



# **COLEGIO DE POSGRADUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS CÓRDOBA**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE.**

## **DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN ANCESTRAL DE OVINOS CRIOLLOS DE LA REGIÓN DE LAS ALTAS MONTAÑAS, VERACRUZ.**

**BIOL. RUTH GUADALUPE CASTILLO RODRIGUEZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**

**2021**

La presente tesis, titulada: DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN ANCESTRAL DE OVINOS CRIOLLOS DE LA REGIÓN DE LAS ALTAS MONTAÑAS, VERACRUZ, realizada por el alumno: Ruth Guadalupe Castillo Rodríguez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Salazar Ortiz.

CO-DIRECTORA:



\_\_\_\_\_  
Dra. Obdulia Lourdes Segura León.

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
Dr. Josafhat Salinas Cruz

ASESOR EXTERNO:



\_\_\_\_\_  
Dr. Ricardo Serna Lagunes

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, **2021**.

**DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DEL  
ORIGEN ANCESTRAL DE OVINOS CRIOLLOS DE LA REGIÓN DE LAS ALTAS  
MONTAÑAS, VERACRUZ.**

Ruth Guadalupe Castillo Rodríguez, M.C.

Colegio de Posgraduados, 2021.

En comunidades indígenas de la zona centro de Veracruz, se han establecido hatos de ovinos criollos que se han manejado con cruzamientos tradicionales, pero no se ha evaluado sus características genéticas para evaluar su estado de endogamia, y apoyar los programas de manejo para proteger el recurso genético. El objetivo del estudio fue caracterizar la diversidad genética de tres poblaciones de ovinos criollos manejados por comunidades indígenas de la region centro de Veracruz, México. Se ubicaron familias indígenas de productores de ovinos criollos y se recolectaron muestras de sangre de 90 individuos pertenecientes a los municipios de Tehuipango, Astacinga y Tlaquilpa, Veracruz. En laboratorio, se extrajo el ADN genómico y se caracterizó la diversidad genética por medio de cuatro microsatélites amplificados por PCR (ILSTS11, ILSTS5, SRCRSP9 y OarFCB128) y fueron visualizados y cuantificados en geles de poliacrilamida. Los cuatro microsatelites fueron polimórficos y superaron el 80% de la variación genética observa-da; la diversidad alelica fluctuó entre 12 y 20 alelos, con un rango del tamaño de alelos de 260 a 294 pb. La heterocigosidad observada superó a la esperada en cada microsatélite evaluado. Sin embargo, el grado de diferenciación genética ( $F_{ST} = 0.025$ ) revela que los ovinos evaluados, no se diferenciaron genéticamente, derivado de un alto coeficiente de endogamia (FIS), esto debido a que, según el análisis de varianza molecular, el 99% de la variación genética está alojada a nivel individual. Las tres poblaciones de ovinos criollos evaluadas presentan una diversidad genética que se conserva a través de la

consanguinidad, por lo que implementar un programa de reproducción para la protección y aprovechamiento de estos hatos por las comunidades indígenas, permitiría incrementar sus características fenotípicas como la cantidad de lana o el peso de la canal. Para poder determinar el origen ancestral de los ovisnos criollos se mando secuenciar a la región D-loop del ADN mitocondrial y se compararon con las bases de datos públicas de secuencias nucleotídicas utilizando el algoritmo BLAST. Con base a estos alineamientos se pudo reconocer un solo sitio variable, situado en la posición numero 794. Al no contar con más de un sitio variable dentro de las secuencias de ovinos criollos, no es posible continuar con el análisis filogenético, puesto que, los análisis de parsimonia, requieren ademas de sitios polimorficos, sitios informativos: caracteres que favorezcan la construccion del árbol filogenético. El objetivo de este trabajo es identificar la diversidad genética y el origen ancestral a través del análisis de la región D-loop del ADN mitocondrial de razas criollas de ovinos de la región de las Altas Montañas, Veracruz, específicamente en los municipios de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa con la finalidad de disminuir la perdida de diversidad genética y que en un futuro la información obtenida sirva como referencia para el diseño e implementación de programas de conservación y mejoramiento genético.

DETERMINATION OF THE GENETIC DIVERSITY AND IDENTIFICATION OF THE ANCESTRAL ORIGIN OF CREOLE SHEEP FROM THE REGION OF THE ALTAS MONTAÑAS, VERACRUZ.

Ruth Guadalupe Castillo Rodríguez, M.C.  
Colegio de Posgraduados, 2021.

The genetic diversity of three populations of Creole sheep managed by indigenous communities in the central zone of Veracruz, Mexico, is reported from blood samples of 90 sheep, which were sampled in the herds of indigenous families in the municipalities of Tehuipango, Astacinga and Tlaquilpa, Veracruz. Sheep genomic DNA was evaluated with four microsatellites amplified by PCR and visualized on polyacrylamide gels. The four microsatellites were polymorphic, the observed heterozygosity exceeded that expected, however, the inbreeding indices were negative due to inbreeding, which was consistent with the molecular analysis of variance, which shows 99% genetic homogeneity at the individual level. The sheep evaluated show a genetic diversity that is conserved through inbreeding crosses, so designing a plan for the protection and use of these sheep populations would allow their sustainable management.

## **DEDICATORIAS**

Esta tesis la dedico a Dios, que me regalo la vida y me otorgo una buena familia que supo inculcarme valores y que forjó la persona que soy ahora.

A mis padres, quienes me brindaron su apoyo en todo momento y creyeron en mí. Agradezco su amor y el haber sembrado en mí el deseo de superación. Por haberme sacado adelante, esto es en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada esta meta, puesto que, siempre estuvieron impulsándome. Estas pequeñas líneas no definen el entero agradecimiento que quisiera expresar por todo su apoyo y su comprensión, espero no defraudarlos y contar siempre con ustedes.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Colegio de Postgraduados (COLPOS) campus Córdoba, institución de enorme calidad, que me brindo todo el apoyo durante mi estancia en la maestría.

