstica (*Ovis aries*). Según esta visión, ciertas contribuciones de la oveja argali (*Ovis ammon*) también fueron de importancia. También pensaban que algunas líneas de ovejas domésticas provenían de poblaciones del muflón.

Más adelante, basados en análisis citogenéticos, Nadler *et al.* (1973) sugirieron a las poblaciones ancestrales del muflón ($2n=54$) como el origen más probable de las ovejas domésticas ($2n=54$), antes que las poblaciones de la oveja argali ($2n=56$) o las poblaciones de la oveja urial ($2n=58$). Wu *et al.* (2003) realizaron estudios filogenéticos de la mayoría de las subespecies actualmente reconocidas de la oveja argali y obtuvieron una separación clara de secuencias con respecto al *Ovis aries*. Hiendleder *et al.* (1998a), no encontraron ninguna evidencia de la contribución de la oveja urial o la oveja argali para los linajes maternos asiático (A) y europeo (B) del ADNmt de la oveja doméstica.

Hiendleder *et al.* (2002) proponen que todas las poblaciones de ovinos domésticos actuales derivan de dos diversas subespecies, cada uno que conduce a uno de los dos linajes maternos del ADNmt, el asiático (A) o el europeo (B).

El muflón europeo (*Ovis musimon*) ha revelado una relación filogenética cercana con el linaje B del ADNmt, este muflón europeo es considerado un descendiente del muflón asiático⁷.

Actualmente el muflón asiático (*Ovis orientalis*) se considera el antecesor de todas las ovejas domésticas así como también del muflón europeo (*Ovis musimon*)^{1,7}.

Hiendleder *et al.* (2002) propusieron al muflón armenio (*Ovis gmelini gmelini*) y al turco (*Ovis gmelini anatolica*) como antepasados silvestres probables del linaje B. Para el linaje A, propusieron a dos subespecies restringidas a Irán: el muflón de Estefahan (*Ovis gmelini isphahanica*) y el muflón de Laristan (*Ovis gmelini laristanica*).

Fueron identificados dos linajes maternos: A y B en razas modernas de ovejas domésticas muestreadas de diversas regiones geográficas del mundo^{5,6,8,9}. Fue observado, un linaje maternal denominado C, además de los linajes A y B, en ovejas de Turquía y China^{7,10}.

Así como los haplogrupos B y A, el haplogrupo C no demostró una relación cercana con la oveja argali (*Ovis ammon*) o secuencias de la oveja urial (*Ovis vignei*)⁷.

La divergencia entre estos tres linajes en ovejas turcas fue estimado en el gen del citocromo b del ADNmt, y se piensa que ocurrió hace entre 160.000 y 750.000 años⁷, mucho antes de la época de la domesticación de las ovejas (alrededor 9000 años a.C.). El haplogrupo C reveló una divergencia anterior a los otros haplogrupos, estimado aproximadamente en 550 000 a 750 000 años con respecto al tipo B y 450 000 a 600 000 años para el tipo A, mientras que

los resultados entre los tipos B y A indican que divergieron más recientemente, entre 160 000 y 170 000 años⁷.

Recientemente Tapio *et al.* (2006) reportaron un cuarto linaje maternal denominado D. Meadows *et al.* (2007) reportan un quinto linaje maternal que se identifico como haplogrupo E. Esto sugiere que por lo menos ocurrieron cinco acontecimientos independientes de domesticación.

De los lugares donde tuvieron origen los ovinos domésticos, estos fueron diseminados paulatinamente, y hoy se encuentran en prácticamente todo el mundo. Gracias a la selección, deriva genética, aislamiento geográfico, etc., se ha dado origen a todas las razas de ovinos reconocidas mundialmente.

Davis (2006) sugiere que la península ibérica fue un centro importante para el desarrollo y la mejora de la oveja doméstica.

La evidencia arqueológica e histórica indica que después del neolítico la península ibérica experimentó contacto con diversas culturas como los fenicios, griegos, romanos y berberes conduciendo a la introducción de nuevas cosechas y animales. Algunos colonos pudieron haber mejorado el ganado local así como importar animales de otros lugares¹⁴. Además de contactos prehistóricos, una afluencia posible de ovejas domésticas habría podido ocurrir cuando estos pueblos tuvieron contacto con esta región. La evidencia más clara en la mejora de ovejas ibéricas debe ser considerada en el período musulmán. Un cambio osteométrico substancial en este período se identifica en huesos de ovejas de Portugal meridional¹³.

Las observaciones genéticas y zooarqueológicas respecto a ovejas portuguesas modernas y antiguas destacan el importante papel que Iberia desempeñó en progresos del ganado, gracias a su posición respecto al borde

occidental de Europa continental. El mar mediterráneo actuaba como pasillo natural que conectaba la península con el Cercano Oriente, la África del norte, y la Europa meridional, esto junto con semejanzas climáticas al Cercano Oriente, pudo haber permitido la afluencia de la diversidad genética esencial para la crianza selectiva de rasgos deseables¹⁵.

1.1.2. CHURRA

La raza Churra es autóctona de la cuenca del Duero, esta oveja se ha adaptado a un clima con largos y duros inviernos, primaveras muy cortas y veranos secos y calurosos predominantes en Castilla y León. La palabra churra en sus orígenes no designaba a una raza ovina, mas bien a la condición ligada a la agricultura.

Las características físicas de la oveja de raza Churra son: cabeza de tamaño medio, desprovista de lana, perfil ligeramente convexo, más acarnerado en los machos. Cuello delgado y largo. Tronco, tórax no muy desarrollado, espalda plana, cruz ligeramente notoria de perfil. Color blanco, con pigmentación negra en las partes distales, alrededor de los ojos, hocico y puntas de las orejas. Tiene vellón blanco y largo que deja libre la cabeza, vientre, base traqueal del cuello y parte delantera de las patas. Extremidades medianas y finas^{16,17}.

Aunque a la oveja de raza Churra se le destine para diferentes funciones zootécnicas, bajo diferentes condiciones de explotación y localizándose en distinta ubicación geográfica, no existen claras diferencias etnológicas entre éstos animales¹⁸.

Los productores se ven en la necesidad de buscar nuevas formas de obtener mayores rendimientos de productos de origen ovino, es así como a la

raza Churra se le cruza con otras razas de mayores producciones, debido a las exigencias de un mercado más demandante¹⁹. La población de la raza Churra ha pasado de 1,500,000 en el año 1980 a 800,000 actuales y parece que se ha estancado la disminución descenso²⁰.

1.1.3. LA OVEJA EN MÉXICO

Es importante tener más información acerca de la raza Churra, puesto que se cree que algunas ovejas criollas de México, tienen relación ascendente con esta raza²¹.

Entre la oveja Churra española y la variedad blanca del borrego Chiapas existen diferentes aspectos morfológicos y productivos similares, lo cual hace pensar en su posible relación filogenética, por ejemplo capa blanca con pigmentación centrífuga en negro, lana basta con mechass cónicas y largas, fibras gruesas, meduladas, de diferente longitud y sin ondulaciones. Ambos grupos poseen una concentración de partos entre diciembre y marzo, un perfil fronto-nasal semejante y un peso corporal similar²¹.

De Ascencao *et al.* (2004), encontraron que las ovejas criollas mexicanas aparentemente se agrupan en una rama dentro del linaje B del ADNmt ovino.

Cuando los españoles llegaron a América vieron la necesidad de traer animales como vacas, cabras, ovejas y cerdos, entre otros, en calidad de alimento y como pie de cría. Se piensa que las razas de ovinos de tipo Merino, Churras y Lachas, fueron las primeras que llegaron a México²³.

Según la FAO (2006) cerca del 20 % de las razas de animales de granja se encuentra en peligro de extinción, lo que equivale en promedio a la desaparición de una raza al mes. De entre más de las 7600 razas registradas

en la base de datos de la FAO sobre recursos genéticos de animales domésticos, 190 se han extinguido en los últimos 15 años y otras 1,500 se consideran al borde de la extinción.

Es esencial una descripción o caracterización de los ovinos criollos en México y los relacionados con éstos. Según la FAO para planificar una estrategia de conservación es necesario definir, registrar y evaluar los recursos genéticos en peligro. Para lo que hace las siguientes recomendaciones.

- 1.-Elaboración de un inventario nacional de los recursos genéticos animales.
- 2.-Control del estado del conjunto de los recursos genéticos animales.
- 3.-Mayor conocimiento genético y económico de las cualidades únicas de las razas, con objeto de desarrollar estrategias que hagan un mejor uso de éstas características a corto y largo plazo.
- 4.-Descripción comparativa mediante marcadores moleculares para establecer qué poblaciones poseen una diversidad genética significativa para dirigir mejor las acciones de conservación.

1.1.4. DIVERSIDAD GENETICA

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.

La diversidad genética es el grado de variación de los genes presentes en cada población. Fundamentalmente se refiere a la variación genética a nivel de ADN²⁵.

Una posible función de la diversidad genética, es mantener un reservorio de aptitudes de variación como respuesta al medio, que permita la adaptación y

la supervivencia de los organismos. Por eso cualquier disminución en la misma lleva a riesgos de extinción.

Genes que controlan procesos bioquímicos fundamentales, generalmente muestran poca variación, debido a que están sujetos a una fuerte presión de selección natural, aunque la variación que si exista puede ejercer un fuerte efecto sobre la viabilidad del organismo^{26,27}.

La frecuencia de alelos dentro de la población total es la resultante de la selección natural, así como de las mutaciones genéticas, la deriva genética al azar y el efecto fundador²⁶.

Su importancia se aprecia en la domesticación. Los criadores de plantas y animales seleccionan de esa diversidad las características genéticas que les permiten obtener las mejores cosechas y crías²⁸.

La FAO ha contribuido a la recopilación de información de unos 180 países de las aproximadamente 6 500 variedades de mamíferos y aves domésticos: ganado bovino, cabras, ovejas, búfalos, yaks, cerdos, caballos, conejos, pollos, pavos, patos, gansos, pichones, avestruces, etc²⁴.

Según la FAO de esa información, por lo menos una tercera parte de las especies domésticas de las que se cuenta con datos precisos sobre su población, corre peligro de extinción; de 199 se ha confirmado oficialmente su extinción y hay otras 620 registradas que también se encuentran en peligro de desaparecer. En los últimos cinco años el número de especies de mamíferos que corren peligro de extinción ha aumentado de 23 a 35 %. La situación de las aves es todavía más grave, el porcentaje total de las que están en peligro de extinción ha aumentado de 51 % en 1995 a 63 % en 1999. La biodiversidad

está perdiéndose conforme las presiones demográficas y económicas aceleran el ritmo de los cambios en los sistemas agropecuarios tradicionales²⁵.

Mantener la diversidad genética de los animales, permite a los productores elegir variedades o crear otras nuevas para responder a cambios ambientales, peligros de enfermedades, demanda del consumidor, cambio de condiciones del mercado y necesidades de la sociedad, factores en gran medida imprevisibles. La diversidad genética además constituye un almacén de posibilidades en buena parte sin probar todavía. Los parientes silvestres de las especies comunes, en particular, podrían contener recursos valiosos, aunque todavía desconocidos, de futura utilidad²⁵.

El objetivo de la FAO (2002) es mantener los recursos genéticos, significando que la variación genética en caracteres, tanto conocidos como desconocidos, pueda ser útil para mantener los caracteres productivos a pesar de los cambios que puedan producirse en el entorno. Esto implica que los esfuerzos de conservación se enfocarán hacia la diversidad genética de una especie en conjunto, sin preferencias de ciertos caracteres sobre otros.

El área iberoamericana constituye una región del planeta en la que los vínculos históricos, culturales y sociales con sus raíces ibéricas son extremadamente fuertes. Esta estrecha relación existente entre los pueblos de la Península Ibérica y los de América Latina llegan hasta la existencia de unas claras relaciones filogenéticas entre las razas de animales domésticos de uno y otro lado del Atlántico.

1.1.5. GENÉTICA DE POBLACIONES

Una población es un conjunto de individuos de la misma especie y que potencialmente son capaces de aparearse entre sí, compartiendo un acervo común de genes^{26,27}.

Al cambiar la composición genética de las poblaciones se genera el proceso evolutivo de la especie. Distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar diferencias genéticas²⁶.

Existen diversos mecanismos que afectan las frecuencias génicas de una población, dentro de los cuales se pueden mencionar mutaciones, migración, deriva genética, selección natural y selección artificial^{26,28}.

La mutación es el proceso fundamental que impulsa todo cambio evolutivo. No obstante, debido a que las tasas de mutación son muy bajas, la presión de mutación por si sola produce cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones muy lentos²⁶.

La migración o flujo génico de una población a otra de la misma especie puede cambiar la composición genética de una población local, si es que las frecuencias génicas de las dos poblaciones es distinta²⁶.

La deriva genética al azar se basa en que las frecuencias génicas de una población pueden cambiar por razones puramente aleatorias. Cuanto más pequeña es la población, mayor es el efecto de la deriva genética al azar sobre las frecuencias génicas²⁶.

La selección natural controla los caracteres que se desvían radicalmente de la capacidad de sobrevivir y reproducirse, seleccionando aquellos organismos con una mayor eficacia biológica. La selección tiende a mantener

un nivel óptimo de adaptación al medio ambiente, asegurando los logros conseguidos durante generaciones y eliminando los individuos no aptos.

La selección artificial la ejerce el hombre eligiendo caracteres que le interesan.

Las relaciones entre mutación, migración, deriva genética, selección artificial y selección natural son complejas y pueden diferir entre distintas especies y entre diversas regiones de un genoma. A partir de la variabilidad genética detectada en las poblaciones como resultado de estas fuerzas, los estudios de genética de poblaciones establecen modelos para explicar la estructura poblacional y la evolución de estas poblaciones²⁸.

El desarrollo de técnicas de biología molecular para la detección de polimorfismos de ADN permite describir la variación genética de una forma más precisa. Así las diferencias genéticas entre poblaciones se pueden evaluar usando medidas de distancia entre pares de poblaciones. Este tipo de estudios permite establecer que poblaciones tiene una diversidad genética significativa, lo que facilitaría las actividades encaminadas hacia la conservación²⁹.

1.1.6. MARCADORES MOLECULARES

Para poder conservar y usar la variación genética, primero hay que evaluarla, es decir, es preciso determinar su extensión y distribución. La variación puede evaluarse a nivel fenotípico y genotípico. La evaluación de la variación fenotípica se concentra en los rasgos biológicos medibles, no sólo en aquellas características que definen la forma y la apariencia de un conjunto de individuos, sino sus aptitudes fisiológicas, bioquímicas y productivas. La evaluación de la variación genotípica se hace al nivel de la molécula de ADN, que es la responsable de la transmisión de la información genética²⁹.

Tradicionalmente, la diversidad que existe dentro y entre las poblaciones se ha determinado mediante la evaluación de sus diferencias fenotípicas. Una complicación es que los fenotipos están sujetos a cambios debidos a factores ambientales y pueden variar en las diferentes etapas del desarrollo²⁹.

Para superar las limitaciones de los datos fenotípicos, se han desarrollado otro tipo de marcadores, tanto a nivel proteico (del fenotipo) como a nivel del ADN (del genotipo)²⁹.

Los marcadores proteicos se obtienen mediante electroforesis, aprovechando las propiedades migratorias de las proteínas²⁹.

La detección de polimorfismos en los marcadores proteicos es una técnica que comparte algunas de las desventajas de los fenotipos. Sin embargo, los marcadores proteicos están también limitados por la influencia del ambiente y de los cambios que ocurren en las diferentes etapas del desarrollo²⁹.

Los polimorfismos del ADN pueden detectarse en el ADN nuclear y en el ADN mitocondrial (ADNmt). Los marcadores moleculares no están sujetos a las influencias ambientales, las pruebas con ellos pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo, y tienen el potencial de hallarse en número muy grande porque abarcan todo el genoma, lo que representa su mejor atributo.

Hay muchos tipos diferentes de marcadores moleculares. Los marcadores moleculares suponen un apoyo importante para la identificación de parentescos, poblaciones y relaciones genéticas. Se han utilizado diferentes tipos de marcadores como son los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos enzimáticos, ahora se utilizan los polimorfismos del ADN amplificado al azar (RAPD), polimorfismos de longitud de fragmentos de

restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismos de longitud de secuencias repetitivas (mini y microsátélites), haplotipos del D-Loop del ADNmt, entre otros.

1.1.7. ADNmt

La evolución es un proceso mediante el cual el ADN, portador de toda la información genética de los seres vivos, acumula cambios por mutaciones de forma aleatoria o por selección natural. La identificación de este proceso genera información de interés, para muchos campos de la biología. Esta información puede ser utilizada en estudios filogenéticos y de dinámica de poblaciones. Para este tipo de estudios, el ADN mitocondrial es una de las moléculas más utilizadas, debido entre otras cosas, a su heredabilidad exclusivamente materna y la ausencia de recombinación genética³⁰.

La información genética contenida en la mitocondria es transmitida de la hembra a toda su descendencia, sin importar el sexo. Casi no hay aportación genética mitocondrial de los machos a la descendencia, por esta característica animales relacionados ascendentemente por vía materna tendrán el mismo ADN mitocondrial. Es así como el ADN mitocondrial resulta muy útil en los estudios de filogenia por vía materna³¹.

El ADN mitocondrial ha sido usado para construir árboles evolutivos. Las mitocondrias tienen su propio genoma de alrededor de 16,500 bases en la oveja doméstica, el cual existe fuera del núcleo de las células. El genoma de la mitocondria se divide principalmente en dos regiones, una región larga y una corta. Dentro de la región larga se encuentran 13 genes que codifican proteínas, 22 ARNt y 2 ARNr. Una región conocida como región control o "*D-Loop*", no codificante, 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 ADNmt³².

Las mitocondrias son organelos celulares que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, cuya función principal es la producción de energía celular en forma de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés).

El ADNmt presenta una tasa de mutación espontánea 10 veces superior a la del ADN nuclear.

Los ADNmt que comparten una serie de mutaciones que surgieron en una estirpe ancestral, tienen en común la formación de una familia de ADNmt conocida como haplogrupo. A medida que pasa el tiempo los ADNmt que pertenecen a un haplogrupo van ganando mutaciones particulares, se dice que dos ADNmt que pertenecen a un mismo haplogrupo, pero que pueden distinguirse el uno del otro por mutaciones adicionales en algún otro punto de la molécula, pertenecen a haplotipos distintos³¹.

Se han identificado mediante secuenciación de nucleótidos del *D-Loop*^{9,33,34} y por PCR-RFLP's³⁵, dos haplogrupos de ADNmt en ovejas domésticas: tipo A o haplogrupo asiático y tipo B o haplogrupo europeo

Los datos de RFLP utilizando HinfI en el ADNmt ovino sugieren mutaciones, lo que nos permite diferenciar a los dos linajes maternos A y B³⁵. Estas mutaciones se asignaron 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 con HinfI de productos de PCR del gen COI genera fragmentos de restricción de 836 pb (haplogrupo A) o 477 pb y 359 pb (haplogrupo B)^{36,37,38}.

El tiempo de la divergencia fue obtenido en base del gene de Citocromo b y estimado alrededor 160 000-170 000 años para los linajes B y A, mientras que la divergencia del linaje C se estimo antes, entre 450 000 y 750 000 años⁷.

1.1.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se requiere estudiar, determinar y medir la variación existente, entre y dentro de las poblaciones, para desarrollar programas de conservación.

Un análisis filogenético trata de comprender el origen y diversidad de las poblaciones a partir de la información contenida en el ADN, se realiza reconstruyendo la filogenia de una población, mediante la comparación de caracteres homólogos, actuales, fósiles o ambos³⁹.

Para estudiar las diferencias entre poblaciones se debe calcular las distancias genéticas entre ellas. La distancia genética mide el grado de diferenciación existente entre poblaciones de una misma especie, o entre especies. Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones³⁹.

Las distancias genéticas estiman el tiempo de separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes dentro y entre poblaciones. Dicho de otra forma, los organismos contienen un código evolutivo además de un código genético. El código evolutivo varía dependiendo de las contingencias históricas y biológicas que han sufrido las poblaciones después de su origen común³⁹.

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 realidad³⁹.

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 de organismos³⁹.

Estas relaciones evolutivas son ilustradas a través de un árbol filogenético, que es una representación gráfica compuesta por nodos y ramas que los interconectan⁴⁰. En este, cada nodo representa al antepasado común a dos o mas taxones y cada rama lleva asociados unos determinados cambios en los caracteres. Las unidades taxonómicas representadas por los nodos pueden ser especies, poblaciones, individuos o genes^{32,41}.

Los nodos en un árbol filogenético son de dos tipos: internos y externos. Los nodos externos representan a las unidades taxonómicas bajo comparación, denominadas "unidades taxonómicas operacionales" (OTUs). El resto de los nodos son internos y representan las unidades ancestrales de los OTUs⁴¹. Las ramas también se clasifican en: ramas internas y externas.

Los árboles filogenéticos pueden presentar raíz o carecer de ella. En un árbol enraizado existe un nodo particular llamado raíz, 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 común³⁹.

Este árbol filogenético describe o resume una filogenia, indicando en que orden se han diversificado los miembros de un grupo y cómo se han ido transformando los caracteres³⁹.

Salvo en los más sencillos, incluso el mejor de los árboles contendrá casos de homoplasia (evolución separada de un mismo carácter en una misma dirección) y de reversión (retroceso de un carácter a otro anterior).

Un árbol filogenético enraizado es un árbol directo, con un único nódulo que corresponde al ancestro común más reciente de todas las entidades de las hojas del árbol. El método más común para enraizar los árboles es el uso de un grupo externo no controvertido y lo suficientemente cercano para permitir la inferencia de los datos de secuencia o rasgos, pero lo suficientemente lejano para ser un grupo externo evidente³⁹.

Los árboles genéticos sin raíz ilustran la relación de los nódulos de las hojas sin hacer suposiciones sobre ascendencia. Mientras que los árboles sin raíz siempre pueden ser generados a partir de árboles enraizados omitiendo la raíz, una raíz no puede ser inferida a partir de un árbol que no la tenga, sin algunos medios para identificar la ascendencia, esto suele hacerse incluyendo un grupo externo en los datos³⁹.

1.1.9. DENDROGRAMA

Para construir arboles filogenéticos o dendrogramas, existen métodos estadísticos de carácter discreto y métodos de distancia.

Las distancias genéticas entre los haplotipos pueden ser estimadas mediante métodos como el de Tamura y Nei, Kimura dos parámetros, etc. Con los que se obtienen una matriz de distancias a partir de las cuales es posible reconstruir las relaciones filogenéticas de los haplotipos, utilizando algoritmos

como el método de medias aritméticas no ponderado (UPGMA), neighbor-joining (NJ), el método de máxima verosimilitud (ML) y el método de máxima parsimonia (MP)⁴².

La distancia genética se define como la magnitud de las diferencias génicas o genómicas entre y dentro de 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 genética⁴³.

En los métodos de distancia, las distancias genéticas son calculadas y el árbol filogenético es construido usando algoritmos basados en alguna interrelación funcional entre los valores de distancia⁴¹. 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 divergencia⁴⁴.

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. 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. Este procedimiento se repite hasta contemplar todos los OTUs bajo estudio.

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 árbol³⁹. El método empieza con un árbol en forma de estrella en donde no existe agrupación de OTUs. 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, 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 encontradas⁴².

En los métodos de carácter discreto, el árbol es construido considerando las relaciones evolutivas de las secuencias de ADN en cada sitio nucleotídico³³. 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 estudio⁴².

Para determinar el árbol de MP, 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 alta⁴¹. 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.

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^{41,43}.

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 investigación⁴³.

1.1.10. JUSTIFICACIÓN

La raza Churra de ovejas españolas junto con algunas variedades de ovejas criollas mexicanas presentan aspectos morfológicos y productivos semejantes que hacen pensar en su posible relación filogenética, es por ello que es importante definir sus relaciones genéticas y evolutivas. Estas poblaciones de ovinos se encuentran en peligro de extinción por absorción o sustitución por otras poblaciones de ovinos, es por ello que es indispensable realizar investigaciones que fundamenten la elaboración de programas de conservación de estos recursos genéticos con potencial biológico y productivo enorme.

De Ascencao *et al.* (2004), encontraron que la región más polimórfica dentro de la secuencia de 1180 nt de longitud del *D-Loop* en oveja criolla mexicana 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*) representando 72.4 % (21/29) del total de sitios polimórficos identificados. Es por ello que en este trabajo se selecciono la secuencia de este fragmento de 350 pb del D-Loop del ADNmt de ovejas Churras españolas, para hacer análisis filogenético de estas ovejas comparándolas con otras poblaciones ya descritas.

1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1. HIPÓTESIS

Debido a que en la formación de las razas ibéricas de ovejas domésticas hubo influencia de muchas culturas; a que la raza Churra es una variedad ovina ancestral y que esta raza fue introducida a América por los españoles;

esperamos encontrar diversos linajes evolutivos en la raza Churra dentro de los cuales se identifiquen los orígenes de las ovejas criollas mexicanas.

1.2.2. OBJETIVOS

Evaluar el grado de información filogenética de una región altamente polimórfica de 350 pb (29.66 % de la longitud total del *D-Loop*) ubicada dentro del D-Loop mitocondrial en la posición 208 a 557 (posición 15644 a 15993 en la secuencia del ADNmt) en ovejas domésticas.

Obtener la secuencia de nucleótidos de un segmento polimórfico de 350 pb del D-Loop del ADNmt de 34 muestras de ovinos de raza Churra española.

Establecer la relación filogenética de la oveja de raza Churra con respecto a otras poblaciones de ovejas domésticas.

1.2.3. METAS

Obtención de muestras de ADN de ovejas de raza Churra, procedentes de España.

Purificación del ADN total de las muestras y amplificación del D-Loop por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Obtener la secuencia de nucleótidos del segmento polimórfico de 350 pb dentro del D-Loop del ADNmt y evaluar el polimorfismo.

Determinar el nivel de diversidad genética presente en las ovejas de raza Churra muestreadas.

Ubicar las relaciones filogenéticas de la ovejas de raza Churra muestreadas con respecto a otras ovejas de poblaciones previamente descritas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvieron 34 muestras de sangre colectadas en tubos con EDTA de ovinos de raza Churra de las comunidades autónomas de Castilla y León, España.

2.2. OBTENCIÓN DEL 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 λ digerido con BstEII (λ /BstEII 100 ng/ μ l), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (UV) en un fotodocumentador UVP modelo 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).

2.3. AMPLIFICACIÓN DEL D-LOOP

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), se multiplica el segmento de ADN mitocondrial de interés. 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 y Mit4 (cuadro 2.3.1).

Cuadro 2.3.1. Iniciadores usados en la amplificación del D-Loop. En el cuadro se muestran la dirección, la secuencia y la posición (correspondiente para la secuencia completa del ADN mitocondrial ovino) de cada iniciador, utilizado para amplificar el D-Loop.

Nombre	Dirección	Secuencia	Posición
Mit3	5' a 3'	ATATACTGGTCTTGTAACCC	15,321
Mit4	3' a 5'	AGGCATTTTCAGTGCCTTG	26

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 58°C/30'' y extensión a 72°C/1'; y 1 ciclo de extensión final a 72°C/3'. La reacción se realizó en 20 µl conteniendo 100 ng de ADN molde, 0.5 pM de ambos iniciadores (MIT3 y MIT4), 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 MgCl₂) y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Biogenica, 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 1 %, TBE 1X (anexo 2) teñidos con bromuro de etidio, utilizando como marcador de peso molecular el ADN λ/BstEII (100 ng/µl) y visualizados con luz UV.

El D-Loop producto de PCR se purificó mediante filtración a través de columnas de Sephadex G50 (anexo 5).

2.4. SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO DE 350 PARES DE BASES

Una vez obtenido el ADN purificado se realizó la secuenciación del mismo. El fragmento purificado de ADN se empleó como molde para obtener la secuencia de nucleótidos correspondientes a un segmento polimórfico del *D-*

Loop mitocondrial ovino, localizado entre la posición 208 a la 557 del mismo. Para la reacción de secuencia se uso 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 del fragmento polimórfico del *D-Loop* en cada individuo, se utilizaron los iniciadores Mit01F y Mit03Rv (cuadro 2.4.1).

Cuadro 2.4.1. Iniciadores utilizados en la secuencia del D-Loop. Se indica el nombre, dirección y posición de cada iniciador.

Nombre	Dirección	Secuencia	Posición*	Posición☼
Mit01F	5' a 3'	GGACAYGAGCGTTCATAAAC	15,592	156
Mit03Rv	3' a 5'	GAGGGATCCTTGCTGAGCG	16091	655

* Posición correspondiente a la secuencia completa del ADNmtl ovino.

☼ Posición correspondiente a la secuencia del D-Loop del ADNmt 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 5). El volumen recuperado se colocó en un concentrador de ADN (Automatic SpeedVac mod. VR1) hasta secarse completamente.

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.

Las secuencias de cada muestra se registraron de forma electrónica. El primer paso del análisis fue identificar la calidad de los electroferogramas, posteriormente se 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 utilizó el programa ChromasPro v.1.34. Las lecturas obtenidas de las cadenas en ambas direcciones luego de su edición y análisis, se empalmaron para construir la secuencia consenso del fragmento de 350 pb localizado en las posiciones 208 a la 557 dentro del D-Loop.

La identificación de los diferentes haplotipos presentes en el *D-Loop* de las ovejas Churras españolas analizadas se realizó mediante la alineación múltiple de las secuencias en el programa ChromasPro v.1.34, luego de la identificación de los diferentes haplotipos dentro de las ovejas Churras españolas, se realizó la comparación 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.

Con la finalidad de estudiar el origen y las relaciones genéticas de la oveja Churra española se compararon los haplotipos encontrados en las 33 muestras analizadas con los haplotipos correspondientes al fragmento de 350 pb (dentro del *D-Loop* previamente reportados) en ovejas domésticas de diferentes orígenes, disponibles en la base de datos del GenBank.

2.5. SECUENCIAS

Los números de acceso en el GeneBank (indicados entre paréntesis) de las secuencias que se emplearon para el análisis son:

Haplogrupo B: 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, razas Merino, Romney, Perendale y Coopworth: NZ01 (Z35239), NZ02 (Z35259), NZ03 (Z35235), NZ04 (Z35232), NZ05 (Z35236), NZ06 (Z35267), NZ07 (Z35241), NZ08 (Z35234), NZ09 (Z35257), NZ10 (Z35233), NZ12 (Z35238), NZ13 (Z35249), NZ14 (Z35237), NZ15 (Z35248), NZ16 (Z35263), NZ17 (Z35266), NZ19 (Z35262), NZ20 (Z35231), NZ21 (Z35228), NZ22 (Z35229), NZ23 (Z35268), NZ24 (Z35265).

Churras Algravia: ALG 01 (DQ491580); ALG 02 (DQ491589); ALG 03 (DQ491591) ALG 04 (DQ491592) ALG 05 (DQ491605) ALG 06 (DQ491606) ALG 07 (DQ491639) ALG 08 (DQ491643) ALG 09 (DQ491646) ALG 10 (DQ491649) ALG 11 (DQ491652) ALG 12 (DQ491654) ALG 13 (DQ491656) ALG 14 (DQ491658) ALG 15 (DQ491664) ALG 16 (DQ491678) ALG 17 (DQ491687) ALG 18 (DQ491699) ALG 19 (DQ491706) ALG 20 (DQ491708) ALG 21 (DQ491712) ALG 31 (DQ491730).

Churras Badana: BAD 01 (DQ491578) BAD 02 (DQ491587) BAD 03 (DQ491590) BAD 04 (DQ491593) BAD 05 (DQ491600) BAD 06 (DQ491613) BAD 07 (DQ491625) BAD 08 (DQ491626) BAD 09 (DQ491629) BAD 10 (DQ491647) BAD 11 (DQ491653) BAD 12 (DQ491660) BAD 14 (DQ491663) BAD 15 (DQ491671) 21 BAD 16 (DQ491683) BAD 17 (DQ491684) BAD 18

(DQ491685) BAD 19 (DQ491688) BAD 20 (DQ491690) BAD 21 (DQ491692)
BAD 22 (DQ491704).

Churras Campanica: CAM 01 (DQ491595) CAM 02 (DQ491602) CAM 03
(DQ491611) CAM 04 (DQ491612) CAM 05 (DQ491618) CAM 06 (DQ491619)
CAM 07 (DQ491621) CAM 08 (DQ491655) CAM 09 (DQ491657) CAM 10
(DQ491659) CAM 11 (DQ491662) CAM 12 (DQ491667) CAM 13 (DQ491668)
CAM 14 (DQ491680) CAM 15 (DQ491681) CAM 16 (DQ491695) CAM 17
(DQ491698) CAM 18 (DQ491709).

Churras Merono Preto: MER 01 (DQ491585) MER 02 (DQ491586) MER 04
(DQ491607) MER 05 (DQ491641) MER 06 (DQ491665) MER 07 (DQ491675)
MER 08 (DQ491686) MER 09 (DQ491689).

Churras Mondegueira: MON 01 (DQ491582) MON 02 (DQ491594) MON 03
(DQ491601) MON 04 (DQ491603) MON 05 (DQ491616) MON 06 (DQ491633)
MON 07 (DQ491635) MON 08 (DQ491642) MON 09 (DQ491651) MON 10
(DQ491682) MON 11 (DQ491700) MON 12 (DQ491702).

Churras Terra Quente: QUE 01 (DQ491581) QUE 02 (DQ491583) QUE 03
(DQ491584) QUE 04 (DQ491588) QUE 06 (DQ491609) QUE 07 (DQ491614)
QUE 08 (DQ491620) QUE 09 (DQ491624) QUE 10 (DQ491631) QUE 11
(DQ491636) QUE 12 (DQ491638) QUE 13 (DQ491640) QUE 14 (DQ491645)
QUE 15 (DQ491650) QUE 16 (DQ491666) QUE 17 (DQ491672) QUE 18
(DQ491673) QUE 19 (DQ491674) QUE 21 (DQ491701) QUE 22 (DQ491705)
QUE 23 (DQ491707).

Churras Saloia: SAL 01 (DQ491576) SAL 02 (DQ491577) SAL 03
(DQ491579) SAL 04 (DQ491597) SAL 06 (DQ491604) SAL 07 (DQ491608)
SAL 08 (DQ491610) SAL 09 (DQ491615) SAL 10 (DQ491617) SAL 11

(DQ491622) SAL 12 (DQ491623) SAL 13 (DQ491627) SAL 14 (DQ491628)
SAL 15 (DQ491630) SAL 16 (DQ491632) SAL 17 (DQ491634) SAL 18
(DQ491637) SAL 19 (DQ491644) SAL 20 (DQ491648) SAL 21 (DQ491669)
SAL 22 (DQ491670) SAL 24 (DQ491677) SAL 25 (DQ491679) SAL 26
(DQ491691) SAL 27 (DQ491693) SAL 28 (DQ491694) SAL 29 (DQ491697)
SAL 30 (DQ491703).

Ovejas criollas mexicanas provenientes de Hidalgo, Veracruz, Chiapas, Morelos y Puebla: HP01 (AY582800); HP03 (AY582802); HP04 (AY582803); HP06 (AY582805); HP07 (AY582806); HP08 (AY582807); HP10 (AY582809); HP11 (AY582810); HP12 (AY582811); HP13 (AY582812); HP14 (AY582813); HP15 (AY582814); HP16 (AY582815); HP17 (AY582816); HP18 (AY582817); HP19 (AY582818); HP20 (AY582819); HP21 (AY582820).

2.6. ANÁLISIS

Para analizar las relaciones filogenéticas se realizó la alineación múltiple en el programa Clone Manager de los haplotipos identificados en ovejas Churras españolas y las secuencias antes mencionadas. El análisis de las secuencias para determinar la estructura y variabilidad genética se realizó con el programa MEGA v3.1.⁴⁶. Las distancias genéticas entre las diferentes secuencias se calcularon por el modelo de 2 parámetros de Kimura⁴⁷. Con los valores de distancias genéticas se construyeron dendrogramas por el método de Neighbour-Joining (NJ). Se construyó una gráfica a partir del conteo manual de los sitios polimorfos observados en la alineación del D-Loop.

Existen varios métodos para estimar la variabilidad genética de las secuencias de DNA, en este trabajo utilizamos las medidas más comunes son: diversidad haplotípica la cual define como la probabilidad de que dos haplotipos

tomados al azar de una población sean diferentes y la diversidad nucleotídica esta medida es equivalente a la diversidad haplotípica, pero a nivel nucleótido³².

3. RESULTADOS

3.1. PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL.

Se obtuvo el ADN total a partir de las 40 muestras de sangre de ovinos de raza Churra. A partir de 500µl de sangre, se obtuvieron 100 µl con una concentración de ADN de 20ng/µl (Figura 3.1).

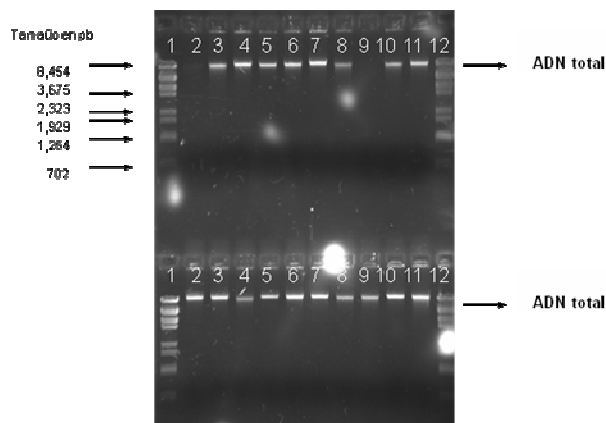


FIGURA 3.1. Evaluación de la integridad del ADN total purificado de sangre. Se muestra un gel de agarosa al 1%, conteniendo en los carriles 1 y 12 el marcador de peso molecular ADN λ BstEII. En los carriles intermedios (2 al 11) se observa una banda única, la cual representa la integridades del ADN total de oveja Churra española.

3.2. SECUENCIACIÓN DEL *D-LOOP*.

3.2.1. Amplificación y purificación del *D-Loop*.

En la evaluación de la amplificación del *D-Loop*, a partir de PCR punto final, mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, se observó un fragmento de 1180 pb (Figura 3.2.1). El fragmento amplificado (*D-Loop*) se purificó a partir del producto de PCR mediante columnas de sephadex G-50.