Agradezco a mi Asesor de Tesis, el Dr. Juan Salazar Ortiz, por haberme dado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también por la paciencia y todo el tiempo invertido durante la maestria.

De igual forma a la Dra. Obdulia Segura León mi CO-DIRECTORA de tesis y al Dr. Josafhat Salinas Cruz, que, como miembros del consejo, dedicaron tiempo durante mi formación y durante la elaboración y revisión de este trabajo con grandes aportaciones, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan. Agradezco de manera especial a la Dra. Obdulia por permitirme realizar la estancia de investigación bajo su supervisión en el laboratorio de Biología Molecular, del edificio de Fitosanidad en el Colegio de Postgraduados, campus Montecillo y brindarme además de su tiempo y conocimientos, las herramientas y materiales necesarios para llevar a cabo la investigación.

Al Dr. Amalio Santa-Cruz Varela por permitirme realizar parte de mi trabajo de investigación en el laboratorio 202 de marcadores moleculares, del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo.

A la Dra. Martha Hernández Rodríguez por la buena disposición que siempre tuvo conmigo, por su tiempo, amabilidad y enseñanzas en el área de los microsátélites; por toda su atención y el apoyo brindado durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

A los profesores del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba por transferir sus conocimientos a nuestras vidas, por ayudar a seguir formándonos como profesionistas a lo largo de estos dos años.

Al Ing. Jesús Sánchez Tzompaxtle, Ing. Armando Tehuintle Rodríguez y al Ing. Cesar de Fomento Agropecuario de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa, por haberme otorgado la confianza de realizar este trabajo de investigación con los borregos criollos pertenecientes a estas zonas. A los Ing. Rodolfo López y Marco Antonio Victoria Martínez, por su amistad y ayuda a lo largo de todos esos días de muestreo en campo, puesto que, sin su colaboración gran parte de este trabajo no hubiera sido posible.

A todos mis amigos, pero de una manera muy especial a: Alejandra Pacheco, José Alberto Vega, Jorge Castillo, Luis A. Tolentino (†), Lourdes Hernández, Iliá Hernández, Jesús Ruiz, Alexis Domínguez, Saúl Pardo, Isabel Salazar, Karen Ramírez y Edith Blanco, porque con ellos compartí muchas de las experiencias más bonitas de la maestría, compartí días, meses, años inolvidables que me dejaron el corazón lleno de alegría, nunca olviden que los quiero y que siempre contarán conmigo.

A todas las personas que se me olvidaron mencionar, pero que de una u otra manera estuvieron a mi lado durante toda esta etapa.

¡¡¡Gracias infinitas!!!

## CONTENIDO

CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL .....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2.- OBJETIVOS .....	5
1.2.1 OBJETIVO GENERAL .....	5
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
1.3.- HIPOTESIS.....	6
1.3 JUSTIFICACIÓN. ....	6
CAPITULO 2.- REVISION DE LITERATURA.....	8
2.1 Origen de las razas ovinas criollas.....	8
2.1.1. Características generales de los ovinos. ....	10
2.1.2 Ganadería ovina en México.....	11
2.1.3. Razas ovinas puras comunes. ....	13
2.1.3.1. Oveja Latxa ó Lacha. ....	13
2.1.3.2 Oveja Churra .....	14
2.1.3.3 Oveja Canaria .....	15
2.1.3.4 Oveja Manchega .....	16
2.1.3.5 Oveja castellana.....	18
2.1.3.6 Oveja criolla.....	19
2.2. Conceptos de diversidad genética, relaciones de parentesco: implicaciones de conservación. ....	20
2.2.1. Diversidad genética.....	20
2.2.1.1 Diversidad genética en ovinos.....	21
2.3. Técnicas para el análisis de diversidad genética en ovinos. ....	22
2.3.1. Marcadores moleculares. ....	23

2.3.1 Marcadores Microsatelites (SSRs ó STRs) .....	23
2.3.1.1 Amplificación de los microsatélites .....	25
2.3.1.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): técnica para amplificar microsatélites .....	25
2.3.2 Técnicas para la visualización de alelos derivados de microsatélites .....	26
2.4. Microsatélites para estudios de diversidad genética en ovinos .....	29
2.5. Índices de diversidad genética. ....	33
2.6 ADN mitocondrial. DNA mitocondrial en mamíferos .....	35
2.7. Estudios de diversidad genética y origen ancestral en ovinos. ....	36
2.8 LITERATURA CITADA.....	40
CAPITULO 3. ESTIMACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE OVINOS CRIOLLOS EN LA REGIÓN DE LAS ALTAS MONTAÑAS. ....	
3.1 INTRODUCCIÓN. ....	57
3. 2 MATERIALES Y MÉTODOS. ....	58
3.2.1 Poblacion muestral y muestreo: .....	58
3.2.2 Extracción de ADN y PCR.....	61
3.2.3 Electroforesis de los SSR.....	62
3.2.4 Análisis de la diversidad y estructura genética.....	63
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
3.3.1 Extraccion de ADN y PCR.....	63
3.3.2 Electroforesis de los SSR.....	64
3.3.3 Análisis de diversidad y estructura genética.....	64
3.4 CONCLUSIONES.....	81
3.5 LITERATURA CITADA.....	81