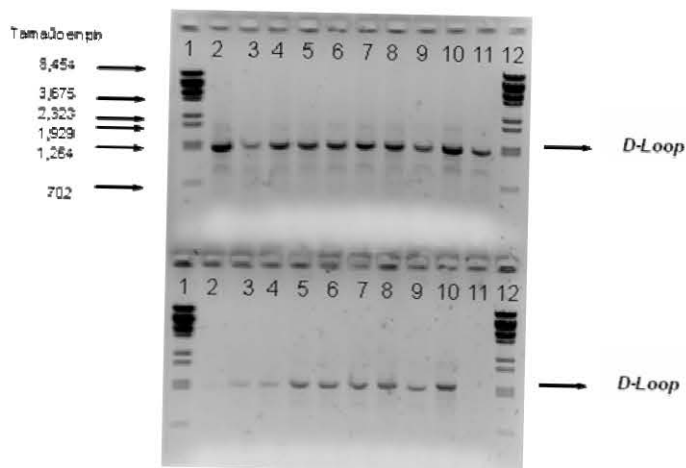


Figura 3.2.1. Amplificación del *D-Loop* ovino. Los carriles 1 y 12 muestran el marcador de peso molecular ADN λ BstEII. Los carriles intermedios (2 al 11) muestran los fragmentos amplificados de 1180 pb del D-Loop de ovejas Churras españolas.

3.2.2. Secuenciación del fragmento de 350 pb.

Con los fragmentos purificados (*D-Loop*) se obtuvieron las secuencias en ambas direcciones de cada muestra del fragmento polimórfico de 350 pb. Con los electroferogramas generados se obtuvo la secuencia consenso de dicho fragmento, ubicado en la posición 208 a la 557 dentro del *D-Loop*. (Figura 3.2.2.). Las secuencias obtenidas se muestran en el anexo 7, encontrándose 33 haplotipos diferentes. Se identificaron 31 haplotipos no reportados en el GeneBank.

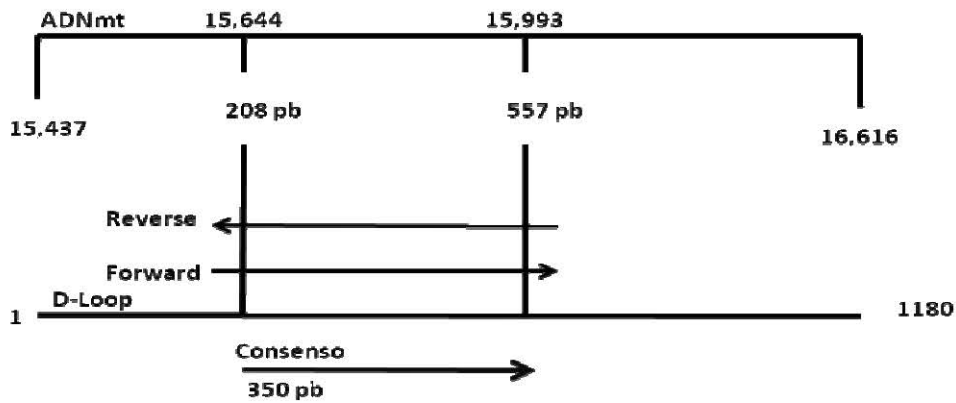


Figura 3.2.2. Secuenciación del fragmento de 350 pb. Mapa donde se muestran las posiciones en el D-Loop y el ADNmt, en las cuales se localiza el fragmento secuenciado de 350 pb de ovejas churras españolas.

3.3. Número y distribución de sitios polimórficos en el D-Loop de la oveja doméstica.

En la alineación de 30 haplotipos del D-Loop completo de ovejas comerciales de origen europeo con haplogrupo B, 18 haplotipos de oveja criolla mexicana, 130 haplotipos de 7 razas Churras portuguesas, se observaron 244 sitios polimórficos. El grado de polimorfismo observado fue de 20.67% (244/1180). (Anexo 8). En la figura 3.3.1. se observa la cantidad de sitios polimórficos localizados en cada cincuenta pares de bases dentro del D-Loop.

Sitios polimórficos en el D-Loop

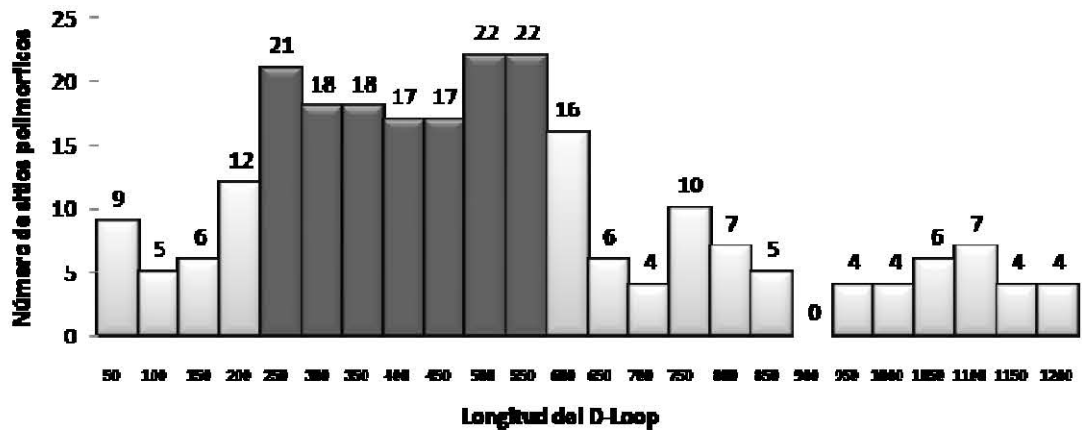
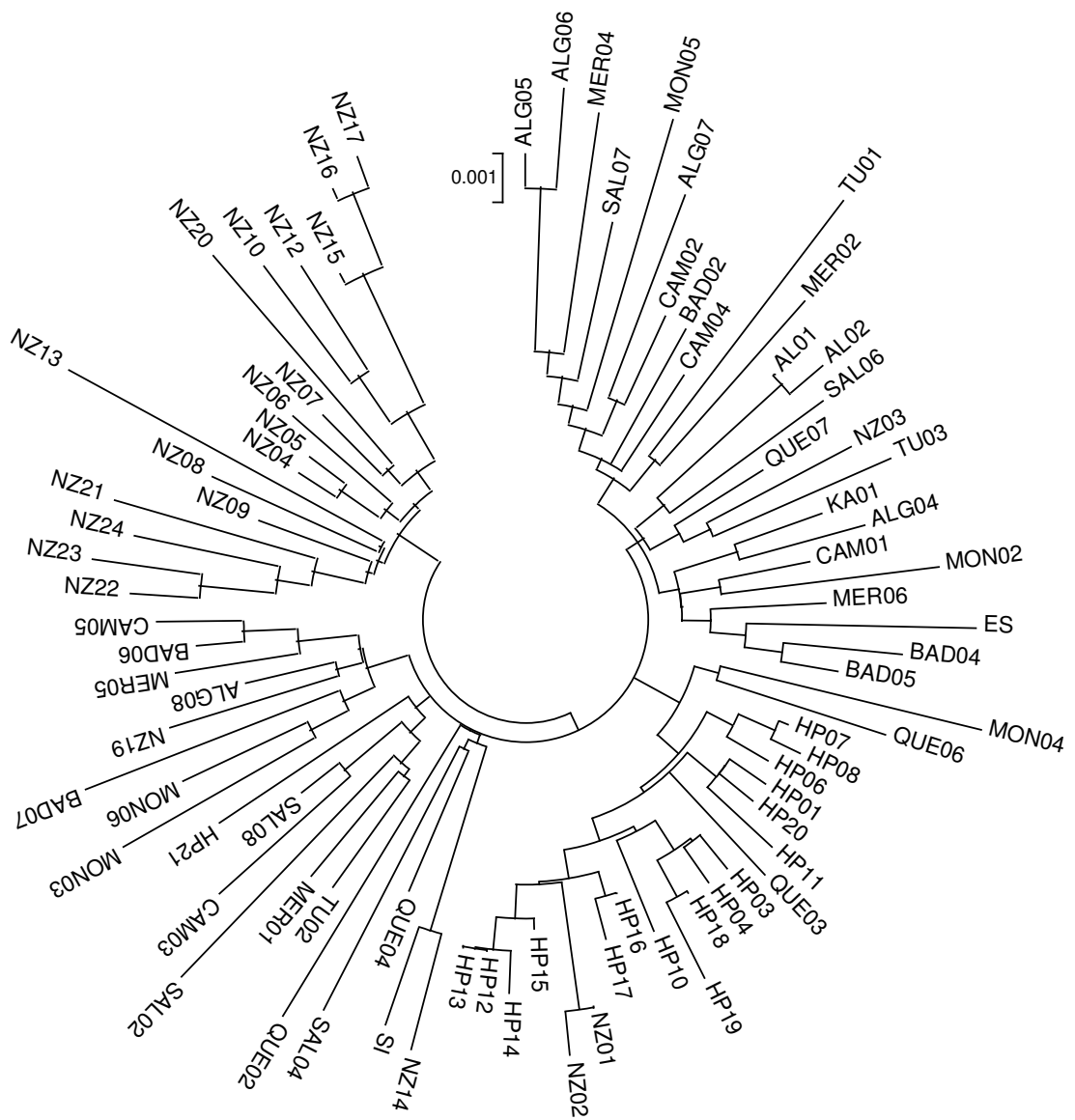


Figura 3.3.1. Histograma de sitios polimórficos. Se muestra el número de sitios polimórficos en intervalos de 50 pb dentro del D-Loop del ADNmt. Se aprecia que el número de sitios polimórficos es más abundante en las posiciones 208 a la 557, se observa que la región de 350 bp, es un sitio altamente polimórfico.

3.4. Evaluación del segmento más polimórfico del D-Loop.

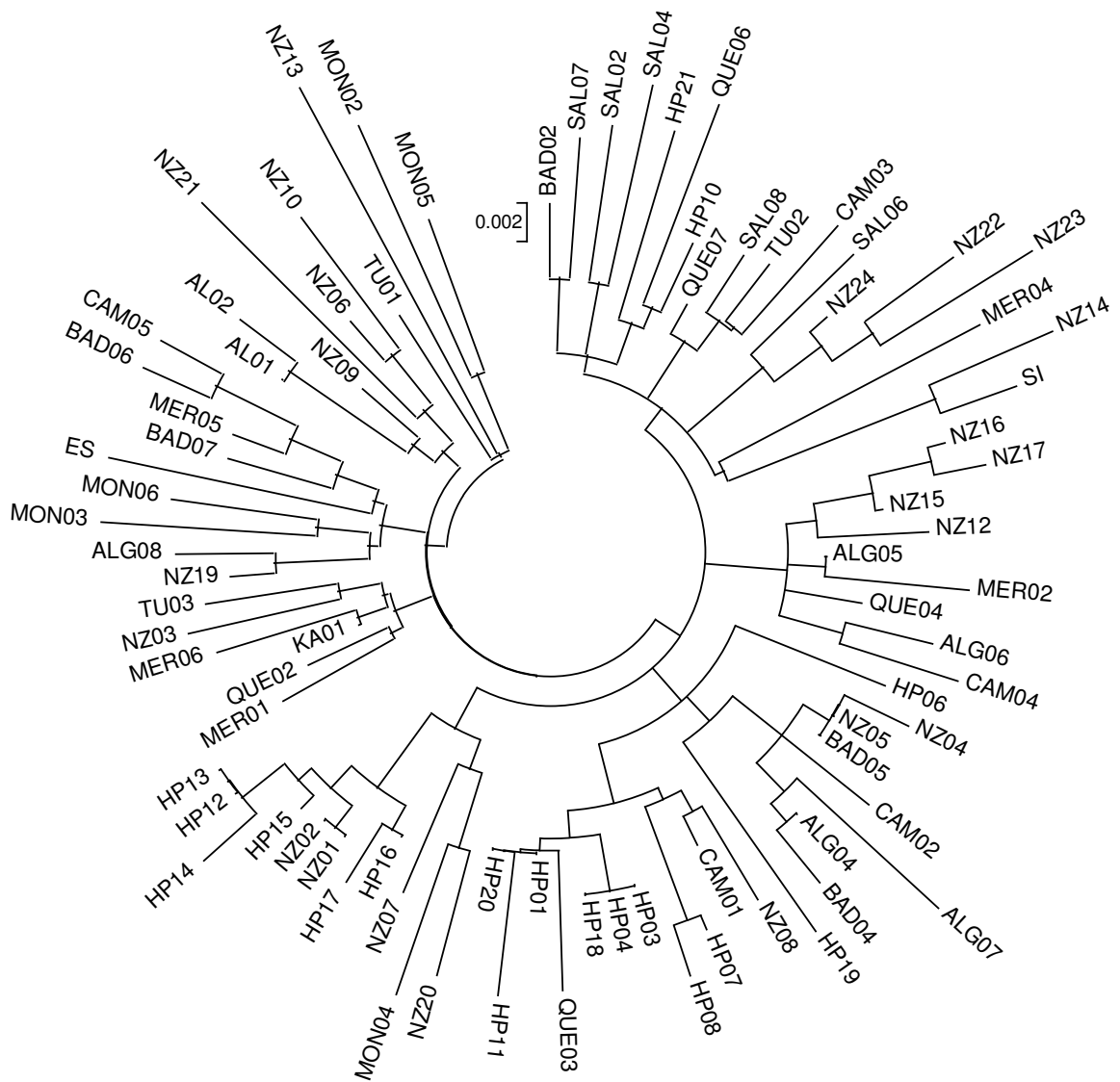
Se construyó un dendrograma por el método de neighbor-joining con el D-Loop completo (1180 pb), a partir de 30 haplotipos de ovejas de origen europeo, 35 haplotipos de 7 razas Churras portuguesas y 18 haplotipos de ovejas criollas mexicanas (figura 3.4.1.a)

En la alineación del fragmento polimórfico de 350 pb de los mismos 178 haplotipos utilizados en la alineación del D-Loop completo, se observaron 133 sitios polimórficos a lo largo de la secuencia del fragmento localizado en la posición 208 a la 557 del *D-Loop*. El porcentaje de polimorfismo observado fue de 38.00% (133/350), (Anexo 9).



a

Figura 3.4.1. Dendrograma a. En esta figura se observa el árbol a, que representa las agrupaciones de las secuencias del D-Loop completas de ovejas domésticas utilizadas en este trabajo. En el anexo 11, se observan los valores en porcentaje de cada nodo, éstos corresponden a las veces que se repite la topología de cada rama en 1000 replicas.



b

Figura 3.4.2. Dendrograma b. En esta figura se observa el árbol b, que representa las agrupaciones de las secuencias de los fragmentos de 350 pb de las mismas secuencias utilizadas para construir el árbol a. En el anexo 12, se observan los valores en porcentaje de cada nodo, éstos corresponden a las veces que se repite la topología de cada rama en 1000 replicas.

Se construyó un dendrograma por el método de neighbor-joining, a partir de la secuencia de 350 pb del segmento ubicado en las posiciones 208 a la 557 dentro del D-Loop de ovejas doméstica, se utilizaron los mismos haplotipos que

en el árbol a (figura 3.4.1.b). Se puede observar que la topología de los dos dendrogramas es muy similar.

Al recortar el D-Loop de 1180 a 350 pb en una muestra de 208 secuencias se redujo a 178 haplotipos distintos.

3.5. Análisis filogenético de ovejas Churras españolas.

Se obtuvo la secuencia de 34 animales. El análisis de alineamiento evidenció 33 haplotipos diferentes entre ellas. En el cuadro 3.5.1. se puede observar los sitios polimórficos de los 33 haplotipos de las secuencias de ovejas Churras españolas alineadas en relación a la secuencia de una oveja kivircik (TU01) (numero de acceso GeneBank AY091495).

Se observaron 61 sitios variables en la alineación del fragmento de 350 pb. El nivel de polimorfismo observado fue de 17.42% (61/350)

Cuando se alinearon los 33 haplotipos de ovejas Churras españolas, 30 haplotipos de ovejas comerciales de origen europeo con haplogrupo B, 18 haplotipos de oveja criolla mexicana y 130 haplotipos de 7 razas Churras portuguesas, se observaron 140 sitios polimórficos a lo largo de la secuencia del fragmento polimórfico localizado en la posición 208 a la 557 del *D-Loop*, El porcentaje de polimorfismo observado fue de 40% (140/350), (Anexo 10).

Los tipos, y posiciones de las mutaciones localizadas en los sitios polimórficos se muestran el cuadro 3.5.1. La sustitución más frecuente fue la transición de T por C con el 42% de las mutaciones, seguida por la A por G con 26%. Sólo se observó una transversión de T por G.

Cuadro 3.5.1. Sitios polimórficos de ovejas de raza Churra española. Se muestra el alineamiento de las posiciones nucleotídicas variables del fragmento de 350 pb del D-Loop mitocondrial, de ovejas de raza Churra españolas, con relación a la secuencia de oveja Kivircik (TU01).

HP	Muestra	Sitios Polimórficos						
		1	1111111111	1222222222	2222222333	3333333333	3	
		1112335	5677778990	0134556667	7001123344	5567888001	1111233344	5
		5684568570	6605799011	3111464566	8466791509	1320159680	4567925613	1
TU01	TU01	GATGTATTC	ATGTATGTAT	CAACCCGTAT	TAATCCCCTA	TTTAATCTTC	TGTTAATAC	T
01	01GC.....	...T.....	C.....C.....GC..	..	
02	02	.G.....	...C.C.....	T...A...	...C.....G..T	.	
03	03C...C...C	T..T.....C..GG...C		
04	04C.....	T.....	...C.....C.....C.G...C		
05	05,32G.....	...C.....	T..T.....	...C.....G...C		
06	06C.C.....	T.....C..	...C...C.G...C		
07	07C...C.....	T.....	...C.....TG..T	C	
08	09	A.....	...C.....	...T.....CG...C		
09	10C...C.....	T.....	...C.....	..C.G..C.G...C		
10	13C.....	...C.....	T.G.....	..GC.....G...C		
11	14C.....	...C.....	T..T.....GC...C		
12	15C.....	...C.C.....	T.....G.G...C		
13	16	..G.....	...C.....	T.....G.	..G.....G...C		
14	17T.....	...C.....	T..T.....G...C		
15	18C.C.....	T..T...C..	..G...C.	...G.....G...C		
16	19C.....	T..T.....T..G...C		
17	21C.....	...C...C.....	T..T.....T	C	
18	22C.....	..A..C.....	T.GT...C..G...C		
19	23G.....	...C...C.....	T..T...C..	..G...C.G...C		
20	24C.....	..A..C...C	T.GT...C..	..G.....A.C..G...C		
21	25C...C.....	T..T.....G.T..G...C		
22	26	..A.....CAC..	...T.....	..C..T..G...C		
23	27C.....CA..	TG.T.....	..G..T..G...C		
24	29G...C..G	T..T.....G.T..G...C		
25	30C.C.....	T..T...C..G...C		
26	31C.C.....	T..T...C..T..A..G...C		
27	33G.....CA..	T..T...C..G...C		
28	34C.....	GC...C.C..	T.G.....	...C...GG...C		
29	35G.....	...C.....	T.....	...C.T..G...C		
30	36G.....	...C.....	T.....	..CT.....G...C		
31	37C.....	...C.....	T..T.....	...C.....G...C		
32	38G.....C..G.	T.....C...G...C		
33	39C.....	...C.....	T..T.....	...C.....C.G...C		

HP= haplotipos de oveja Churra española.

Cuadro 3.5.2. Mutaciones puntuales. Se observan las mutaciones en el fragmento de 350 pb de ovejas Churras españolas estudiadas con Kivircick. En este cuadro se puede apreciar los tipos, posiciones y porcentaje de cambios nucleotidicos.