CAPITULO 4. ORIGEN ANCESTRAL DE OVINOS CRIOLLOS DE LA REGIÓN DE LAS ALTAS MONTAÑAS.....	85
4.1 INTRODUCCIÓN.....	85
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
4.2.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR de la región D-loop.....	87
4.2.2 Análisis estadísticos.....	89
4.2.2.1 Análisis y alineamiento de las secuencias.....	89
4.2.2.2 Elaboración de árboles filogenéticos.....	90
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.3.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR de la región D-loop.....	91
4.3.2 Analisis y alineamiento de secuencias.....	91
4.3.3 Elaboración de árboles filogenéticos.....	92
4.4 CONCLUSION.....	96
4.5 LITERAURA CITADA.....	97
ANEXOS.....	100
Anexo 1. Protocolo de extraccion de ADN Promega.....	100
Aislamiento de ADN genómico de sangre completa.....	100
Anexo 2. Haplotipos ovinos previamente reportados para el D-Loop mitocondrial.....	103

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1 Microsatélites ovinos recomendados por la FAO para análisis de diversidad genética (FAO, 2011).....	30
Cuadro 2 Microsatélites utilizados para describir la diversidad genética de Ovinos criollos de la Región de las Altas Montañas (FAO, 2011). ....	61
Cuadro 3 Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci en las poblaciones de Ovinos criollos.....	66
Cuadro 5 Estadísticos de diversidad genética de tres poblaciones de ovinos criollos de las Altas Montañas de Veracruz, México (n=90). ....	74
Cuadro 6 Estadísticos F de los loci examinados en poblaciones de ovinos criollos de Veracruz, México.....	75
Cuadro 7 Primers utilizados para la amplificación de la región D-loop (Lopez-Oceja, 2016).....	88

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1 Variedades de Ovino de la raza Lacha (Laxha), de lado izquierdo se muestra la variedad cara negra y de lado derecho la variedad cara rubia. ....	14
Figura 2 Morfología de la raza ovina Churra .....	15
Figura 3 Oveja de la raza canaria. ....	16
Figura 4 Variedades de la oveja manchega, de lado izquierdo se muestra la manchega blanca y de lado derecho la manchega negra. ....	17
Figura 5 Variedad castellana blanca y variedad castellana negra. ....	19
Figura 6 Ubicación de los puntos de muestreo en los municipios de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa. ....	59
Figura 7 Toma de muestras de sangre en ovinos criollos de la Región de las Altas Montañas. ....	60
Figura 8 Ovinos criollos muestreados en la región de las altas montañas: A) Ovino criollo negro, B) Ovino criollo negro/blanco/café, C) Ovino criollo blanco, D) Ovino criollo gris, E) Ovino criollo café/ cara negra, F) Ovino criollo negro/ blanco/ café, G) Ovino criollo café y H) Ovino criollo blanco/gris/negro. ....	60
Figura 9 Ejemplo de alelos observados . ....	
Figura 10 Frecuencias alélicas del locus ILSTS11 dentro de las 3 poblaciones. ....	70
Figura 11 Frecuencias alélicas del locus ILSTS5 dentro de las 3 poblaciones. ....	70
Figura 12 Frecuencias alélicas del locus SRCRSP9 dentro de las 3 poblaciones. ...	71
Figura 13 Frecuencias alélicas del locus OasFCB128 dentro de las 3 poblaciones. ....	71
Figura 14 Las distancias genéticas estándar de Nei entre las 3 poblaciones de ovinos criollos. ....	79
Figura 15 Partición de la diversidad genética entre individuos, dentro de individuos y entre poblaciones de Ovinos criollos mediante microsatélites .....	80

Figura 16 Analisis y edición de secuencias en Sequencher software. ....	93
Figura 17 Alineamiento de secuencias en MEGA. ....	93
Figura 18 Sitios conservados en las secuencias de Ovinos criollos. ....	94
Figura 19 Sitios variables observados en las secuencias de Ovinos Criollos. ....	94
Figura 20 Sitios parsimoniosos observados en las secuencias de Ovinos Criollos. ....	94
Figura 21 Sitios singleton observados en las secuencias de Ovinos criollos. ....	95
Figura 22 Modificaciones en el marco de lectura de las secuencias de Ovinos criollos. ....	95

## CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL

### 1.1 Planteamiento del problema

En México, la ganadería comenzó con la introducción del ganado bovino por parte de los españoles durante el periodo de la conquista. Desde esos años, la ganadería ha sufrido cambios paralelos a los de acontecimientos de orden social, económico y cultural (Saucedo, 1987). Durante este periodo, los ovinos también fueron introducidos en México; se tiene conocimiento de que dentro de las razas introducidas, destacan la Raza Manchega, Lacha, Churra, Merino Española, Castellana y Aragonesa. A los ovinos descendientes de estas razas, se les define como “ovinos criollos” (Gayosso-Vázquez y Morales 2009).

Nuestro país cuenta con diversos sistemas de producción ovina que se adaptan a las características de cada región y a la disponibilidad de recursos, dentro de estos sistemas de producción se encuentran introducidas las razas ovinas criollas (Partida *et al.*, 2013). La ganadería ovina se encuentra dirigida principalmente a la producción de carne, leche para elaboración de quesos, lana y estiércol (Pablo 2017). Este tipo de ganadería se practica en todos los estados de la república y se realiza mediante pastoreo extensivo (Hernández, 2002). Dentro de la cual, se manejan principalmente los sistemas productivos tradicionales, con bajos niveles productivos y tecnológicos, a pesar de esto, se le considera como una actividad con gran interés socioeconómico para los productores (Vélez *et al.*, 2016).

En el estado de Veracruz la producción de ovinos se distribuye en distritos. En la zona sur se concentra el inventario más grande de ovinos ya que cuenta con más de 190,000 que representan un 39% del inventario estatal, seguido de esto se encuentra la zona centro con un aproximado de 158,000 ovinos que representan un 33% y en

tercer lugar se encuentra la zona norte del estado con más de 130,000 ovinos que representan un 28% de la producción (SAGARPA, 2009).

De este total, un 42% de los ovinos se manejan en sistemas de producción de subsistencia, 21% en sistemas de transición de subsistencia a empresarial, y el 37% restante en sistemas empresariales. Un 14% de las razas que se utilizan dentro del sistema de producción ovina de subsistencia son razas puras y cruzas con Pelibuey, Black Belly y Dorper, sin embargo, las razas que predominan son las razas criollas. En el sistema de transición el 85% utilizan razas productoras de carne como Dorper, Suffolk, cruzas con Pelibuey y Black Belly, y en menor proporción utilizan razas criollas. En el sector empresarial el 95% utilizan razas especializadas como Dorper, Suffolk, Kathadin, Ile de France, Charolais y sus cruzas con Pelibuey y Black Belly, y sólo 5% utilizan ovinos criollos (Pérez-Hernández 2010).

Diversos programas gubernamentales iniciaron con la introducción de razas modernas de origen europeo (principalmente inglesas "Suffolk y Hampshire" y francesas "Rambouillet") y de razas sintéticas (como Dorper y Katadhin). La introducción de estas razas ha sido en la mayoría de los casos por medio de machos, sin seguir un sistema definido de cruzas, quedando animales con una composición genética diversa y en otros casos la composición multirracial no está definida (Gayosso-Vázquez y Morales, 2009).

La producción de razas mejoradas de los países desarrollados en comparación con las razas nativas de los países en desarrollo ha conducido al incremento de la importación de razas modificadas. Sea la importación y cruzamiento con razas criollas planeada o no, el resultado es la pérdida de material genético criollo antes de que su potencial real sea conocido (Segura y Montes, 2001).

Los estudios de diversidad genética son primordiales para optimizar estrategias de conservación de los recursos zoogenéticos, así como para implementar medidas de uso, en programas de mejora genética y establecer estrategias para la conservación de una determinada especie, estas estrategias se basan en comprender la situación actual de estos, a través de la identificación, descripción cuantitativa y cualitativa, y caracterización genética molecular (FAO, 2010).

Existen varias técnicas moleculares que permiten conocer la proporción y variación de genes en las poblaciones naturales de manera directa a partir de regiones flanco del ADN. Una de las herramientas más utilizadas para determinar la diversidad genética es por medio de la utilización de marcadores moleculares. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci (alelos o genes) únicos o múltiples (locus) y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997; Renteria 2007).

Las secuencias cortas repetidas, Simple Sequence Repeats (SSR), Short Tandem Repeats (STR) o mejor conocidos como microsatélites son abundantes en el genoma eucariota, están constituidas por unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Cada secuencia SSR se define por el tipo de unidad repetida y por su posición que ocupan en el genoma (locus), cuya frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies (González, 2003).

Los microsatélites pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos), los mononucleótidos y dinucleótidos son más abundantes y tienen una tasa de mutación mayor que los demás, por lo que son

apropiados para detectar diferencias entre individuos de una misma población (Schlötterer, 2000; Vázquez y García-Morales, 2014).

Es de gran importancia estudiar el linaje materno para conocer sobre la evolución, la filogenia y la diversidad genética dentro y entre diferentes razas de ganado. En particular el conocimiento de la diversidad genética y la relación entre los animales domésticos es trascendental para generar estrategias sostenibles y planes de conservación que evalúen la diversidad genética dentro y entre las razas (Bravo, 2019).

El ADNmt es el más utilizado en la realización de estudios de filogenia y filogeografía. La Filogenia estudia las relaciones de afinidad y parentesco de los seres vivos, y trata de explicar, las relaciones de ancestro descendiente que permitan señalar, el origen y la historia evolutiva de los taxones (Tinaut y Ruano, 2002). Además, el análisis de las variantes de una población o polimorfismo, brinda un diagnóstico del estado actual de la diversidad genética de la población o poblaciones estudiadas (Serna-Lagunes *et al.*, 2015).

Existe un alto grado de polimorfismo (si se habla de población) en la secuencia del ADNmt entre poblaciones separadas geográficamente. Muchos de estos cambios son selectivamente neutras e involucran sustituciones de nucleótidos que no cambian de aminoácido que generalmente se presentan en la posición tres de un codón (Kimura, 1968) y en secuencias no codificantes como las regiones control (Coral Vázquez, 1995).

Las regiones no codificantes se limitan a las áreas denominadas región control o D-loop, esta región está involucrada en la replicación y la transcripción. Varios estudios revelan que la parte de más rápida evolución del genoma mitocondrial es la región control o D-loop (Silva, 2011).

La variabilidad existente en la región D-loop y su uso como marcador molecular en conjunto con fragmentos de genes mitocondriales vecinos, lo ha convertido en uno de los más utilizados para análisis filogenéticos en diversas especies de interés (Giraldo *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo fue examinar la extensión de la diversidad genética y el origen ancestral de ovinos de las razas criollas de la región de las Altas Montañas, de Veracruz, específicamente de los municipios de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa, mediante marcadores tipo microsatélite y el gen mitocondrial D-loop, para contribuir al establecimiento de un marco de referencia con propósitos de conservación y mejoramiento genético de estas razas.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la diversidad genética y el origen ancestral de ovinos criollos de la región de las Altas Montañas, Veracruz, México por medio de microsatélites y de la región D-loop del ADN mitocondrial.

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir índices de diversidad genética (HWE, PIC, Na, He, Ho) y estructura genética (FST, FIT, AMOVA) en ovinos criollos mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites.
- Establecer las relaciones filogenéticas en ovinos criollos por medio de la región D-loop del ADN mitocondrial.

### **1.3. HIPOTESIS.**

Los ovinos criollos la Región de las Altas Montañas de Veracruz, México, poseen diversidad genética única que les permite mantener su identidad y su origen ancestral.