Tipo de cambio	Sustitución nucleotídica	Posición (pb)	# de haplotipos que cambiaron	# de sitios	Cambios totales	Porcentaje
TRANSICION	T por C	15	3	26	131	42.62
		28	2			
		35	1			
		37	2			
		66	7			
		75	1			
		79	33			
		90	7			
		101	1			
		165	8			
		176	1			
		178	1			
		216	13			
		240	3			
		251	1			
		253	2			
		262	1			
		285	1			
	306	1				
	308	3				
	314	2				
	316	1				
	317	1				
	329	2				
	336	2				
	351	31				
	C por T	50	1	12	65	19.67
		103	30			
		141	19			
		154	1			
		156	1			
		217	1			
		229	2			
		231	1			
		235	1			
		289	4			
310		1				
343		3				
A por G	6	1	16	66	26.22	
	16	6				
	56	2				
	77	1				
	91	2				
	111	1				
	131	4				
	166	1				
	204	1				
	206	5				
	249	1				
	270	1				
	281	8				
	332	2				
335	29					
341	1					
G por A	5	1	6	10	9.83	
	14	1				
	70	2				
	89	3				
	164	1				
315	2					
TRANSVERSIÓN	T por G	8	1	1	1	1.63
TOTAL				61	273	100

En el cuadro 3.5.2. se observa que el mayor número de cambios en el D-Loop son transiciones. Igualmente se puede apreciar que los cambios entre pirimidinas (T por C, C por T) son mas comunes 62.29% que los cambios entre purinas (A por G, G por A) el cual fue de 36.05%.

En el cuadro 3.5.3., se puede apreciar el porcentaje de divergencia nucleotídica y número absoluto de diferencias de nucleótidos entre los haplotipos. El número menor de cambios fue de 1 entre los haplotipos 31 y el 33 y entre el 4 y el 33. El mayor número de cambios fue de 17 entre el haplotipo 20 y el 22. Esto da una distancia mínima de 0.002 y una máxima de 0.051, con un promedio de 0.024 y un error estándar de ± 0.004 .

Cuadro 3.5.3. Distancias genéticas. Número absoluto de diferencias de nucleótidos (diagonal inferior) y Porcentaje de divergencia nucleotídica (diagonal superior) y por alineamiento comparativo entre los haplotipos identificados del segmento de 350 pb en oveja Churras españolas (Kimura 2 parámetros).

HP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
1	0	.032	.029	.029	.026	.032	.032	.020	.041	.035	.017	.029	.035	.023	.032	.023	.029	.029	.030	.041	.032	.030	.035	.029	.023	.029	.029	.044	.029	.032	.023	.029	.026	
2	11	0	.032	.020	.023	.023	.017	.029	.032	.026	.026	.026	.032	.026	.035	.026	.032	.041	.044	.029	.035	.038	.032	.026	.032	.032	.035	.020	.023	.020	.026	.023		
3	10	11	0	.023	.020	.025	.020	.020	.023	.029	.017	.023	.029	.017	.026	.017	.017	.023	.026	.029	.020	.038	.029	.023	.017	.023	.023	.032	.023	.026	.017	.023	.020	
4	10	7	8	0	.014	.014	.014	.020	.023	.017	.017	.017	.023	.017	.026	.017	.023	.023	.032	.035	.020	.026	.029	.023	.017	.023	.023	.026	.011	.014	.005	.017	.022	
5	9	8	7	5	0	.017	.017	.017	.020	.020	.014	.020	.020	.014	.023	.014	.020	.020	.017	.032	.017	.029	.026	.014	.014	.020	.008	.029	.006	.005	.008	.014	.011	
6	11	8	9	5	6	0	.017	.023	.026	.020	.020	.014	.026	.020	.011	.020	.026	.020	.023	.032	.023	.023	.032	.026	.008	.014	.020	.020	.014	.017	.014	.020	.017	
7	11	6	7	5	6	0	.023	.020	.020	.020	.020	.026	.020	.020	.029	.020	.014	.026	.029	.030	.017	.029	.032	.026	.020	.014	.020	.020	.035	.020	.023	.014	.020	.017
8	7	10	7	7	6	8	0	.032	.026	.014	.020	.026	.014	.023	.014	.020	.020	.029	.032	.023	.029	.026	.020	.014	.020	.020	.035	.020	.023	.014	.020	.017		
9	14	11	8	8	7	9	7	11	0	.029	.029	.029	.029	.029	.038	.023	.023	.035	.032	.047	.020	.032	.041	.029	.029	.035	.029	.026	.023	.020	.023	.029	.026	
10	12	9	10	6	7	7	7	9	10	0	.023	.023	.023	.017	.032	.023	.029	.023	.032	.029	.026	.032	.029	.029	.023	.029	.029	.026	.017	.020	.017	.023	.020	
11	6	9	6	6	5	7	7	5	10	8	0	.017	.023	.011	.020	.011	.017	.017	.026	.029	.020	.032	.017	.017	.011	.017	.017	.026	.017	.020	.011	.017	.014	
12	10	9	8	6	7	5	7	7	10	8	6	0	.023	.017	.020	.017	.017	.023	.032	.035	.020	.026	.029	.023	.011	.017	.023	.026	.017	.020	.017	.017	.020	
13	12	11	10	8	7	9	9	9	10	8	8	8	0	.023	.032	.017	.029	.029	.026	.035	.014	.038	.029	.017	.023	.029	.023	.038	.023	.020	.023	.023	.026	
14	8	9	6	6	5	7	7	5	10	6	4	6	8	0	.020	.011	.017	.017	.026	.029	.020	.032	.023	.017	.011	.017	.017	.032	.017	.020	.011	.017	.014	
15	11	12	9	9	8	4	10	8	13	11	7	7	11	7	0	.020	.026	.020	.023	.032	.029	.035	.032	.026	.008	.014	.020	.035	.026	.029	.020	.026	.023	
16	8	9	6	6	5	7	7	5	8	8	4	6	6	4	7	0	.011	.017	.026	.029	.014	.032	.023	.011	.011	.017	.017	.026	.017	.020	.011	.017	.014	
17	10	9	6	8	7	9	5	7	8	10	6	6	10	6	9	4	0	.023	.026	.035	.020	.038	.029	.023	.017	.023	.023	.026	.023	.026	.017	.023	.020	
18	10	11	8	8	7	7	9	7	12	8	6	8	10	6	7	6	8	0	.026	.011	.026	.030	.029	.023	.011	.017	.017	.032	.023	.026	.017	.023	.020	
19	13	14	9	11	6	8	10	10	11	11	9	11	9	9	8	9	9	0	.032	.023	.047	.032	.026	.020	.026	.014	.041	.026	.023	.026	.020	.029		
20	14	15	10	12	11	11	13	11	16	10	10	12	12	10	11	10	12	4	11	0	.038	.051	.035	.035	.023	.023	.029	.044	.035	.038	.029	.035	.032	
21	11	10	7	7	6	8	6	8	7	9	7	7	5	7	10	5	7	9	8	13	0	.035	.032	.014	.020	.026	.020	.029	.020	.017	.020	.020	.023	
22	13	12	13	9	10	8	10	10	11	11	11	9	13	11	12	11	13	13	16	17	12	0	.038	.038	.026	.032	.032	.035	.026	.029	.026	.032	.029	
23	12	13	10	10	9	11	11	9	14	10	6	10	10	8	11	8	10	10	11	12	11	13	0	.029	.023	.029	.023	.038	.023	.032	.023	.029	.026	
24	10	11	8	8	5	9	9	7	10	10	6	8	6	6	9	4	8	8	9	12	5	13	10	0	.017	.023	.017	.032	.023	.020	.017	.017	.020	
25	8	9	6	6	5	3	7	5	10	8	4	4	8	4	3	4	6	4	7	8	7	9	8	6	0	.005	.011	.026	.017	.020	.011	.017	.014	
26	10	11	8	8	7	5	9	7	12	10	6	6	10	6	5	6	8	6	9	8	9	11	10	8	2	0	.017	.032	.023	.026	.017	.023	.020	
27	10	11	8	8	3	7	9	7	10	10	6	8	8	6	7	6	8	6	5	10	7	11	8	6	4	6	0	.038	.017	.014	.017	.017	.020	
28	15	12	11	9	10	8	8	12	9	9	9	9	13	11	12	9	9	11	14	15	10	12	13	11	9	11	13	0	.026	.029	.026	.032	.029	
29	10	7	8	4	3	5	5	7	8	6	6	6	8	6	9	6	8	8	9	12	7	9	8	8	6	8	6	9	0	.008	.011	.011	.014	
30	11	8	9	5	2	6	6	8	7	7	7	7	7	10	7	9	8	9	8	13	6	10	11	7	7	9	5	10	3	0	.014	.014	.017	
31	8	7	6	2	3	5	5	6	6	4	6	8	4	7	4	6	6	9	10	7	9	8	6	4	6	6	9	4	5	0	.017	.022		
32	10	9	8	6	5	7	7	7	10	8	6	8	6	9	6	8	8	7	12	7	11	10	6	6	8	6	11	4	5	6	8	.020		
33	9	8	7	1	4	6	6	6	9	7	5	7	9	5	8	5	7	7	10	11	8	10	9	7	5	7	7	10	5	5	1	7	0	

HP = Número de haplotipo de las ovejas de raza Churra española.



Figura 3.5.1. Análisis filogenético de ovejas churras españolas. Se muestra un dendrograma en el cual se alinearon secuencias de ovejas Churras españolas, ovejas criollas mexicanas, ovejas churras portuguesas y ovejas neozelandesas. Se observa la notable agrupación de las ovejas criollas mexicanas, las otras ovejas se localizan de manera dispersa. En el anexo 13, se observan los valores en porcentaje de cada nodo, éstos corresponden a las veces que se repite la topología de cada rama en 1000 replicas.

Se construyó un dendrograma por el método de Neighbor-Joining, a partir de 33 haplotipos de oveja Churras españolas, 18 haplotipos de oveja criolla mexicana, 30 haplotipos de ovejas de origen europeo y 35 haplotipos de 7 razas churras portuguesas ver la figura 3.5.1. Se observa la notable agrupación de las ovejas criollas mexicanas, las otras ovejas Churras españolas y portuguesas se localizan de manera entremezclada con las neozelandesas. Se aprecia que los haplotipos de las ovejas Churras españolas se encuentran dispersas en todo el dendrograma. Los haplotipos de las ovejas criollas mexicanas se agrupan preferentemente en un extremo del dendrograma.

4. DISCUSIÓN

El número de sitios polimórficos a lo largo de la secuencia de 1180 pb correspondiente al *D-Loop* completo de *Ovis aries*^{9,25}, permitieron identificar un segmento de 350 pb localizado en las posiciones 208 a la 557, que representa el 29.66% de todo el D-Loop y que contiene el 54.5% de todos los sitios polimórficos.

Se encontró que los 155 haplotipos de 1180 pb bajados del GeneBank al ser recortados para evaluar el fragmento de 350 pb el número de haplotipos se redujo a 130.

Con la intención de evaluar el segmento polimórfico de 350 pb para reconstruir filogenias se generaron dos dendrogramas, con los mismos haplotipos, uno con todo el D-Loop (1180 pb) y otro empleando el fragmento polimórfico de 350 pb. Se encontró que los dos dendrogramas presentaron una topología muy semejante.

Estos hallazgos dan la oportunidad de utilizar un segmento más corto que el D-Loop completo en análisis filogenéticos, lo que simplificaría en tiempo y costos estos estudios en ovejas.

En el análisis de las 34 secuencias del D-Loop obtenidas de las ovejas de raza Churra, se identificaron 33 haplotipos, teniendo al haplotipo 5 en dos individuos por lo tanto se obtuvo un 97.05% de haplotipos únicos.

El análisis filogenético del fragmento polimórfico de 350 pb entre los 33 haplotipos encontrados en ovejas Churras y los haplotipos previamente descritos en ovejas de razas comerciales del haplogrupo europeo y depositados en la base de datos del GeneBank, haplotipos de razas Churras

portuguesas y haplotipos de ovejas criollas mexicanas permitió identificar 140 haplotipos totales.

Se observó que las ovejas de raza Churra españolas no tienden a agruparse como lo hacen las ovejas criollas mexicanas, más bien se distribuyen de manera dispersa, a lo largo del dendrograma. Esto nos sugiere que las ovejas Churras españolas tienen diversos orígenes.

Se ha propuesto que las ovejas criollas mexicanas se originaron de las ovejas Churras españolas²¹. Con los datos obtenidos en este trabajo, esta hipótesis es poco probable debido a que los haplotipos encontrados en las ovejas Churras españolas no se agrupan junto con los de las ovejas criollas mexicanas, la confianza estadística de cada nodo fue estimada sobre 1000 réplicas.

En un estudio, analizando la variabilidad genética en ovejas de razas españolas Churra, Lacha, Castellana, Rasa-Aragonesa y Merino⁴⁸. 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 más 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. En este trabajo se encontraron resultados similares, puesto que las ovejas de raza Churra española, no muestran un patrón de agrupamiento.

5. CONCLUSIONES

- Se identificó un fragmento polimórfico de 350 pb dentro del D-Loop, el cual puede servir como una herramienta muy importante en el estudio de ovejas domésticas.
- Se identificaron 33 haplotipos en la secuencia del fragmento de 350 pb localizado en la posición 208 a la 557 dentro del *D-Loop* del ADNmt de ovejas de raza Churra española.
- Se evidenció un grado de diversidad genética considerablemente alto (97.05%) lo cual sugiere una contribución de diferentes poblaciones en la formación de la oveja de raza Churra.
- 31 haplotipos encontrados en ovejas Churras españolas no habían sido descritos previamente.
- Los datos obtenidos muestran que la oveja churra española 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.
- Aparentemente las poblaciones de las ovejas criollas mexicanas no derivan de las ovejas Churras españolas. Sin embargo se necesita recabar mas información, ampliando el número de individuos analizados y utilizando otras herramientas de análisis filogenético, por ejemplo microsatélites.

6.- LITERATURA CITADA

- 1.- Piper L, Ruvinsky A. The Genetics of Sheep. USA: CAB International, 1997.
- 2.-Zeuner FE. A history of Domesticated Animals. Hutchinson, London1963.
- 3.- Nadler CF, Korobitsina KV, Hoffmann RS, Vorontsov NN. Cytogenetic differentiation, geographic distribution and domestication of palaeartic sheep (Ovis). Z. Saugetierkd 1973;38, 109–125.
- 4.- Wu CH, Zhang YP, Bunch TD, Wang S, Wang W. Mitochondrial control region sequence variation within argali wild sheep (Ovis ammon): evolution and conservation relevance. Mammalia 2003;67, 109–118.
- 5.- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. and H. Lewalski.. 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*. 1998a;89: 113-120.
- 6.- Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R. Molecular Analisis of Wild and Domestic Sheep Questions Current Nomenclatura and Provides Evidence for Domestication from Different Subspecies. Proc. R. Soc. Lond. B. 2002;269:893-904.
- 7.- Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutie´rrez-Gil B, San Primitivo F, Bayo´n Y. Evidence of three maternal lineages in Near Eastern sheep supporting multiple domestication events. Proc R Soc Lond B Biol Sci 2005;272:2211–7.
- 8.- Meadows JRS, Li K, Kantanen J, et al. (11 co-authors). Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. J Hered 2005;96:494–501.
- 9.- Wood NJ, Phua SH. Variation in the Control Region Sequence of the Sheep Mitochondrial Genome. *Animal Genetics*.1996;27(1): 25-33.
- 10.- Guo J, Du LX, Ma YH, Guan WJ, Li HB, Zhao QJ, Li X, Rao SQ. A novel maternal lineage revealed in sheep (Ovis aries). Anim Genet 2005;36:331–6.
- 11.- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Cinkulov M, Gonzarenko GI, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H y Kantanen J. Sheep Mitochondrial DNA Variation in European, Caucasian, and Central Asian Areas. Mol. Biol. Evol.2006;23:1776–1783.
- 12.- Meadows JRS, Cemal I, Karaca O, Gootwine E y Kijas W. Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. Genetics. 2007;175:1371-1379.
- 13.- Davis SJM.. Agricultural improvements in gharb al- Andaluz—zoo-archaeological evidence from the sheep bones. Proceedings of the fourth

conference on Iberian Archaeology; 2004 Sept 14-19; Faro, Portugal. Promontoria Monogr 2006;3:219–39.

14.- Pereira F, Pereira L, Van Asch B, Bradley DG, Amorim A. The mtDNA catalogue of all Portuguese autochthonous goat (*Capra hircus*) breeds: high diversity of female lineages at the western fringe of European distribution. *Mol. Ecol.* 2005;14, 2313–2318.

15.- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, Taberlet P. Multiple Maternal Origins and Weak Phylogeographic Structure in Domestic Goats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98(10): 5927-5932.

16.- <http://www.feagas.es/asociaciones/ovino/churra.htm>

17. http://dad.fao.org/cgi-bin/EfabisWeb.cgi?sid=8225e018bfe236821a2a89c84675b684,reportsreport8a_50012951.

18.- San Primitivo F, De la Fuente LF. Repercussion of selection program on Churra sheep breed. *Arch. Zootec.* 2000a; 49:39-43.

19.- San Primitivo F, De la Fuente LF. Present status of Churra sheep breed. *Arch. Zootec.* 2000b;49:161-165.

20.- anche@anche.org

21.- Perezgrovas Garza, R. . COMPARACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS: EL BORREGO CHIAPAS (MÉXICO) Y LAS RAZAS AUTÓCTONAS DE ORIGEN ESPAÑOL *Arch. Zootec.* 1998;47: 425-430.

22.- De Ascencao DC, Alonso RA, Ulloa R.. Genetic origin and diversity of the Mexican Creole sheep (*Ovis aries*) by mitochondrial DNA analysis. [GenBank direct submission] 2004.

23.- Medrano JA. Animal Genetic Resources from the Centre of Mexico. *Arch. Zootec.* 2000;49:385-390.

24.- FAO. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS). 2006

25.- FAO. 2002. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS). Available at: <http://www.fao.org.dadis/index.htm>.

26.- Falconer DS, Mackay TFC. Introducción a la Genética Cuantitativa. Editorial ACRIBIA SA, Zaragoza España 2001.

27.- Jenkins JB. Genetica. Editorial REVERTÉ SA, España 1986.

28.- Gardner EJ, Simmons MJ, Snustad DP. Principios de Genética. Editorial LIMUSA WILEY, DF México 2005.

- 29.- Martínez A, Vega JL. Caracterización genética mediante marcadores moleculares. Unidad de veterinaria. Departamento de genética. Universidad de Córdoba. Córdoba España. 2002;1-11.
- 30.- Vasquez ME, Tuena M. Mitocodria una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Editorial Pardo SA de CV. México DF: 2002;154-168.
- 31.- Vasquez ME, Tuena M. Mitocodria una mirada a la evolución de los conceptos básicos y modernos. Editorial Pardo SA de CV. México DF: 2002;154-168.
- 32.- Avise JC. Molecular Markers, Natural History and Evolution. USA (New York):Ed. Chapman & Hall, 1994.
- 33.- Zardoya R, Villalta M, López-Pérez MJ, Garrido-Pertierra A, Montoya J, Bautista JM. Nucleotide Sequence of the Sheep Mitochondrial *D-loop* and its Flanking tRNA Genes. *Curr. Genet.* 1995;28:94-96.
- 34.- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *Journal of Molecular Evolution.*1998b;47: 441-448.
- 35.- Hiendleder S, Phua HS, Hecht W. A Diagnostic Assay Discriminating Between Two Major *Ovis aries* Mitochondrial DNA Haplogroups. *Animal Genetics* 1999;30:211-213.
- 36.- Loftus TR, Machugh ED, Bradley GD, Sharp MP, Cunningham P. Evidence for Two Independent Domestication of Cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1994; 91: 2757-2761.
- 37.- Kikkawa Y, Amano T, Suzuki H. 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.* 1995;33: 51-60.
- 38.- Pegoraro L, Yang Z, Samake S, Meirelles FV, Bordignon V, Moquin LC, Smith LC. Sequence Comparison of Mitochondrial tRNA Genes and Origin of Light Strand Replication in *Bos taurus* and Nellore (*Bos indicus*) Breeds. *Animal Genetics.* 1996;27(2): 91-94.
- 39.- Nei M, Sudhir K. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press 2000.
- 40.- Nei N. and Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- 41.- Li W H. Molecular evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates1997.
- 42.- Hall BG. Phylogenetic Tree Made Easy. University of Rochester.2001.