### **1.4 JUSTIFICACIÓN.**

La pérdida de especies y variedades de fauna y flora de la biodiversidad, tiene como consecuencia la desaparición de razas de ganado criollas, adaptadas al medio natural en el que se originaron y que constituyen la garantía de nuestra soberanía alimentaria (Alcala, 2009). La producción ovina ocupa uno de los últimos lugares por su impacto económico en la industria pecuaria nacional, sin embargo, es reconocida como una actividad importante dentro del sector ganadero, por el alto valor que representa al constituir un componente benéfico para la economía del campesino de escasos recursos y por la gran demanda de sus productos (Chacon, 2016).

La caracterización genética es realizada principalmente para determinar los parámetros de diversidad dentro de una población y entre distintas poblaciones de animales, para identificar localizaciones geográficas, proporcionar información sobre relaciones evolutivas, identificar relaciones de parentesco y apoyar en el mejoramiento genético( Hernández y Mejía, 2013).

La diversidad genética de los individuos es primordial para la subsistencia de las especies a largo plazo, si esta disminuye, por ende, se reduce su capacidad de adaptarse y sobrevivir a los cambios ambientales (FAO, 2015). Mantener la variabilidad genética es vital para responder exitosamente a las presiones ambientales de selección, desarrollando así estrategias y programas tanto en

mejoramiento genético como en la conservación de esta especie (Segura y Montes, 2001).

Los beneficios económicos del mejoramiento genético resultan del aumento de producción y por la reducción de costos en el proceso de crianza, ya que los ovinos criollos demandan menos insumos para su mantenimiento. Además de que tienen mayor rendimiento en carne aprovechable y aportan a la adaptabilidad, precocidad, fertilidad, lo que impacta favorablemente en la economía de los productores (Partida de la Peña *et al.*, 2013).

Las razas criollas son una opción viable para hacer más eficiente la producción de carne ante el calentamiento global, la generación de conocimiento sobre el uso de vegetación nativa y ganado criollo, tiene gran importancia para aminorar los daños ambientales por las prácticas ganaderas tradicionales. Lograr sustentabilidad en los sistemas de producción ganadera es un proceso complejo, donde el conocimiento y valoración del ganado criollo constituye el primer paso hacia su conservación (Ortiz-Colín y Alayón, 2021).

La ganadería ovina, en la región de las Altas Montañas se asocia a sectores poblacionales vulnerables, tiene una gran importancia social y productiva, ya que, en muchos casos, es su principal fuente de ingresos y se basa en la búsqueda de un uso eficiente de los recursos por los productores que optan por la explotación de estas especies a nivel de unidad de producción (Martínez-Partida *et al.*, 2011).

Los ejemplares criollos se adaptan a condiciones diversas sin que su capacidad de producción y reproducción disminuyan, sin embargo, cualquier factor que vulnere este sistema de producción tiene un impacto negativo directo en el bienestar social (Ortiz-Colín y Alayón, 2021); de ahí la importancia del impacto social de este proyecto, que contribuirá al mejoramiento de las condiciones sociales de los productores.

Por todo lo anterior conocer la diversidad genética y el origen de las poblaciones de los ovinos criollos permitirá tomar decisiones adecuadas y poder desarrollar estrategias y programas adecuados para la conservación y/o mejoramiento genético de esta especie, garantizando al propio tiempo la conservación para futuras generaciones, beneficiando a ganaderos, gobierno y población en general.

## **CAPITULO 2.- REVISION DE LITERATURA.**

### **2.1 Origen de las razas ovinas criollas.**

El género al que pertenecen los ovinos, el género *Ovis* es uno de los más complejos en cuanto a su evolución, y clasificación sistemática estas han sido con base a las características morfológicas y la distribución geográfica. Se han identificado hasta 7 especies de las cuales descienden los ovinos salvajes (Reza *et al.*, 2010).

La domesticación de las ovejas se realizó hace aproximadamente 9,000-11,000 años, en los territorios que actualmente constituyen a Irán, Turquía, Siria e Irak. Gracias a investigaciones arqueológicas y genéticas, se sabe que los ovinos descienden del muflón euroasiático (*Ovis musimon/Ovis orientalis*) (Aguilar-Martínez *et al.*, 2017).

Durante el periodo de la conquista en México, ante la necesidad de brindar al nuevo territorio una organización económica autosuficiente, se comenzaron a aclimatar productos agrícolas de toda índole provenientes de España. El ganado ovino se introdujo poco después de la conquista, por lo menos desde el año 1525. (Matesanz, 1965).

El ganado ovino fue transportado desde los puertos de Sevilla, Cádiz y de las islas Canarias a las islas del Caribe hacia el continente americano. Se deduce que algunas de las razas que se introdujeron durante esa época se encuentran la Manchega,

Lacha, Churra, la Merino española, Castellana y Rasa Aragonesa (Gayosso-Vázquez y Morales, 2009).

Los ovinos debían ser la alimentación de los tripulantes de las naves y de los conquistadores; algunos de los ovinos que alcanzaron a llegar a las islas del Caribe, se pudieron aclimatar, reproducirse y por ende, aumentar su número antes de llegar a México, mejor conocido en ese entonces como la Nueva España (Perezgrovas Garza, 1998).

Los primeros lugares donde se localizaron las estancias de ovinos y que pasaron a ser desde ese momento como grandes centros productores, fue la ciudad de México, Coyoacán, Chapultepec, Zacatula, Cuajimalpa, Acasuchel, Tepetlaostoc, el valle de Matalcingo y Michoacán (Matesanz, 1965).

La reproducción de los ovinos españoles fueron creando un mosaico genético dando origen a los “borregos criollos”, puesto que, a los individuos que descienden de los animales que trajeron los españoles durante el periodo de la conquista se les define como animal “criollo” (Perezgrovas Garza, 1998; Gayosso-Vázquez y Morales, 2009).

Dentro de las razas españolas de las que se cree descienden los ovinos criollos en México, predominan las características de la raza churra española. En la sierra de Zongolica, Veracruz, se cuenta con una variedad de tipos genéticos, principalmente blancos, negros, café cara negra y gris (Citlahua , A.E. y Vargas, 2009).

Al centro del país se pueden encontrar rebaños encastados con Suffolk, dichos rebaños originalmente estaban conformados solo por ovinos criollos, al hacer estudios genéticos mitocondriales sobre estos individuos cruzados, se puede encontrar la presencia de ADNmt de los ovinos criollos. (Raúl, Gayosso-Vázquez y Morales, 2009)

Se asume que los ancestros de los ovinos domésticos eran: muflón, argali y el urial, considerando un origen polifilético. El patrón cromosómico de estos ovinos salvajes varía de 52 a 58, pero a pesar de ello, tienen la posibilidad de reproducirse entre ellos y con los ovinos domésticos y producir crías fértiles (FAO, 1997). Sin embargo, con la realización de análisis genéticos la identificación de los linajes abrió la posibilidad de confirmar el origen polifilético de la oveja doméstica propuesto. Así, mediante trabajos de genética se ha establecido que no existió una contribución del urial o argali en la formación de la oveja doméstica, dejando al muflón asiático como el ancestro silvestre más probable. De acuerdo con Aguilar *et al.*, (2017) esto fue confirmado en un estudio que consideró el mitogenoma completo de ovinos domésticos y silvestres, donde las secuencias del muflón europeo tuvieron una relación más estrecha con las ovejas domésticas. Por lo que debido a estos análisis se sugiere que la oveja doméstica es monofilética y que su ancestro silvestre es el muflón.

### **2.1.1. Características generales de los ovinos.**

La oveja (*Ovis aries*) es un mamífero rumiante cuadrúpedo ungulado, perteneciente a la familia de los bóvidos, es de tamaño mediano, su cuerpo está cubierto de un pelo espeso, rizado y suave, el cual se le conoce como lana, puede o no tener cuernos en ambos sexos o solo en los machos, regularmente tienen orejas alargadas y estrechas, sus extremidades son delgadas y terminan en pezuñas. Regularmente el macho recibe el nombre de carnero, la hembra recibe el nombre de oveja y los descendientes

de menos de un año, sin importar el sexo, reciben el nombre de corderos (Huallata *et al.*, 2012).

Dentro de los ovinos existen numerosas razas de esta especie y por lo tanto varían en tamaño y color. Se caracterizan por tener un cuerpo y patas relativamente robustas, pelaje abundante, hocico alargado y cola pequeña, además de orejas pequeñas a grandes. Generalmente poseen cuernos, aunque no es una generalidad en todas las razas. El pelaje puede variar en color del café, blanco, negro o una mezcla de estos. En los ejemplares silvestres la cubierta de pelaje inferior se muda cada año en la primavera (Álvarez y Medellín, 2005).

Los ovinos criollos son animales que se han adaptados a diferentes zonas agroecológicas, descienden de los ovinos traídos por los españoles durante el siglo XVI. Dentro de las características más importantes destacan su alta rusticidad y mediana prolificidad, la rusticidad es la característica de mayor interés, puesto que a pesar de contar con deficientes condiciones de alimentación, poseen genes muy importantes para mejoramiento genético (Huallata *et al.* 2012).

### **2.1.2 Ganadería ovina en México.**

Las actividades pecuarias tienen una gran relevancia en el contexto socioeconómico del país y han sido pilares del desarrollo de la industria nacional mexicana. Dentro de este sector, la producción ovina de carne es la actividad que más esparcida se encuentra en el medio rural, puesto que se practica en todos los estados de la República Mexicana y están adaptadas a las características de cada región, aún en condiciones adversas de clima, que no permiten la práctica de otras actividades productivas (Góngora-Pérez *et al.*, 2010).

En las últimas décadas la ganadería ovina ha tomado mayor relevancia, existen apoyos y programas gubernamentales a nivel estado como nivel federal. La producción de carne de ovino presenta una tendencia creciente casi de manera continua. En general la ganadería ovina está orientada a autoconsumo, entretenimiento, compra venta de ganado sin fines de lucro, industria (Torrescano et al., 2009)

La ovinocultura está condicionada por la disponibilidad de recursos, de insumos, de la tecnología a utilizar y del mercado. En el centro del país predomina el sistema de producción extensivo de zonas rurales de montaña, sierra y valles. En este tipo de unidades de producción el objetivo es el ahorro y la capitalización de la unidad. La alimentación del rebaño depende de la vegetación natural y de los residuos de cosechas de la agricultura de temporal y tienden a adaptarse con facilidad a zonas áridas. La mano de obra es de tipo familiar y se emplea en el manejo del rebaño (Vázquez et al., 2018).

Mucha de la investigación en México se ha inclinado hacia este sector, que se ha caracterizado por la generación de tecnologías sin tomar en consideración la situación geográfica y económica de los productores, o bien impulsando tecnologías o introducción de razas especializadas para aquellos productores que cuentan con los recursos económicos para aplicarlas y cuyo principal objetivo es incrementar sus rendimientos y ganancias, sin tomar en cuenta a los productores de escasos recursos quienes quedan en completa desventaja al no contar con todos estos tipos de instrumentos (Góngora-Pérez et al., 2010).

El Estado de México es el más importante productor de ovinos, debido a que concentra el 30% de inventario a nivel nacional, seguido por Hidalgo con el 25% y Veracruz con el 15% (Partida et al., 2013). En 2016, la producción nacional de ganado

ovino en pie, es decir vivo, fue de casi 118 mil toneladas, de las cuales 60,300 fueron destinadas a carne en canal (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2017).