43.- Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY. USA 1987.

44.- Takesaki N, Nei M. Genetic Distance and Reconstruction of Phylogenetic Trees from Microsatellite DNA. *Genetics*.1984;144: 389-399.

45.- Miller SA, Dykes D, Polesky HF. A Simple Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Research* 1989;16:1216.

46.- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004;5:150-163.

47.- Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. USA (NY):Oxford University Press, 2000.

48.- Arranz JJ, Bayón Y , San Primitivo F. Differentiation Among Spanish Sheep Breeds Using Microsatellites. *Genet. Evol.* 2001;33: 529-542.

7.- 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 μ l de la solución de lisis, añadir RNAsa a una concentración final de 10 μ g/ml e incubar por 1 hora a 37°C. Al término de esta incubación adicionar proteinasa K a una concentración de 50 μ 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 μ 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 μ l en H₂O dd estéril, se cuantifica y diluye a una concentración de 20 ó 50ng/ μ 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 μ l del ADN estándar (ADN λ 100ng/ml) en 2 ml de la solución estándar, presionar el botón de <CALIB>, indicar el valor de calibración (100 ng/ μ 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 μ 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 μ 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

	[stock]	[final]	1RX
DNA	20 ng/ μ l	80 ng	4 μ l
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2 μ l
Iniciadores	10 pM	0.5 pM	1 μ l
BSA	3 mg/ml	0.15 mg/ml	1 μ l
Tritón	2 %	0.1 %	1 μ l
Buffer C	10 X	1 X	2 μ l
Taq Polimerasa	5 U/ μ l	2.5 U	0.5 μ l
H₂O dd			8.5 μ l
Cbp *			20 μ l

* cuanto basta para

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 58 °C/30'' y extensión a 72 °C/1'; y 1 ciclo de extensión final a 72 °C/3'. La reacción se realizó en 20 μ l conteniendo: 100 ng de ADN molde, 0.5 pM de ambos iniciadores (MIT3 y MIT4, 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 μ g/ml de gelatina, 1.5 mM MgCl₂) y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Biogénica, México D.F.). 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 λ /BstEII (100 ng/ μ l) y visualizados con luz UV.

Anexo 5. 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 H₂O 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 H₂O dd cbp 40 ml, mezclar y dejar hidratar durante 12 horas. Decantar el sobrenadante y adicionar nuevamente H₂O dd cbp 40 ml (2 lavados). Almacenar el shepadex hidratado y refrigerado.

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 μ l
DNA templado	20 ng/ μ l	50 ng	2.5 μ l
Iniciador	2 pM/ μ l	6.4 pM	3.2 μ l
H₂O dd	-	-	10.3 μ l
cbp			20.0 μ l

La reacción de secuencia se trabajó por PCR 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.

Anexo 8: Alineación del D-Loop

Haplotipos presentes en el D-Loop de ADNmt de 30 ovejas neozelandesas con haplogrupo B, 130 de ovejas de 7 razas Churras portuguesas, 18 de ovejas criollas mexicanas.

```

!Domain=Data;
[
  1122334445 7779112234 5666778889 9900000111 1122222233 4445556677 7888889999 9001111122 ]
[
  4635010285 2475261798 4237261364 5603479012 4523456957 3462453525 9016890248 9010123401 ]
#TU01 GTCATTTTGC AATGGAACGC CTGGTCCTCT GTACACAAAC GAAGTATATT TTTTAAAAAT GCAATACTCA GTAATACATA
#AL01 .....T...
#AL02 .....T...
#ES .....T...A.....G.....C.....A.....T...
#KA01 .....C.....T...
#NZ01 .....C.T...T...
#NZ02 .....T.C.....T...
#NZ03 .....GA.....C.....T...
#NZ04 .....C.....T...
#NZ05 .....C.....T...
#NZ06 .....G.....C.....T...
#NZ07 .....G.....C.....T...
#NZ08 .....C.....T...
#NZ09 .....A.....G.....C.....T...
#NZ10 .....A.....C.....T...
#NZ11 .....A.....C.....T...
#NZ12 .....C.....T...
#NZ13 .....A.....T.....C.....G.....G.....
#NZ14 .....A.....C.....T...
#NZ15 .....A.....C.....T...
#NZ16 .....A.....C.....T...
#NZ17 .....A.....C.....T...
#NZ18 .....A.....C.....T...
#NZ19 .....G.....G.....C.....T...
#NZ20 .....C.....C.....C.T...
#NZ21 .....-.....A.....G...C.....C.....T...
#NZ22 .....-.....C.....C.....A.....T...
#NZ23 .....-.....G.....C.....A.....T...
#NZ24 .....-.....T.A.....C.....T...
#SI .....A.....C.....T...
#TU02 .....C.....C.....T...
#TU03 .....G.....C.....T...
#ALG01 ..T...A...A...T.C.....GTG...G...A...C.....C.G.C...A.C.T...
#ALG02 .....G...G...T.C.C...C.....C.....C...C...T...T...
#ALG03 .....G...G...T.C.C...C.....C.....C...C...T...T...
#ALG04 .....G.....C.....T...
#ALG05 .....CT...G.....C.....C.....T...
#ALG06 .....CT...G.....C.....C.....T...
#ALG07 .....G.....C.....C.....T...
#ALG08 .....G...A...C.....T...
#ALG09 .....C.....C...A...T...
#ALG10 .....G.....C.....T...
#ALG11 .....G...C.....T...
#ALG12 .....C.....C...C...TG...
#ALG13 .....C.....C.....T...
#ALG14 .....C.....C.....T...
#ALG15 .....C.....T...
#ALG16 .....C.....TG...
#ALG17 .....C.....T...
#ALG18 .....C.....T...
#ALG19 .....C.....T...
#ALG20 .....T.....C.....T...
#ALG21 .....T.....C...C...T...
#ALG31 .....C.....C...C...T...
#BAD01 ..TG...A...A...T.C.....GTG...G...A...C...C.....G.C...A...T...
#BAD02 .....T.....G.....C.....T...
#BAD03 .....G...G...T.C.C...C.....C.....C...C...T...T...
#BAD04 .....C...T.....-----

```

```

#BAD05 .....TA.....C.....T...
#BAD06 .....C.....CG...T...
#BAD07 .....G.....G.....C.....T...
#BAD08 .....G.....G.....C.....T...
#BAD09 .....G.....C.....A...GT...
#BAD10 .....C.....C.....A...T...
#BAD11 .....C.....C.....C...C.T...
#BAD12 .....C.....C.....T...
#BAD14 .....C.....C.....T...
#BAD15 .....C.....C.....T...
#BAD16 .....C.....C.....T...
#BAD17 .....C.....C.....T...
#BAD18 .....C.....C.....T...
#BAD19 .....C.....C.....T...
#BAD20 .....C.....C.....T...
#BAD21 .....C.....C.....T...
#BAD22 .....C.....C.....T...
#CAM01 .....C.....C.....T...
#CAM02 .....C.....C.....T...
#CAM03 .....T.....C.....C.....T...
#CAM04 .....C.....C.....C.....T...
#CAM05 .....A.....C.....C.....T...
#CAM06 .....A.....G.....C.....T...
#CAM07 .....A.....C.....C.....T...
#CAM08 .....C.....C.....C.....T...
#CAM09 .....C.....C.....C.....T...
#CAM10 .....C.....C.....C.....T...
#CAM11 .....C.....C.....C.....T...
#CAM12 .....C.....C.....A...T...
#CAM13 .....C.....C.....A...T...
#CAM14 .....C.....C.....T...
#CAM15 .....C.....C.....T...
#CAM16 .....C.....C.....T...
#CAM17 .....C.....C.....T...
#CAM18 .....C.....C.....T...
#MER01 .....C.....G.....C.....T...
#MER02 .....A.....G.....C.....T...
#MER04 .....C.....C.....C.....T...
#MER05 .....C.....G.....C.....T...
#MER06 .....C.....C.....C.....T...
#MER07 .....C.....C.....C.....T...
#MER08 .....C.....C.....C.....T...
#MER09 .....C.....C.....C.....T...
#MON01 ..T...A...A...A...T...GTG...G...AC.....C...G.C.....A...T...
#MON02 .....C.....A...T...GTG...G...AC.....C...C.....A...T.G
#MON03 .....G.....G.....C.....T...
#MON04 .....T.....C.....C.....C.....C.T...
#MON05 .....G.....C.....C.....T...G
#MON06 .....G.....C.....C.....G...T...
#MON07 .....G.....C.....C.....T...
#MON08 .....G...C...C...C.....A...T...
#MON09 .....G.....C.....C.....C.....T...
#MON10 .....C.....C.....C.....T...
#MON11 .....C.....C.....C.....T...
#MON12 .....C.....C.....C.....T...
#QUE01 ..T...A...A...T...C.....GTG...G...A...C.....C...G.C.....A...C.T...
#QUE02 .....C.....C.....C.....C.....T...
#QUE03 .....C.....C.....C.....C.....T...
#QUE04 .....G.....C.....C.....C.....T...
#QUE06 .....G.....C.....C.....C.....T...
#QUE07 .....C.....C.....C.....T...
#QUE08 .....C.....C.....C.....T...
#QUE09 .....A.....G.....G.....C.....C.....T...
#QUE10 .....G.....C.....C.....C.....T...
#QUE11 .....G.....C.....C.....C.....T...
#QUE12 .....G.....C.....C.....C.....T...
#QUE13 .....G.....C.....C.....C.....T...
#QUE14 .....C.....C.....A...C.....T...
#QUE15 .....G.....C.....C.....A...T...
#QUE16 .....C.....C.....AC...T...
#QUE17 .....C.....C.....G...T...
#QUE18 .....G.....C.....C.....G...T...
#QUE19 .....C.....C.....C.....T...
#QUE21 .....C.....C.....C.....T...
#QUE22 .....C.....C.....C.....T...
#QUE23 .....C.....C.....C.....T...
#SAL01 A.T...A...A...T...C.A...GTG...G...A...C...G.C.....A...T...

```

```

#SAL02 .C.....G....C.....C.....T.C.
#SAL03 .T...A...A...T.C.....-G.T---CGA...AC...T...
#SAL04 .....T.....C.....T...
#SAL06 .....T.....A.....C.....T...
#SAL07 .....C.....C.....T...
#SAL08 .....T.....C.....A...T...
#SAL09 .....G.....C.....C.....T...
#SAL10 .....T.....C.T...T...
#SAL11 .....C.....C.....C.....T...
#SAL12 .....C.....C.....C.....T...
#SAL13 .....G.....C.....C.....T...
#SAL14 .....G.....C.....A...GT...
#SAL15 .....G.....C.....A...T...
#SAL16 .....G.....C.....C.....T...
#SAL17 .....G.....C.....C.....T...
#SAL18 .....G.....C.....C.....T...
#SAL19 .....C.....C.....C.....T...
#SAL20 .....C.....C.....C.....T...
#SAL21 .....C.....C.....A...T...
#SAL22 .....C.....C.....A...T...
#SAL24 .....C.....C.....C.....T...
#SAL25 .....C.....C.....C.....T...
#SAL26 .....C.....C.....C.....T...
#SAL27 .....C.....C.....C.....T...
#SAL28 .....C.....C.....C.....T...
#SAL29 .....C.....C.....C.....T...
#SAL30 .....C.....C.....C.....T...
#HP01 .....C.....C.T...T...
#HP03 .....C.....C.T...T...
#HP04 .....G.....C.....C.T...T...
#HP06 .....C.....C.T...T...
#HP07 .....C.....C.T...T...
#HP08 .....C.....C.T...T...
#HP10 .....C.....C.T...T...
#HP11 .....C.....C.T...T...
#HP12 .....C.....C.T...T...
#HP13 .....C.....C.T...T...
#HP14 .....C.....C.T...T...
#HP15 .....C.....C.T...T...
#HP16 .....C.....C.T...T...
#HP17 .....C.....C.....T...
#HP18 .....C.....GC.T...T...
#HP19 .....C.....GC.T...T...
#HP20 .....C.....C.....T...
#HP21 .....A.....C.....T...

[ 3333333333 3333333333 3333334444 4444444444 4444444444 4444444444 4444455555 5555555555 ]
[ 2223334445 5666677778 8889990011 1122222334 4445555566 6666777889 9999900000 1112222333 ]
[ 2780891681 7246805676 7891784645 7802457380 1260123513 4568349020 1346801349 2482678013 ]
#TU01 TATATAATAC AACCTCGTAA TATGATTATA ATATACTAAC ACCAGTATAT ATAAATATAT AATATACCCA TATCTGTCC
#AL01 .....C.....C.....
#AL02 .....C.....
#ES .....T.....G.....T...
#KA01 .....T.....C.....
#NZ01 .....T.....G.....
#NZ02 .....T.....G.....
#NZ03 .....T.....A.....C.....C...
#NZ04 .....T.....C.....C...
#NZ05 .....T.....C.....C...
#NZ06 .....G.....T.....G.....
#NZ07 .....C.....T...
#NZ08 .....T.....G.....G.....G...
#NZ09 .....G.....
#NZ10 .....G.....G.....T...
#NZ11 .....G.....G.....T...
#NZ12 .....G.....C.....
#NZ13 .....T.....G.....C.....C...
#NZ14 .....C.....T.....C.....G.....G.C.T...
#NZ15 .....C.....T...
#NZ16 .....C.....G.....T...
#NZ17 .....T.....C.....G.....T...
#NZ18 .....C.....G.....T...
#NZ19 .....G.....C.....
#NZ20 .....C.....G...
#NZ21 .....G.....A.....C.....C...
#NZ22 C.....T.....C.....C.....G...
#NZ23 C.....T.....A.....C.....A...

```

```

#NZ24 C.....T .....C..... .G.....
#SI ....C...T .....C..... .G..C..T.....
#TU02 .....T .....G..... .G.....T.....
#TU03 .....T .....C..... .G.....C...
#ALG01 .....G...A...C.....CG...A...C.....G..G..CAC...
#ALG02 .....T.....G...C...T.....G.....T
#ALG03 .....T.....G...T.....G.....T
#ALG04 .....T .....C.....C.....
#ALG05 .....C.....C.....
#ALG06 .....G...C.....
#ALG07 .....C..C.....C..C...
#ALG08 ....G..T .....C.....
#ALG09 .....T .....A.....G.....T...
#ALG10 ..C.....A.....G...T.....
#ALG11 .....G..T .....G.....A.....T.....T
#ALG12 .....T .....C...G...G.....G.....T.....
#ALG13 ....G..T .....A.....C.....C.....G.....G.....
#ALG14 .....AC.....C.....
#ALG15 .....C.....G.....
#ALG16 .....T .....C.....T.....T
#ALG17 .....T .....C.....G.....T...C.....
#ALG18 .....T .....A...C.....G.....T...C.....
#ALG19 .....T .....A.....G.....G.....T.....
#ALG20 .....T .....A.....G.....G.....G.....
#ALG21 .....T .....T.....C.....C.....
#ALG31 .....T .....G...A.....G..G..CAC...
#BAD01 C.....T G...A...C.....G...A.....G..G..CAC...
#BAD02 .....C.....G.....T...
#BAD03 .....T.....G...T...C.....G.....T
#BAD04 .....T .....C...A.....C.....
#BAD05 .....T .....C.....C.....
#BAD06 .....T .....C.....T...
#BAD07 .....G..T .....G.....C..C.....
#BAD08 .....T .....A...G.....C.....C.....
#BAD09 .....T .....A.....G.....C.....G.....
#BAD10 .....C...A.....C.....G.....C.....
#BAD11 .....C.....A.....G.....G.....C.....
#BAD12 .....C.....G.....AC...
#BAD14 .....C.....C.....
#BAD15 ....G..T .....C.....
#BAD16 .....T .....A.....C.....
#BAD17 .....T .....C.....C...A.....G.....
#BAD18 .....T .....C.....C.....
#BAD19 .....T .....C.....C.....
#BAD20 .....T .....A.....C.....
#BAD21 .....T .....C.....C.....
#BAD22 .....C...T.....T.....C...
#CAM01 .....T .....G.....G.....T...C...
#CAM02 .....T .....C.....G.....T...C...
#CAM03 .....T .....T.....C.....G.....T...
#CAM04 .....C.....C.....C.....
#CAM05 .....T .....C.....T...
#CAM06 ....G..T .....C.....T...C...
#CAM07 ....G..T .....G.....C.....G.....G.....
#CAM08 .....T .....A...G..G.....C.....C.....
#CAM09 .....GT.....C.....C.....
#CAM10 .....C.....A.....C.....
#CAM11 .....C.....C.....A.....C.....G...T...
#CAM12 .....T .GT.....C.....A.....G...T...
#CAM13 .....T .....T.....C.....C.....G.....
#CAM14 .....C.T .....A.....C.....G.....
#CAM15 .....T .....T.....A.....C.....G...T...
#CAM16 .....T .....C.....G...T...
#CAM17 .....T .....G...T...
#CAM18 .....T .....T.....G...T...
#MER01 .....T .....C.....G.....
#MER02 ..C.....C.....C.....
#MER04 .....C.....CG...C.....
#MER05 .....T .....C.....
#MER06 .....T .....T.....C.....
#MER07 .....T .....C.....A.....
#MER08 .....T .....G.G..C.....G.....C...A...
#MER09 .....T .....A.....GG...T...
#MON01 G...A...CG...A...G..G..CAC...
#MON02 .....T .....G.....C.....
#MON03 ....G..T .....G.....G.....
#MON04 .....T .....C...C.....G...T...

```

```

#MON05 .....T.....G.....
#MON06 .....T.....
#MON07 .....T.....C.....G.....
#MON08 .....A.....C.....A.....
#MON09 .....G.....A.....
#MON10 .....T.....T.....C.....C.....G.....T.....A.....
#MON11 .....T.....
#MON12 .....T.....C.....
#QUE01 .....G.....A.....C.....CG.....A.....C.....G.....CAC...
#QUE02 .....T.....C.....C.....C.....
#QUE03 .....T.....C.....G.....G.....
#QUE04 .....T.....A.....G.....G.....T.....
#QUE06 .....T.....A.....G.....T.....
#QUE07 .....T.....T.....
#QUE08 .....G.....T.....G.....C.....
#QUE09 .....G.....C.....
#QUE10 .....G.....T.....C.....C.....G.....G.....
#QUE11 .....T.....C.....C.....G.....C.....A.....
#QUE12 .....C.....G.....C.....
#QUE13 .....C.....C.....
#QUE14 .....C.....C.....
#QUE15 .....T.....A.....G.....T.....
#QUE16 C.....T.....C.....T.....
#QUE17 .....T.....G.....C.....C.....T.....G.....G.....
#QUE18 .....T.....G.....C.....T.....G.....G.....
#QUE19 .....T.....C.....T.....T.....
#QUE21 .....T.....C.....C.....C.....G.....T.....T.....
#QUE22 .....C.....C.....
#QUE23 .....T.....
#SAL01 .....G.....A.....CG.....A.....G.....G.....CAC...
#SAL02 .....T.....C.....G.....G.....G.....
#SAL03 .....T.....A.....C.....A.....G.....G.....CAC...
#SAL04 .....T.....G.....G.....A.....G.....T.....A.....
#SAL06 .....T.....C.....C.....
#SAL07 .....G.....C.....G.....C.....G.....
#SAL08 .....T.....G.....T.....
#SAL09 .....G.....T.....A.....
#SAL10 .....T.....
#SAL11 .....
#SAL12 .....T.....G.....T.....
#SAL13 .....T.....T.....
#SAL14 .....T.....A.....G.....C.....G.....
#SAL15 .....T.....A.....G.....
#SAL16 .....T.....C.....G.....
#SAL17 .....T.....C.....G.....A.....G.....
#SAL18 .....T.....AC.....
#SAL19 .....T.....T.....C.....G.....T.....T.....
#SAL20 .....T.....C.....
#SAL21 .....T.....TA.....A.....T.....
#SAL22 .....T.....A.....C.....
#SAL24 .....T.....A.....G.....C.....C.....G.....
#SAL25 C.....C.....C.....G.....C.....
#SAL26 .....T.....C.....G.....A.....
#SAL27 .....T.....C.....
#SAL28 .....T.....C.....
#SAL29 .....T.....G.....T.....C.....
#SAL30 .....G.....C.....C.....G.....
#HP01 .....T.....G.....
#HP03 .....T.....G.....T.....
#HP04 .....T.....G.....T.....
#HP06 .....T.....C.....G.....T.....
#HP07 .....T.....G.....G.....G.....T.....
#HP08 .....T.....G.....C.....G.....T.....
#HP10 .....G.....T.....G.....T.....
#HP11 .....T.....T.....C.....G.....
#HP12 .....T.....G.....T.....
#HP13 .....T.....G.....T.....
#HP14 .....T.....T.....C.....G.....T.....
#HP15 .....T.....G.....T.....
#HP16 .....G.....T.....
#HP17 .....A.....G.....T.....
#HP18 .....T.....G.....T.....
#HP19 .....C.....T.....G.....T.....C.....
#HP20 .....T.....G.....
#HP21 .....T.....C.....A.....C.....G.....T.....

```

```

[      555555555 555555555 555666666 666777777 777777777 888889999 999000000 000001111 ]
[      334444455 556677789 999011123 679000111 123667778 013441122 789011123 667899123 ]
[      571247812 452338901 247624884 718023024 965251292 844374878 117015743 573807703 ]
#TU01  GATGAATTAA ACATTGACAC TTTGCTTATC AATACTGACT TCGTTATCCA TACTGCCGAT GGTCTCGGTT TTTCCACTTA
#AL01  ....G....  ...C....T  ...T....  ..C.....  .....  G.T..T...  ..G.....  .....
#AL02  ....G....  ...C....T  ...T....  ..C.....  .....  G.T..T...  ..G.....  .....
#ES     ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  GGT.....  ..G.....  .....
#KA01  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..A.....  G.T.....  ..G...A...  ....T...
#NZ01  ....G....  .T.C....T  ...T....  .....  ..T.....  GGTA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ02  ....G....  .T.C....T  ..C.T....  .....  ..T.....  GGTA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ03  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ04  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ05  ....G....  ..GC....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ06  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ07  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ08  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..T.....  G.TA....C  ..G.....  ..C.....
#NZ09  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ10  ....G....  .T.C....T  ...T....  .....  .....  G.TA...AG  ..G.....  ..C.....
#NZ11  ....G....  .T.C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ12  ....G....  .T.C....T  ...T....  .....  .....  G.TA...AG  ..G.....  ..C.....
#NZ13  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ14  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..C.....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ15  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G..A.....  ..G.....  ..C.....
#NZ16  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G..A....C  ..G.....  ..C.....
#NZ17  ....G....  .T.C....T  ...T....  .....  .....  G..A....C  ..G.....  ..C.....
#NZ18  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G..A.....  ..G.....  ..C.....
#NZ19  ....G....  ...C....T  ...T....  ..G.....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#NZ20  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA....C  A.G.....  ..C.....
#NZ21  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G...A...  ..C.....
#NZ22  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G...A...  ..C.....
#NZ23  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G...A...  ..C.....
#NZ24  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.TA.....  ..G.....  ..C.....
#SI     ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..C.....  G.TA.....  ..G...A...  .....
#TU02  ....G....  ...C....T  ...T.C....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....G
#TU03  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..C.....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG01  ....C.G.  ...C....GT  C..A..C..T  G.....T...  .....TT.  G.T...A...  ..G.C.AA...  .....
#ALG02  AGC...C...  ...C.A...T  ..ATCC..T  G...C...  ..T...TT.  G.T.....  ..GTC..A...  .....T...
#ALG03  AGC...C...  ...C.A...T  ..ATCC..T  GG..TC...  ..T...TT.  G.T.....  ..GTCT.A...  .....T...
#ALG04  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G...A...  .....G...
#ALG05  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..T....  G.T...T..C  ..G.....  .....
#ALG06  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..T....  G.T...T..C  ..G.....  .....
#ALG07  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..G....  G.T...C...  ..GT.....  .....
#ALG08  ..C.G...  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG09  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  GGT.....  ..G.....  .....
#ALG10  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  GGT.....  ..G.....  .....
#ALG11  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.C.....  .....
#ALG12  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G...A...  .....
#ALG13  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG14  ..C.G...  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG15  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG16  ..C.G...  ...C....T  ...T.C...  ..T....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG17  ....G....  ...C....T  ...T.C...  ..G....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG18  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG19  ....G....  ...C....T  ...T....  ..G....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#ALG20  ....G....  ...C.A...T  ...T....  .....  ..T....  G.T...A...  ..G.....  .....
#ALG21  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  GGT.....  ..GT.....  .....
#ALG31  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....T...
#BAD01  ...A.GC.G.  ...C....GT  C..A..C..T  G.....T...  .....TT.  G.T.....  ..G.C.A...  .....
#BAD02  ....G....  ...C....T  ...T....  ..G....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD03  AGC...C...  ...C.A...T  ..ATCC..T  GG..TC...  ..T...TT.  G.T.....  ..GTCT.A...  .....T...
#BAD04  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  GGT.....  ..G.....  .....
#BAD05  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  GGT.....  ..G.....  .....
#BAD06  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD07  ....G....  .T.C....T  ...T....  ..G.C...  .....  G.T.....  ..G.C.....  .....C...
#BAD08  ....GC...  ...C....T  ...T....  ..G....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD09  ....G....  ...C....T  C...T....  ..GT...  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD10  ....G.C...  ...C....T  ...T....  .....  ..C.C...  G.T...C...  ..G.....  .....
#BAD11  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.C.....  .....
#BAD12  ....G....  ...C....T  ...T...T  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD14  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  ..T....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD15  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD16  ....G....  .T.C....T  ...T....  ..G....  .....  G.T.....  ..G.C...C...  .....
#BAD17  ..C.G...  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  AAG.....  .....
#BAD18  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....T...
#BAD19  ..C.G...  ...C.G..T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD20  ....G....  ...C....T  ...T....  .....  .....  G.T.....  ..G.....  .....
#BAD21  ....G....  .T.C....T  ...T....  ..G....  .....  G.T...C...  ..G.C...C...  .....

```

#BAD22G.....C.....T.....T.....G......G.....
#CAM01G.....C.....T.....T.....G.T.....A.G.....
#CAM02G.....C.....T.....T.....G.T.....C.....G.....
#CAM03G.....C.....T.....T.....C.....G.T......G.....
#CAM04 ..C.G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM05G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM06G.....C.....T.....TC.....G.T......GT...A...C...
#CAM07G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM08G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM09GG.....C.....T.....T.....C.....G.T......G.....
#CAM10G.....C.....T.....T.....G.T......AG.....
#CAM11G.....C.....T.....T.....G.T......AG.....
#CAM12G.....C.....T.....TC.....G.T......G.....
#CAM13 ..C.G.....C.....T.....T.....G.T.....AAG.....
#CAM14G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM15G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM16G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#CAM17GG.....C.....T.....T.....GGT......G.C.....
#CAM18G.....C.A...T.....T.....G.T......G.....
#MER01GG.....C.....T.....T.C...G.T......G.....
#MER02G.....C.....T.....G.....G.T......G.....C...
#MER04G.....C.....T.....T.....C.....G.T.....C.....G.....
#MER05G.....T.C...T.....TC...G...G.T......G.....
#MER06G.....C.....T.....T.....GGT......G.....
#MER07G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#MER08G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#MER09G.....C.....T.....T.C...G.T......G.....
#MON01C.G...C...GT C.A..C..T G.....TT.G.T......G.C..A...
#MON02G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#MON03GC...C...T.T.....T.....G.....G.T......A.G.....
#MON04G.....C.....T.....AT...G.T......G......C...
#MON05G.....C.....T.....TC...C.....G.T.....C.....G...A...
#MON06C...C.A..T.....T.....G.....G.T......G...A...
#MON07G.....C.....T.....T.....G.....G.T......G.C...
#MON08G.....C.....T.....T.....G.T......GT...
#MON09G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#MON10G..G...C.....T.....T.C...G.T.....C.....G.....
#MON11 ..C.G...C...T.....T.....G.....T.....G.T......G.....C...
#MON12 ..C.G...C...T.....T.....G.....T.....G.T......G.....C...
#QUE01C.G...C...GT C.A..C..T G.....T.....TT.G.T...A...G.C.AA...
#QUE02G.....C.....T.....T.C...G.....C.....G.T.....C A.G...
#QUE03G.....T.C...T.....T.....G.T......G.....
#QUE04G.....C.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#QUE06G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#QUE07G.....C.....T.....T.....T.....G.T......G.C...
#QUE08G.....C.....T.....TC.....G.T......GT...A...
#QUE09G.....T.C...T.....T.....G.....G.T......G.C...C...
#QUE10G.....C.....T.....C...G.....G.T......G.....
#QUE11G.....C.....T.....T.....G.....G.T......G.....
#QUE12G.....C.....T.....TC...G.....G.T......G.....
#QUE13G.....C.....T A.T.....G.....G.T......G.....
#QUE14G.....T.C...T.....T.....G.T.....C AG...
#QUE15G.....C.....T.....T.....GGT......G.....
#QUE16G.....C.....T.....T.....G.T.....C.....G...A...
#QUE17G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#QUE18G.....C.....T.....T.....G.T.....G.T.A...G.....
#QUE19G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#QUE21G.....C.....T.....T.C.C...C.....GGT......G.....
#QUE22 ..C.G...C...T.....T.....G.T......G.....
#QUE23G.....C.....T.....T.....A...G.T......G.C...
#SAL01 ..A.GC.G...C...GT C.A..C..T G.....TT.G.T......G.C..AC...
#SAL02G.....C.....T.....C...T.....G.T......GT...
#SAL03 ..A.GC.G...C...GT C.A..C..T G.....TT.G.T......GTC..A.C...
#SAL04G.....C.....T.....T.....G.....G.T...T...G.....
#SAL06 ..C.G...C...T.....T.....T.....G.T......G...A...
#SAL07G.....C.....T.....T.....G.T.....C.....G...A...
#SAL08G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#SAL09G.....C.....T.....T.....G.....G.T.A...G.....
#SAL10GC...T.CC...GT.....T.....G.T......G.....
#SAL11G.....C.....T.....T.....G.T......G.....
#SAL12G.....C...T.....T.....G.T......G.....
#SAL13G.....G...C...T.....T.....G.....G.T......G.....
#SAL14G.....C.....T.....T.....GT.....G.T......G.....
#SAL15G.....C.....T.....T.....GT.....G.T......G.....
#SAL16G.....C.....T C.TC...G.....G.....G.T......G.....
#SAL17G.....C.....T.....T.....G.....G.T......G.....
#SAL18G.....C.....T.....T.....G.T......G...A...


```

#SAL19 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#SAL20 .....GC.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#SAL21 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.C.....
#SAL22 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#SAL24 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T.....AAG.....
#SAL25 ..C.G.....C.....T.....T..G.....T.....G......G.....
#SAL26 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T..T......G......C.....
#SAL27 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#SAL28 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G......C.....
#SAL29 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#SAL30 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....G.T.....AAG.....
#HP01 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G..T.....
#HP03 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....C.....GGT......G.....
#HP04 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP06 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#HP07 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#HP08 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....G.T......G.....
#HP10 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP11 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP12 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP13 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP14 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP15 .....G.....C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP16 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP17 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP18 .....G.....T.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP19 .....G.....T.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP20 .....G.....T.C.....T.....T.....T.....T.....GGT......G.....
#HP21 .....G.....C.....T.....T.....T.....G.....T.....G.T......G.....

```

```

[      1111]
[      1111]
[      5778]
[      3230]

```

```

#TU01 AACA
#AL01 ....
#AL02 ....
#ES    ....
#KA01  ....
#NZ01  ....
#NZ02  ....
#NZ03  ....
#NZ04  ....
#NZ05  ....
#NZ06  ..T.
#NZ07  ....
#NZ08  ....
#NZ09  ....
#NZ10  ....
#NZ11  ....
#NZ12  ..T.
#NZ13  ....
#NZ14  ....
#NZ15  ..T.
#NZ16  ..T.
#NZ17  ..T.
#NZ18  ..T.
#NZ19  ..T.
#NZ20  ..T.
#NZ21  ....
#NZ22  ....
#NZ23  ....
#NZ24  ..T.
#SI    ....
#TU02  ....
#TU03  ....
#ALG01 ..T.
#ALG02 ..T.
#ALG03 ..T.
#ALG04 ...G
#ALG05 ....
#ALG06 ....
#ALG07 ....
#ALG08 ....
#ALG09 ....
#ALG10 ....
#ALG11 ....

```

#ALG12
#ALG13
#ALG14
#ALG15
#ALG16
#ALG17
#ALG18
#ALG19
#ALG20
#ALG21
#ALG31
#BAD01 ..T.
#BAD02
#BAD03 ..T.
#BAD04
#BAD05
#BAD06
#BAD07 ..T.
#BAD08
#BAD09
#BAD10
#BAD11
#BAD12 G...
#BAD14 ..T.
#BAD15
#BAD16
#BAD17
#BAD18
#BAD19
#BAD20 .T..
#BAD21
#BAD22
#CAM01
#CAM02
#CAM03 ..T.
#CAM04
#CAM05
#CAM06 .T..
#CAM07
#CAM08
#CAM09 ..T.
#CAM10
#CAM11
#CAM12
#CAM13
#CAM14
#CAM15 ..T.
#CAM16
#CAM17
#CAM18
#MER01
#MER02
#MER04
#MER05
#MER06
#MER07
#MER08
#MER09
#MON01 ..T.
#MON02
#MON03
#MON04
#MON05
#MON06
#MON07
#MON08
#MON09
#MON10
#MON11
#MON12
#QUE01 ..T.
#QUE02
#QUE03
#QUE04
#QUE06
#QUE07
#QUE08

#QUE09
#QUE10
#QUE11 ..T.
#QUE12
#QUE13
#QUE14
#QUE15
#QUE16
#QUE17
#QUE18
#QUE19
#QUE21
#QUE22
#QUE23
#SAL01 ..T.
#SAL02
#SAL03
#SAL04
#SAL06
#SAL07
#SAL08
#SAL09
#SAL10
#SAL11
#SAL12
#SAL13 ..T.
#SAL14
#SAL15
#SAL16
#SAL17
#SAL18
#SAL19
#SAL20
#SAL21
#SAL22
#SAL24
#SAL25
#SAL26
#SAL27
#SAL28
#SAL29
#SAL30
#HP01
#HP03
#HP04
#HP06
#HP07
#HP08
#HP10
#HP11
#HP12
#HP13
#HP14
#HP15
#HP16
#HP17
#HP18
#HP19
#HP20
#HP21

Anexo 9: ALINEACION 350 pb del D-Loop

Haplotipos presentes en el segmento de 350 pb, localizado en la posición 208 a la 557 dentro del D-Loop de ADNmt. 30 haplotipos de ovejas neozelandesas con haplogrupo B, 130 haplotipos de 7 razas Churras portuguesas y 18 haplotipos de ovejas criollas mexicanas.

```

!Domain=Data;
[
      1111112 2333345556 6777788889 9990000011 1222333344 5555666677 8888999900 1111112233 ]
[
      2578567892 8067976895 8234913571 2343456734 5013124914 0579138909 0124017978 0135780613 ]
#TU01  ACGAAGTATA TTTTAAATA TGCAATCTCA GTAATACATA TATATAATAC AACCTCGTAA TATGATTATA ATATACTAAC
#AL01  ..... T... ..C.... ..C.....
#AL02  ..A..... ..T..... ..C.... ..C.....
#ES    ..G..... ..C.... A...T... ..T..... ..G.....
#KA01  ..... ..C.... ..T.... ..T..... ..C....
#NZ01  ..... ..CT... ..T.... ..T.....
#NZ02  ..... ..T.C... ..T.... ..T.....
#NZ03  ...GA... ..C.... ..T.... ..T.....
#NZ04  ..... ..C.... ..T.... ..T.....
#NZ05  ..... ..C.... ..T.... ..T.....
#NZ06  ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..G.... ..G....
#NZ07  ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..C.....
#NZ08  ..... ..C.... ..T.... ..T.... ..G.... ..G....
#NZ09  ..A..... ..G.... ..C.... ..T....
#NZ10  ...A... ..C.... ..T.... ..G.... ..G....
#NZ12  ..... ..C.... ..T.... ..G....
#NZ13  ..... ..C...G ..G.... ..T.... ..G.... ..C....
#NZ14  ...A... ..C.... ..T.... ..C...T ..C....
#NZ15  ..... ..C.... ..T....
#NZ16  ..... ..C.... ..T....
#NZ17  ..... ..C.... ..T....
#NZ19  ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..G.... ..C....
#NZ20  ..... ..C.... ..C.C.T ..C....
#NZ21  ..A..... ..G.... ..C.... ..T.... ..G.... ..A.... ..C.... ..C....
#NZ22  ..... ..C.... ..C.... ..A.... ..T.... ..C.... ..T.... ..C.... ..C....
#NZ23  ..... ..G.... ..C.... ..A.... ..T.... ..C.... ..T.... ..A.... ..C....
#NZ24  -..... ..C.... ..T.... ..C.... ..T.... ..C....
#SI    ..A..... ..C.... ..T.... ..C.... ..T.... ..C....
#TU02  ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T....
#TU03  ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..T.... ..C....
#ALG01 ..A... C... ..C.G.C... ..A... ..C.T... ..G.... ..A.... ..C.... ..CG...
#ALG02 ..... ..C.... ..C.... ..C.T... ..T.... ..T.... ..G.... ..C....
#ALG03 ..... ..C.... ..C.... ..C.T... ..T.... ..T.... ..G....
#ALG04 ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..T.... ..C....
#ALG05 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..C....
#ALG06 -..... ..C.... ..C.... ..T.... ..C....
#ALG07 ..... ..G.... ..C.... ..C.... ..T.... ..C.... ..C....
#ALG08 ..... ..C.... ..G.... ..A.... ..C.... ..T.... ..G.T... ..C....
#ALG09 ..... ..C.... ..C.... ..A.... ..T.... ..C.... ..T.... ..A....
#ALG10 ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..C....
#ALG11 ..... ..G.... ..C.... ..T.... ..T.... ..G.T... ..G....
#ALG12 ..... ..C.... ..C.... ..C.... ..TG... ..T.... ..T.... ..C.... ..G.... ..G....
#ALG13 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..G.... ..T.... ..A.... ..C....
#ALG14 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T.... ..AC...
#ALG15 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T.... ..C....
#ALG16 ..... ..C.... ..T.... ..TG... ..T....
#ALG17 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T.... ..C....
#ALG18 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T....
#ALG19 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T....
#ALG20 ..... ..T.... ..T.... ..T.... ..A.... ..G....
#ALG21 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T.... ..T.... ..C....
#ALG31 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T....
#BAD01 ..A... ..C.C... ..G.C.... ..A.... ..T.... ..C.... ..T.... ..G.... ..A.... ..C.... ..G....
#BAD02 ..G.... ..C.... ..C.... ..T.... ..T.... ..C....
#BAD03 ..... ..C.... ..C.... ..C.T... ..T.... ..T.... ..G....
#BAD04 ..... ..C.... ..C.... ..T.... ..T.... ..T.... ..C....