### **2.1.3. Razas ovinas puras comunes.**

#### **2.1.3.1. Oveja Latxa ó Lacha.**

La palabra Latxa significa basta, y se le llama así por el tipo de lana de los miembros de esta raza, que es una de las más primitivas en España (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, s.f.). Esta raza proviene del País Vasco de clima atlántico, con temperaturas moderadas y elevada pluviometría (1.200 mm). Son capaces de efectuar largos recorridos en relieve accidentado y de soportar ambientes extremos (frío intenso, nieve y climas cálidos y húmedos). Está adaptada a la transhumancia entre valles y montañas con importantes variaciones en la cantidad y calidad del forraje. Su alta rusticidad la hace fácilmente adaptable a condiciones restrictivas (Navarro y Bórquez, 2008).

Presenta dos variedades, la oveja cara negra y la cara rubia. La oveja cara Rubia es de tamaño medio, con un perfil recto y con vellón abundante que cuelga en forma de mechales largas a ambos lados del cuerpo. La cabeza con perfil fronto-nasal recto o ligeramente convexo en las hembras, tiene orejas de longitud media y con gran capacidad de movimiento. El vientre es ligeramente voluminoso y sus extremidades son delgadas y enjutas. Los machos presentan cuernos en poca proporción. Las hembras tienen mamas globosas, desprovistas de lana, pero cubiertas con pelo fino. En esta variedad, la piel y las mucosas se encuentran despigmentadas. El peso del macho adulto va de 50 a 70kg y en las hembras de 35 a 50kg (Gabiña *et al*, 1991).



**Figura 1** Variedad de Ovino de la raza Lacha (Latxha), de lado izquierdo se muestra la variedad cara negra y de lado derecho la variedad cara rubia (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019)

En la variedad de cara oscura, la piel y el pelo son blancos a excepción de la cabeza y extremidades, las cuales varían en tonos de negro intenso a un pardo grisáceo o marrón oscuro. Su lana es gruesa, poco ondulada y de gran longitud. Los cuernos generalmente se presentan en mayor proporción que en la variedad cara rubia. Su peso en la etapa adulta va de 45 a 55 kg para las hembras y en machos de 55 a 75 kg (Gabiña *et al.*, 1991).

#### **2.1.3.2 Oveja Churra**

La raza Churra es una raza autóctona, ubicada mayoritariamente en la cuenca del Duero, España. Existen otras razas íntimamente emparentadas, como son la Churra Tensina y la Lebrijana (San Primitivo y De la Fuente, 2000). Es una oveja rústica de las más primitivas de la península. Forma parte de las razas más importantes de

España por su alta especialización en la producción de leche y por su elevado censo (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).

Es una oveja de tamaño medio, longilínea, con una característica lana larga y basta. Su aspecto es rústico y de vellón desflecado. El color de sus capas es blanco, con coloración periférica en negro o pardo que afecta a la porción terminal de las orejas, alrededor de los ojos, labios y morro, partes distales de las extremidades, región umbilical y otras zonas. El peso en hembras es en promedio de 66 kg y en machos de 73 kg, mientras que la altura cruz es de 68 cm y 81 cm respectivamente (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).



**Figura 2** Morfología de la raza ovina Churra (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).

### **2.1.3.3 Oveja Canaria**

Es una raza autóctona que tiene presencia prehistórica, es producto de la fusión de la oveja aborigen (carente de lana) llegada del continente africano con los primeros pobladores, con razas peninsulares y portuguesas de lana importadas por los colonos y conquistadores a las islas Canarias, lugar al que debe su nombre. Se encuentran principalmente en el archipiélago de las Islas Canarias, en zonas húmedas ricas en pastos en la zona norte y zonas áridas del sur. También se encuentran en las islas de Lanzarote, Fuerteventura y el Hierro (Ministerio de Agricultura, pesca y

alimentación, 2019). Es una raza extremadamente rústica, se adapta con facilidad a los diversos microclimas isleños, siendo el sistema de explotación pastoreo en rebaños (Consejo de Agricultura, ganadería y pesca, s.f.).

Esta raza cuenta con una cabeza con perfil rectilíneo o subconvexo. Sus orejas son generalmente grandes y ligeramente caídas. Tiene un dimorfismo sexual marcado, donde los machos presentan un perfil subconvexo más evidente. Es una raza de color blanca, pero también varía en negro, marrón y sus combinaciones. La parte de la cara es desprovista de lana. En machos su altura cruz es de 70 cm aproximadamente, mientras que en hembras de 65 cm. El peso va de 60kg y 50kg respectivamente. Los machos presentan cuernos que se enrollan en forma de espiral (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).



**Figura 3** Oveja de la raza canaria (Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación, 2019).

#### **2.1.3.4 Oveja Manchega**

Debe su nombre a la región de La Mancha, que ocupa parte Centro-Este de la Península Ibérica, zona de origen y de mayor explotación de la raza. Es una de las razas ovinas más importantes, tanto por censo como por sus características productivas (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, s.f.). Es la raza

española autóctona más extendida, pues se encuentra en al menos 41 provincias representando un total de cobertura del 82%.

Es una raza rústica que se adecua al pastoreo en zonas áridas y de clima extremo (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).

Presenta dos variedades, la oveja manchega y la manchega negra. La manchega blanca tiene su cabeza es de tamaño medio, cuentan con orejas grandes, largas y ligeramente inclinadas, hocico amplio y nasales anchos. Cuentan con pecho ancho, costillar redondeado y vientre proporcionado. Tienen un perfil convexo, que se destaca claramente en los machos, y es más suave en las hembras. Tienen dimorfismo sexual marcado. Sus extremidades son aplomadas. Su vellón es blanco con la piel, mucosas y faneros despigmentados o con pigmentaciones discretas. Esta raza no cuenta con cuernos. La altura cruz en machos es de aproximadamente 97.5 cm y en hembras de 80 cm, el peso es de hasta 100 kg y 75 kg respectivamente (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).