```

```

#BAD05 .....C.....T.....T.....
#BAD06 .....C.....T.....T.....C.....
#BAD07 .....G.....G.....C.....C.....T.....T.....G.....
#BAD08 .....G.....G.....C.....T.....G.....T.....G.....
#BAD09 .....G.....C.....A.....GT.....T.....A.....G.....C.....
#BAD10 .....C.....C.....A.....T.....T.....A.....
#BAD11 .....C.....C.....C.....C.....T.....C.....A.....
#BAD12 .....C.....C.....T.....C.....
#BAD14 .....C.....C.....T.....C.....
#BAD15 .....C.....C.....T.....G.....T.....C.....
#BAD16 .....C.....C.....T.....T.....A.....
#BAD17 .....C.....T.....T.....C.....C.....
#BAD18 .....C.....T.....T.....
#BAD19 .....C.....T.....T.....C.....
#BAD20 .....C.....T.....T.....
#BAD21 .....C.....T.....T.....
#BAD22 .....C.....T.....C.....
#CAM01 .....C.....T.....T.....G.....
#CAM02 .....C.....T.....
#CAM03 .....C.....T.....T.....T.....C.....
#CAM04 .....C.....C.....T.....C.....
#CAM05 .....A.....C.....C.....T.....T.....C.....
#CAM06 .....A.....G.....C.....T.....G.....T.....C.....
#CAM07 .....A.....C.....T.....G.....T.....G.....
#CAM08 .....C.....C.....C.....T.....T.....A.....G.....G.....
#CAM09 .....C.....C.....T.....GT.....
#CAM10 .....C.....C.....T.....C.....
#CAM11 .....C.....C.....T.....C.....C.....
#CAM12 .....C.....A.....T.....T.....GT.....
#CAM13 .....C.....A.....T.....T.....T.....C.....
#CAM14 .....C.....T.....C.....T.....
#CAM15 .....C.....T.....T.....T.....A.....
#CAM16 .....C.....T.....T.....
#CAM17 .....C.....T.....T.....
#CAM18 .....C.....T.....T.....T.....T.....
#MER01 .....G.....C.....T.....T.....
#MER02 .....G.....C.....T.....C.....C.....C.....
#MER04 .....C.....C.....T.....C.....
#MER05 .....C.....G.....C.....T.....T.....C.....
#MER06 .....C.....C.....T.....T.....T.....C.....
#MER07 .....C.....C.....T.....T.....C.....
#MER08 .....C.....C.....T.....T.....G.....G.....C.....
#MER09 .....C.....C.....T.....T.....
#MON01 .....AC.....C.....G.....C.....A.....T.....G.....A.....CG.....
#MON02 .....C.....C.....A.....T.....G.....T.....G.....
#MON03 .....G.....G.....C.....T.....G.....T.....G.....
#MON04 .....C.....C.....C.....T.....T.....C.....C.....
#MON05 .....C.....C.....T.....G.....T.....
#MON06 .....G.....C.....C.....G.....T.....T.....
#MON07 .....G.....C.....C.....T.....T.....C.....
#MON08 .....G.....C.....C.....A.....T.....T.....A.....C.....
#MON09 .....G.....G.....C.....C.....T.....G.....
#MON10 .....C.....C.....T.....T.....T.....C.....
#MON11 .....C.....C.....T.....T.....
#MON12 .....C.....C.....T.....T.....C.....
#QUE01 .....A.....C.....C.....G.....C.....A.....C.....T.....G.....A.....C.....CG.....
#QUE02 .....C.....C.....T.....T.....C.....
#QUE03 .....C.....C.....T.....T.....C.....G.....
#QUE04 .....C.....C.....T.....T.....
#QUE06 .....C.....C.....C.....T.....T.....A.....
#QUE07 .....C.....C.....T.....T.....
#QUE08 .....A.....C.....C.....T.....G.....T.....G.....
#QUE09 .....G.....G.....C.....C.....T.....G.....T.....C.....
#QUE10 .....G.....C.....C.....C.....T.....G.....T.....C.....C.....G.....
#QUE11 .....G.....C.....C.....T.....T.....G.....
#QUE12 .....G.....C.....C.....T.....T.....C.....G.....C.....
#QUE13 .....G.....C.....C.....T.....T.....C.....
#QUE14 .....C.....A.....C.....T.....T.....C.....C.....
#QUE15 .....G.....A.....C.....A.....T.....T.....
#QUE16 .....C.....AC.....T.....C.....T.....C.....
#QUE17 .....C.....G.....T.....T.....T.....G.....C.....C.....T.....
#QUE18 .....C.....G.....T.....T.....T.....G.....C.....C.....T.....
#QUE19 .....C.....C.....T.....T.....C.....C.....
#QUE21 .....C.....C.....T.....T.....C.....C.....
#QUE22 .....C.....C.....T.....T.....C.....
#QUE23 .....C.....C.....T.....T.....
#SAL01 .....A.....C.....G.....C.....A.....T.....G.....A.....CG.....

```

```

#SAL02 .....G.. ...C..... C....C.... .....T.C. ....T .....C... .....G.....
#SAL03 -----GC- ----- AC...T... .....A... .....C...
#SAL04 .....C.... .....T... .....T .....G.....
#SAL06 .....A... .....C.... .....T... .....T .....C.C... .....
#SAL07 .....C.... .....T... .....G... .....G.....C...
#SAL08 .....C.... A...T... .....T .....
#SAL09 .....C....C.... .....T... .....
#SAL10 .T..... .....CT... .....T... .....
#SAL11 .....C.... .....C....C.... .C...T... .....
#SAL12 .....C.... .....C....C.... .C...T... .....T .....
#SAL13 .....G.... .....C....C.... .....T... .....T .....
#SAL14 .....G.... .....C.... A...GT... .....T .....A...G... .....T...
#SAL15 .....G.... .....C.... A...T... .....T .....A...
#SAL16 .....G.... .....C....C.... .C...T... .....T .....C... .....
#SAL17 .....G.... .....C.... .....T... .....T .....C... .....G...
#SAL18 .....G.... .....C.... .....T... .....T .....
#SAL19 .....C....C.... .....T... .....T .....T... .....
#SAL20 .....C.... .....C.... .....T... .....T .....C... .....
#SAL21 .....C.... .....C.... A...T... .....T .....TA... .....
#SAL22 .....C.... A...T... .....T .....A... .....
#SAL24 .....C.... .....G.....C...
#SAL25 .....C.... .....T... C.....
#SAL26 .....C.... .....T... .....T .....
#SAL27 .....C.... .....T... .....T .....
#SAL28 .....C.... .....T... .....T .....
#SAL29 .....C.... .....T... .....T .....
#SAL30 .....C.... .....T... .....G.....C...
#HP01 .....C....CT... .....T... .....T .....
#HP03 .....C....CT... .....T... .....T .....
#HP04 G.....C....CT... .....T... .....T .....
#HP06 .....C....CT... .....T... .....T .....
#HP07 .....C....CT... .....T... .....T .....G...
#HP08 .....C....CT... .....T... .....T .....G...C...
#HP10 .....C....CT... .....T...G...T .....
#HP11 .....C....CT... .....T... .....T .....T
#HP12 .....C....CT... .....T... .....T .....
#HP13 .....C....C....CT... .....T... .....T .....
#HP14 .....C....CT... .....T... .....T .....C...
#HP15 .....C....CT... .....T... .....T .....
#HP16 .....C....CT... .....T... .....
#HP17 .....C....C.... .....T... .....
#HP18 .....C....GCT... .....T... .....T .....
#HP19 .....C....GCT... .....T... .....C.T .....
#HP20 .....C.... .....T... .....T .....
#HP21 .....A... .....C.... .....T... .....T .....C...

```

```

[ 2222222222 2222222222 2222222223 3333333333 3333333333 333]
[ 3334444455 5556667778 8888999990 0011122222 2333344444 445]
[ 4593456846 7891672353 4679134672 5715901346 8045701456 786]
#TU01 ACCAGTATAT ATAAATATAT AATATACCCA TATCTGTTCC GATGAATTAA ACT
#AL01 .....G... ..C
#AL02 .....G... ..-
#ES .....T... .....G... ..-
#KA01 .....G... ..C
#NZ01 .....G... ..TC
#NZ02 .....G... ..TC
#NZ03 .....A...C.... .....C.... .....G... ..C
#NZ04 .....C.... .....C.... .....G... ..C
#NZ05 .....C.... .....G... ..G
#NZ06 .....G... ..C
#NZ07 .....T... .....G... ..C
#NZ08 .....G... ..C
#NZ09 .....G... ..C
#NZ10 .....T... .....G... ..TC
#NZ12 .....G... ..TC
#NZ13 .....G... ..C
#NZ14 .....G...C.T... .....G... ..C
#NZ15 .....T... .....G... ..C
#NZ16 .....G...T... .....G... ..C
#NZ17 .....G...T... .....G... ..TC
#NZ19 .....G... ..C
#NZ20 .....G... ..C
#NZ21 .....G... ..C
#NZ22 .....G... ..C
#NZ23 .....A... .....G... ..C
#NZ24 .....G... ..C
#SI .....G.C...T... .....G... ..C

```

#TU02G.....G.....T.....G....C
#TU03G.....C.....G.....
#ALG01 ...A...C.....G.G.CAC...C.G...C
#ALG02 ..T.....G.....T AGC...C...C
#ALG03 ..T.....G.....T AGC...C...C
#ALG04C.....G....C
#ALG05G.....C.....G....C
#ALG06G... ..C.....G....C
#ALG07C.C.....G....C
#ALG08C.G.....C.....G....C
#ALG09G...T.....G....C
#ALG10 ...A.....G...T.....G....C
#ALG11T.....T.....G....C
#ALG12G.....G.....G....C
#ALG13C.....G.....G.....G....C
#ALG14C.....C.....G....C
#ALG15G.....G.....G....C
#ALG16C.G.....C.....G....C
#ALG17T.....T.....G....C
#ALG18G...T... ..C.....G....C
#ALG19 ...A...C.....T.....G....C
#ALG20G.....G.....G....C
#ALG21C.....G.....G....C
#ALG31G.....G.....G....C
#BAD01 ...A.....G.G.CAC... ..A.GC.G...C
#BAD02G...T.....G.....G....C
#BAD03 ..T.....C.....G.....T AGC...C...C
#BAD04 ...A.....C.....G.....G....C
#BAD05C.....G.....G....C
#BAD06T.....G.....G....C
#BAD07G.....G.....G....C
#BAD08C...C.....G.....G....C
#BAD09C.....G.....G....C
#BAD10G.....G.....G....C
#BAD11C.....G.....C.....G....C
#BAD12G.....AC.....G.....G....C
#BAD14C.....G.....G....C
#BAD15G.....G.....G....C
#BAD16C.....G.....G....C
#BAD17 ...A.....G.....C.....G....C
#BAD18G.....G.....G....C
#BAD19C.....C.....G....C
#BAD20 ...A.....C.....G.....G....C
#BAD21C.....G.....G.....G....C
#BAD22 ..T.....T.....C.....G.....G....C
#CAM01G.....G.....G....C
#CAM02T... ..C.....G.....G....C
#CAM03G...T.....G.....G....C
#CAM04C.....G.....C.....G....C
#CAM05T.....G.....G....C
#CAM06T... ..C.....G.....G....C
#CAM07 ...C... ..G... ..G.....G.....G....C
#CAM08C... ..C.....G.....G....C
#CAM09GG.....G.....G....C
#CAM10G.....G.....G....C
#CAM11 ...A... ..C.....G.....G....C
#CAM12 ...A... ..G...T.....G.....G....C
#CAM13C... ..G.....C.....G....C
#CAM14G.....G.....G....C
#CAM15C... ..G.....G.....G....C
#CAM16G...T.....G.....G....C
#CAM17G...T.....GG.....G....C
#CAM18G...T.....G.....G....C
#MER01C.....G.....GG.....G....C
#MER02G.....G.....G....C
#MER04CG... ..C.....G.....G....C
#MER05G.....G.....G....C
#MER06G.....G.....G....C
#MER07G.....A.....G.....G....C
#MER08G... ..C.....G.....G....C
#MER09 ...A... ..GG...T.....G.....G....C
#MON01 ...A.....G.G.CAC... ..C.G...C
#MON02C.....G.....G....C
#MON03 ...G.....G.....GC.....G....C
#MON04G...T.....G.....G....C
#MON05G.....G.....G....C
#MON06C.....G.....G....C

```

#MON07 ..... .G..... .G.... ..C
#MON08 ...A..... .G.... ..C
#MON09 ..... .A.... ..G.... ..C
#MON10 ..... .C... .G... T... ..A.... ..G...G ..C
#MON11 ..... .C...G.... ..C
#MON12 ..... .C...G.... ..C
#QUE01 ...A...C ..... .G...CAC... ..C.G. ..C
#QUE02 ..... .C..... .G.... ..C
#QUE03 ..... .G..... .G.... ..TC
#QUE04 ..... G..... .G.... ..C
#QUE06 ..... .G..... .G... T... ..G.... ..C
#QUE07 ..... .G... T... ..G.... ..C
#QUE08 ..... .G... ..C... ..G.... ..C
#QUE09 ..... .G.... ..TC
#QUE10 ..... .G..... .G.... ..C
#QUE11 ..... .G..C.... ..A.... ..G.... ..C
#QUE12 ..... .G.... ..C
#QUE13 ..... .G.... ..C
#QUE14 ..... .G.... ..TC
#QUE15 ...A..... .G... T... ..G.... ..C
#QUE16 .T..... .G.... ..C
#QUE17 G..G..... .G.... ..C
#QUE18 G..G..... .G.... ..C
#QUE19 ..T..... .G... T... ..G.... ..C
#QUE21 ..... .C... .G... T... ..G.... ..C
#QUE22 ..... .C.... ..C...G.... ..C
#QUE23 ..... .T... ..G.... ..
#SAL01 ...A..... .G...CAC... ..A.GC.G. ..C
#SAL02 ..... .G..... .G.... ..C
#SAL03 ...A..... .G...CAC... ..A.GC.G. ..C
#SAL04 ..... G..... .G... T... ..A.... ..G.... ..C
#SAL06 ..... .C...G.... ..C
#SAL07 ..... .G..... .G.... ..C
#SAL08 ..... .G... T... ..G.... ..C
#SAL09 ..... .G... T... ..A.... ..G.... ..C
#SAL ..... .T... ..GC... ..TC
#SAL11 ..... .G.... ..C
#SAL12 ..... .G... T... ..G.... ..C
#SAL13 ..... .G.... ..G.C
#SAL14 ..... .C... .G..... .G.... ..C
#SAL15 ..... .G.... ..C
#SAL16 ..... .G..... .G.... ..C
#SAL17 ...A..... .G.... ..C
#SAL18 ..... .AC... ..G.... ..C
#SAL19 ..... .C... .G... T... ..G.... ..C
#SAL20 ..... .GC... ..
#SAL21 ...A..... .T... ..G.... ..C
#SAL22 ..... .C..... .G.... ..C
#SAL24 ..... .C... .G..... .G.... ..C
#SAL25 ..... .C.... ..C...G.... ..
#SAL26 ..... .C... .G..... .A.... ..G.... ..C
#SAL27 ..... .C..... .G.... ..C
#SAL28 ..... .C..... .G.... ..C
#SAL29 ..... .G... T... ..C... ..G.... ..C
#SAL30 ..... .C... .G..... .G.... ..C
#HP01 ..... .G..... .G.... ..TC
#HP03 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP04 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP06 ..... .C..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP07 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP08 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP10 ..... .G... T... ..G.... ..C
#HP11 ..... .C..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP12 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP13 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP14 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP15 ..... .G... T... ..G.... ..C
#HP16 ..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP17 ...A..... .G... T... ..G.... ..TC
#HP18 ..... .G... T... ..G.... ..T.
#HP19 ..... .G... T... ..C.... ..G.... ..T.
#HP20 ..... .G..... .G.... ..TC
#HP21 ...A..... .C..... .G... T... ..G.... ..C

```


Anexo 10: Alineacion de 350 pb de 211 haplotipos.

Haplotipos presentes en el segmento de 350 pb, localizado en la posición 208 a la557 dentro del D-Loop de ADNmt de 30 ovejas neozelandesas, 130 ovejas de 7 razas Churras portuguesas, 18 ovejas criollas mexicanas y 33 ovejas de raza Churra española.

	111111	2233334555	566777788	8899990000	1111	1111111111	1111111111	1111111111	1222222222
	2578056789	2806797268	9582347913	5712343456	7345013124	9140579138	9090124017	9780135780	
#TU01	ACGATAGTAT	ATTTTACAA	TATGCATATC	TCAGTAATAC	ATATATATAA	TACAACCTCG	TAATATGATT	ATAATATACT	
#AL01TC..C..	
#AL02	..A.....TC..C..	
#ES	..G.....C.	..A...TT.....G.....	
#KA01C.TT.....C	
#NZ01CTTT..	
#NZ02T..C.TT..	
#NZ03GA..C.TT.....	
#NZ04C.TT.....	
#NZ05C.TT.....	
#NZ06G..C.TG..	..T.....	G.....	
#NZ07G..C.TC..	
#NZ08C.TT.....	..G...G..	
#NZ09	..A.....G..C.T	
#NZ10A..C.TG..	G.....	
#NZ12C.TG..C	
#NZ13C.	..G..G..T.....	..G..C..C	
#NZ14A..C.TC..	..T.....C.....	
#NZ15C.TC	
#NZ16C.TC	
#NZ17C.TC	
#NZ19G..G..C.TG..	C.....	
#NZ20C.C..C.TC..	
#NZ21	..A.....G..	..C.....TG..	A.....C.C	
#NZ22C.....C.	..A...T	..C.....	..T.....	..C..C..	
#NZ23G..C.	..A...T	..C.....	..T.....	A.....C.	
#NZ24	..-.....C.T	..C.....	..T.....C.	
#SIA..C.TC..	..T.....C.....	
#TU02C..C.TT.....	
#TU03G..C.TT.....C	
#ALG01A..	..C.....	..C..G..C.	..A...C.TG...A	..C.....C	
#ALG02C..	..C.....	..T.....TT..G...C	
#ALG03C..C..	..T.....TT..G.....	
#ALG04G..C.TT.....C	
#ALG05C..TC	
#ALG06	..-.....C.....TC	
#ALG07G..C..TC..C	
#ALG08C...G..	..A...C.TG..	..T.....	C.....	
#ALG09C..C..	..A...TT.....	A.....	
#ALG10G..C..TC..	
#ALG11G..C..TC..	..T.....G.....	
#ALG12C.....	..C...T	G.....	..T.....C.....	G.....	
#ALG13C.....TG..	..T.....	A.....C	
#ALG14C.....T	A..C.....	
#ALG15C.....TC..	
#ALG16C..T	G.....	..T.....	
#ALG17C..TT.....C	
#ALG18C..TT.....	
#ALG19C..T	
#ALG20TT.....	A.....G.....	
#ALG21C..C...TT...T..C..	
#ALG31C..C...T	
#BAD01A..	..C..C..G..C.	..A...T	..C.....	..TG...AC..	
#BAD02G..C..TC	
#BAD03C..C..	..T.....TT..G.....	

#BAD04TT.....C
#BAD05TT.....
#BAD06CG...TT.....C.....
#BAD07G.....G.....C.....C...TT.....G.....
#BAD08G.....G.....C.....TG.....T.....G.....
#BAD09G.....C.....C.....A...GTT.....A...G.....C
#BAD10C.....C.....A...TT.....A.....
#BAD11C.....C.....C...C.TC.....A.....
#BAD12C.....C.....TC.....
#BAD14C.....C.....TC.....
#BAD15C.....C.....C...TG...T.....C.....
#BAD16C.....TT.....A.....
#BAD17C.....TT.....C.....C
#BAD18C.....TT.....
#BAD19C.....TT.....C
#BAD20C.....TT.....
#BAD21C.....TT.....
#BAD22C.....TC.....
#CAM01C.....TT.....G.....
#CAM02C.....C.....TC.....
#CAM03C.....TT...T.....C.....
#CAM04C.....C.....C.....TC.....
#CAM05 ..A.....C.....C.....C...TT.....C.....
#CAM06 ..A.....G.....C.....C.....TG...T.....C.....
#CAM07A.....C.....C.....TG...T.....G.....
#CAM08C.....C.....C...TT.....A.....G..G.....
#CAM09C.....C.....TGT.....
#CAM10C.....C.....TC.....
#CAM11C.....C.....TC.....C
#CAM12C.....A...TT.GT.....
#CAM13G...C.....C.....A...TT...T.....C
#CAM14C.....C.....TC.T.....
#CAM15C.....TT...T.....A.....
#CAM16C.....TT.....
#CAM17C.....TT.....
#CAM18C.....TT.....
#MER01G.....C.....TT.....
#MER02G.....C.....C.....TC.....C.....C
#MER04C.....C.....C.....TC.....C
#MER05C.....G.....C.....C...TT.....C.....
#MER06C.....C.....C...TT...T.....C
#MER07C.....C.....TT.....C.....
#MER08C.....C.....TT.....G..G..C
#MER09C.....TT.....
#MON01AC.....C.....G..C.....A...TG...A.....C
#MON02C.....C.....A...T ..G...T.....G.....
#MON03G.....G.....C.....C.....TG...T.....G.....
#MON04C.....C.....C.TT...C...C.....
#MON05C.....C.....C...T ..G...T.....
#MON06G.....C.....G...TT.....
#MON07G.....C.....C.....TT.....C
#MON08G...C.....C.....C.....A...TT.....A.....C
#MON09G.....G.....C.....C...TT.....G.....
#MON10C.....C.....TT...T.....C
#MON11C.....C.....TT.....
#MON12C.....C.....TT.....C.....
#QUE01A...C.....C..G..C.....A...C.TG...A...C.....C
#QUE02C.....C.....TT.....C.....C
#QUE03C.....C.....TT.....C.....G..
#QUE04C.....C.....TC.....
#QUE06C.....C...TT.....A.....
#QUE07C.....C.....TT.....
#QUE08 ..A.....C.....C.....TG...T.....G.....
#QUE09G.....G.....C.....C...TG...C.....C
#QUE10G.....C.....C.....G...TC...C...G.....
#QUE11G.....C.....C.....TT.....
#QUE12G.....C.....C.....TC.....G...C
#QUE13G.....C.....C.....TC.....C
#QUE14C.....A...C.....TC.....C
#QUE15G.....C.....A...TT.....
#QUE16C.....AC...T ..C.....T...T.....C
#QUE17C.....G...TT.....G.....C..C
#QUE18C.....G...TT.....G.....C
#QUE19C.....C...TT.....C.....
#QUE21C.....C.....TT.....C...C
#QUE22C.....C.....TC.....C
#QUE23C.....C.....TC.....C

```

#SAL01 .....A... ..C..G..C. ...A...T ..... ..G....A .....C
#SAL02 .....G. ....C.....C.....C. ....T.C..... ..T.....C.....G.....C
#SAL03 -----G C----- ..AC...T ..... ..A.....C.....C
#SAL04 .....A... ..C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL06 .....A... ..C.....C.....T ..... ..T..... ..C..C.....C
#SAL07 .....C.....C.....T .....G..... ..G.....C
#SAL08 .....C.....A...T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL09 .....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL   .T..... ..CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL11 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL12 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL13 .....G.....C.....C.....T ..... ..T..... ..T.....C
#SAL14 .....G.....C.....A...GT ..... ..T.....A...G.....C
#SAL15 .....G.....C.....A...T ..... ..T.....A.....C
#SAL16 .....G.....C.....C.....T ..... ..T.....C.....C
#SAL17 .....G.....C.....C.....T ..... ..T.....C.....G.....C
#SAL18 .....G.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL19 .....C.....C.....C.....T ..... ..T.....T.....C
#SAL20 .....C.....C.....C.....T ..... ..T.....C.....C
#SAL21 .....C.....A...T ..... ..T.....TA.....C
#SAL22 .....C.....A...T ..... ..T.....A.....C
#SAL24 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL25 .....C.....C.....C.....T ..C..... ..G.....C
#SAL26 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL27 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL28 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL29 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#SAL30 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP01 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP03 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP04 G.....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP06 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP07 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP08 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP10 .....C.....CT.....T ..G..... ..T..... ..G.....C
#HP11 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP12 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP13 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP14 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP15 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP16 .....C.....CT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP17 .....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP18 .....C.....GCT.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP19 .....C.....GCT.....T .....C.T..... ..G.....C
#HP20 .....A.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#HP21 .....A.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA01 .....G.....C.....GC.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA02 ..G.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA03 .....C.....C.....C.T.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA04 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA05 .....G.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA06 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA07 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA09 ..A.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA10 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA13 .....C.....C.....C.....T .....G..... ..G.....C
#CHURRA14 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA15 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA16 ..G.....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA17 .....T.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA18 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA19 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA21 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA22 .....C.....A...C.....T .....G..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA23 .....G.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA24 .....C.....A...C.....C.T.....G.....T..... ..G.....C
#CHURRA25 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA26 .....A.....C.....C.....AC.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA27 .....C.....C.....C.....A...T ..G..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA29 .....G.....C.....C.....G...T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA30 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA31 .....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA33 .....G.....C.....C.....A...T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA34 .....C.....G...C.....C.....C...T .....G..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA35 .....G.....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA36 .....G.....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C
#CHURRA37 .....C.....C.....C.....C.....T ..... ..T..... ..G.....C

```

#CHURRA38G.C.G...T
#CHURRA39C.TT.....C

2222222222 2222222222 2222222222 2222333333 3333333333 3333333333
2233333444 4455555666 7778888899 9999000111 1222222233 3344444445
1613459345 6846789167 2353467901 3467257135 9012346804 5701456786

#TU01 CAACACCAGT ATATATAAAT ATATAATATT ACCCATATTC TGTTCGGAT GAATTAAACT
#AL01G.....C
#AL02G.....-
#EST.....G.....-
#KA01G.....C
#NZ01G.....TC
#NZ02G.....TC
#NZ03A.....C.....C.....G.....C
#NZ04C.....G.....C
#NZ05C.....G.....G
#NZ06G.....C
#NZ07T.....G.....C
#NZ08G.....G.....C
#NZ09G.....G.....C
#NZ10T.....G.....TC
#NZ12G.....TC
#NZ13G.....G.....C
#NZ14G.....G.....C T.....G.....C
#NZ15T.....G.....C
#NZ16G.....T.....G.....C
#NZ17G.....T.....G.....TC
#NZ19G.....G.....C
#NZ20G.....G.....C
#NZ21G.....G.....C
#NZ22G.....G.....C
#NZ23A.....G.....C
#NZ24G.....G.....C
#SIG.....C T.....G.....C
#TU02G.....G.....T.....G.....C
#TU03G.....G.....C.....G.....
#ALG01 .G.....A.....C.....G.G.....CAC.....C.G.....C
#ALG02T.....G.....TAGC.....C.....C
#ALG03T.....G.....TAGC.....C.....C
#ALG04C.....G.....C
#ALG05G.....G.....C
#ALG06G.....C.....G.....C
#ALG07C.....C.....G.....C
#ALG08C.....G.....C
#ALG09G.....T.....G.....C
#ALG10A.....G.....T.....G.....C
#ALG11T.....T.....G.....C
#ALG12 ..G.....G.....G.....G.....G.....C
#ALG13C.....G.....G.....G.....G.....C
#ALG14C.....C.....G.....C
#ALG15G.....G.....G.....C
#ALG16C.....G.....C
#ALG17T.....T.....G.....C
#ALG18G.....T.....C.....G.....C
#ALG19A.....C.....T.....G.....C
#ALG20G.....G.....G.....C
#ALG21C.....G.....C
#ALG31G.....A.....G.G.....CAC.....A.GC.G.....C
#BAD01 .G.....A.....G.....T.....G.....TAGC.....C.....C
#BAD02G.....T.....G.....G.....G.....C
#BAD03T.....C.....G.....TAGC.....C.....C
#BAD04A.....C.....C.....G.....C
#BAD05G.....C.....G.....C
#BAD06T.....G.....G.....C
#BAD07G.....TC
#BAD08C.....C.....GC.....C
#BAD09C.....G.....C
#BAD10G.....G.....G.....C
#BAD11C.....G.....C
#BAD12G.....AC.....G.....C
#BAD14C.....G.....C
#BAD15G.....G.....C
#BAD16C.....G.....TC
#BAD17A.....G.....C.....G.....C
#BAD18G.....G.....C
#BAD19C.....C.....G.....C
#BAD20A.....C.....G.....C

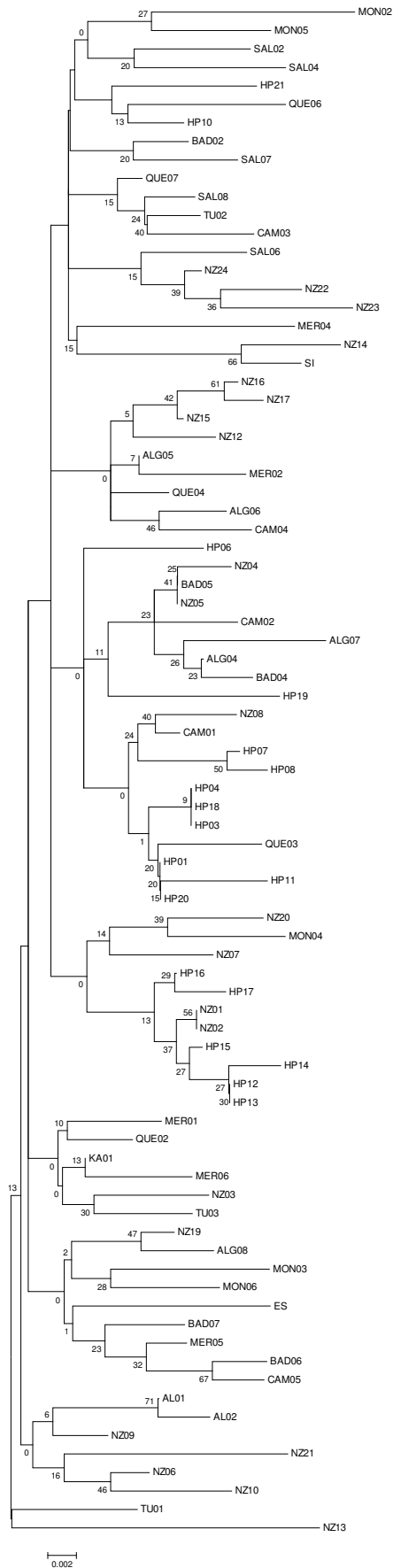
#BAD21C.....TC
#BAD22T.....TC.....C.....G.....C
#CAM01T.....C.....G.....C
#CAM02T.....C.....G.....C
#CAM03G.....T.....G.....C
#CAM04C.....C.....G.....C
#CAM05T.....G.....C
#CAM06T.....C.....G.....C
#CAM07C.....G.....G.....G.....C
#CAM08C.....C.....G.....C
#CAM09G.....G.....C
#CAM10G.....C
#CAM11A.....C.....G.....C
#CAM12A.....G.....T.....G.....C
#CAM13C.....G.....C.....G.....C
#CAM14G.....C
#CAM15C.....G.....G.....C
#CAM16G.....T.....G.....C
#CAM17G.....T.....GG.....C
#CAM18T.....G.....T.....G.....C
#MER01C.....G.....GG.....C
#MER02G.....C
#MER04C.....G.....C.....G.....C
#MER05G.....TC
#MER06G.....C
#MER07A.....G.....C
#MER08G.....C.....G.....C
#MER09A.....GG.....T.....G.....C
#MON01 .G.....A.....C.....G.....G.....CAC.....C.G.....C
#MON02C.....G.....C
#MON03G.....GC.....C
#MON04G.....T.....G.....C
#MON05G.....C
#MON06C.....C
#MON07G.....G.....C
#MON08A.....G.....C
#MON09A.....G.....C
#MON10C.....G.....T.....A.....G.....C
#MON11C.....G.....C
#MON12C.....G.....C
#QUE01 .G.....A.....C.....G.....CAC.....C.G.....C
#QUE02C.....G.....C
#QUE03G.....G.....G.....TC
#QUE04G.....G.....C
#QUE06G.....G.....T.....G.....C
#QUE07T.....G.....C
#QUE08G.....T.....C.....G.....C
#QUE09G.....TC
#QUE10G.....G.....C
#QUE11G.....C.....A.....G.....C
#QUE12G.....C
#QUE13G.....C
#QUE14G.....TC
#QUE15A.....G.....T.....G.....C
#QUE16T.....G.....C
#QUE17 ..TG..G.....G.....C
#QUE18 ..TG..G.....G.....C
#QUE19T.....T.....G.....C
#QUE21C.....G.....T.....G.....C
#QUE22C.....C.....G.....C
#QUE23T.....G.....C
#SAL01 .G.....A.....G.....G.....CAC.....A.GC.G.....C
#SAL02G.....G.....G.....C
#SAL03A.....G.....G.....CAC.....A.GC.G.....C
#SAL04G.....G.....T.....A.....G.....C
#SAL06C.....G.....C
#SAL07G.....T.....G.....C
#SAL08G.....T.....G.....C
#SAL09G.....T.....A.....G.....C
#SALT.....GC.....TC
#SAL11G.....C
#SAL12G.....T.....G.....C
#SAL13G.....G.....C
#SAL14C.....G.....G.....C
#SAL15G.....C
#SAL16G.....C
#SAL17A.....G.....C

```

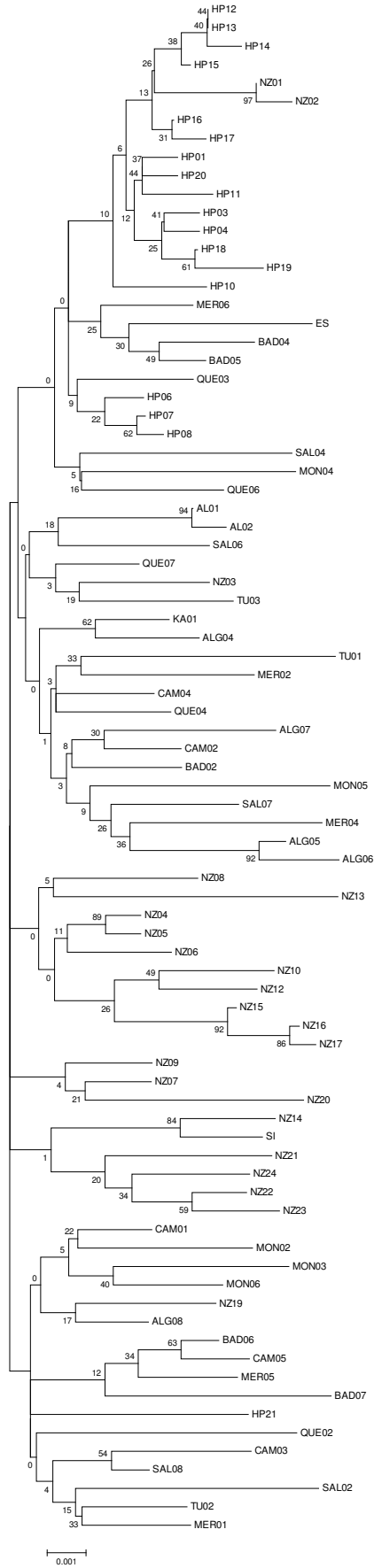
#SAL18 .....AC.....G.....C
#SAL19 .....C.G.....T.....G.....C
#SAL20 .....GC.....
#SAL21 .....A.....T.....G.....C
#SAL22 .....C.....G.....C
#SAL24 .....C.....G.....G.....C
#SAL25 .....C.....C.....G.....C
#SAL26 .....C.....G.....A.....G.....C
#SAL27 .....C.....G.....C
#SAL28 .....C.....G.....C
#SAL29 .....G.....T.....C.....G.....C
#SAL30 .....C.....G.....G.....C
#HP01 .....G.....TC
#HP03 .....G.....T.....G.....TC
#HP04 .....G.....T.....G.....TC
#HP06 .....C.....G.....T.....G.....TC
#HP07 .....G.....T.....G.....TC
#HP08 .....G.....T.....G.....TC
#HP10 .....G.....T.....G.....C
#HP11 ..T.....C.....G.....G.....TC
#HP12 .....G.....T.....G.....TC
#HP13 .....G.....T.....G.....TC
#HP14 .....G.....T.....G.....TC
#HP15 .....G.....T.....G.....C
#HP16 .....G.....T.....G.....TC
#HP17 .....A.....G.....T.....G.....TC
#HP18 .....G.....T.....G.....T.
#HP19 .....G.....T.....C.....G.....T.
#HP20 .....G.....T.....G.....TC
#HP21 .....A.....C.....G.....T.....G.....C
#CHURRA01 .....C.....GC.....
#CHURRA02 .....G.....T.
#CHURRA03 .....C.....GG.....C
#CHURRA04 .....C.....C.....G.....C
#CHURRA05 .....G.....T.....G.....C
#CHURRA06 .....C.....G.....C
#CHURRA07 .....T.....G.....TC
#CHURRA09 .....G.....C
#CHURRA10 .....C.G.....C.....G.....C
#CHURRA13 .....C.....G.....C
#CHURRA14 .....GC.....C
#CHURRA15 .....G.....G.....C
#CHURRA16 .....G.....T.....G.....C
#CHURRA17 .....C.....G.....C
#CHURRA18 .....C.....C.....G.....G.....C
#CHURRA19 .....T.....C
#CHURRA21 .....C.....TC
#CHURRA22 .....G.....C
#CHURRA23 .....C.....G.....C.....C.....G.....C
#CHURRA24 .....A.C.....G.....C
#CHURRA25 .....G.....T.....G.....C
#CHURRA26 ..T.....C.....G.....C
#CHURRA27 ..T.....C.....G.....C
#CHURRA29 .....G.....T.....G.....C
#CHURRA30 .....G.....C
#CHURRA31 .....T.....A.....G.....C
#CHURRA33 .....G.....A.....G.....C
#CHURRA34 .....G.....G.....C
#CHURRA35 ..T.....G.....C
#CHURRA36 T.....G.....G.....C
#CHURRA37 .....C.....G.....C
#CHURRA38 .....C.....C.....G.....C
#CHURRA39 .....C.....C.....G.....C

```

Anexo 11: 1000 replicas de la figura 3.4.1.



Anexo 12: 1000 replicas de la figura 3.4.2.



Anexo 13: 1000 replicas de la figura 3.5.1.