**Figura 4** Variedades de la oveja manchega, de lado izquierdo se muestra la manchega blanca y de lado derecho la manchega negra (Ministerio de Agricultura y Pesca y Alimentación, 2019).

La oveja manchega negra agrupa ovinos de perfil convexo, del mismo modo tiene dimorfismo sexual, proporciones alargadas, aunque condicionadas al medio en donde viven. Posee piel de color negro intenso en todo el cuerpo, aunque puede existir la presencia de una mancha blanca en la nuca y otro en el extremo distal en la cola, el peso en machos es de aproximadamente 90 kg en la etapa adulta y de 60 kg en hembras. Ambos sexos son acornes (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).

#### **2.1.3.5 Oveja castellana.**

Es una raza que debe su nombre a su área geográfica de origen, Castilla y León. Ha sido considerada como una raza de triple aptitud por su capacidad de producción de leche, carne y lana, pero sobre todo es usada para carne y leche. En esta raza se reconocen 2 variedades, la blanca y la negra. De estas, la variedad negra se encuentra en el grupo de protección especial debido a que su censo hasta 2001, era muy bajo. Su área de distribución es fundamentalmente en las provincias de Valladolid, Zamora y Salamanca. Esta raza se distingue por ser muy rustica, permitiéndole aprovechar los recursos pastables disponibles, especialmente en zonas extremadamente secas y pobres donde apenas existe agricultura (González *et al*, 2001).

La variedad blanca en donde la piel, pelo y lana son de color blanco, es la más abundante en la actualidad, tiene cierta influencia de la raza manchega y se dedica tanto a la producción de carne como de leche y la raza negra se dedica exclusivamente a la producción de carne.

La variedad blanca es una raza de tamaño medio, con perfil subconvexo. Su cabeza es sin lana y aplanada lateralmente. Tiene orejas de tamaño pequeño-medio, cuello musculado sin pliegues. Sus extremidades son fuertes de longitud media. El vellón es

entrefino, cerrado, extendido por tronco y cuello, sin rebasar los corvejones. La altura cruz en machos es de 80 cm y en hembras de 71 cm, mientras que el peso es de 80 en machos y de 50 en hembras. Pueden llegar a tener cuernos fuertes y bien desarrollados, pero no es frecuente que se presenten (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).



**Figura 5** Variedad castellana blanca y variedad castellana negra (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).

La variedad negra es una oveja más rústica, de perfil recto, o atenuado perfil subconvexo, sus orejas son de tamaño pequeño o mediano y son móviles. Su cola es larga. Los dos sexos son acornes (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2019).

#### **2.1.3.6 Oveja criolla**

Son animales adaptados en diferentes zonas agroecológicas, provienen de la descendencia de los ovinos traídos por los españoles durante el siglo XVI. Su principal característica es de alta rusticidad y mediana prolificidad, bajo nivel productivo de lana y carne, peso vivo de 29 kg para ovejas y 30 kg para carneros (Huallata *et al.*, 2012).

## **2.2. Conceptos de diversidad genética, relaciones de parentesco: implicaciones de conservación.**

### **2.2.1. Diversidad genética.**

La diversidad o polimorfismo genético es la variación de una secuencia de ADN entre individuos (o cromosomas) distintos dentro de una especie dada (o dentro de una población dada), contribuye a las especies la capacidad de responder y adaptarse a cambios ambientales. Los individuos de una misma especie no son genéticamente idénticos, sus secuencias de ADN difieren en cierta medida y estas diferencias conocidas como polimorfismos, son quienes constituyen la diversidad genética (Ellergren y Galtier, 2016).

La diversidad genética se define como variaciones heredables en los genes en cada organismo, entre individuos de una población y entre subpoblaciones de una especie. Es resultado de diferencias alélicas de las unidades de herencia (genes) de los individuos de una o más poblaciones o subpoblaciones de una especie (Piñero, *et al.*, 2008). Los genes, segmentos de ADN, se encuentran distribuidos en los cromosomas, variando entre especies; en el ADN está codificada la información a partir de la cual se desarrolla cada ser vivo y es parte de la plasticidad fenotípica de cada individuo (Piñero *et al.*, 2008). Estos genes forman la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas y moldea la diversidad de los seres vivos. Es importante conservar la diversidad genética ya que integra el potencial evolutivo de las especies, pues dicha diversidad hace frente al medio (físico y biológico), posibilitando su adaptación a los cambios de este (Piñero *et al.*, 2008).

La diversidad genética entre organismos esta dada principalmente por deriva genética y selección natural, la primera actúa de forma al azar y la otra como respuesta a un

proceso de adaptación al medio (Kimura 1986). La variación genética es medible, pues cada individuo de una especie, a excepción de los gemelos monocigóticos, posee una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN derivan de mutaciones resultantes de la sustitución de un (o varios) nucleótido (single nucleotide polymorphism o SNP), inserciones, deleciones de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación o inversión de fragmentos de ADN (Delgado-Valerio *et al.*, 2010).

De acuerdo con Gonzáles (2017), la diversidad genética es cualquier medida de la variación genética en loci neutrales o adaptativos de poblaciones y especies, en otras palabras, cuán diversa genéticamente es una población o individuo.

Desde el punto de vista teórico, se puede pensar que la diversidad genética refleja el balance entre la aparición y desaparición de variantes genéticas (alelos). Nuevos alelos aparecen en cada generación por mutaciones espontaneas debido a errores en la replicación del ADN o por daños inducidos por mutágenos. La tasa de mutación no es constante en todo el genoma ni entre especies, esto explica parte de la variación que se observa en la diversidad genética. La diversidad genética también se rige por la tasa de pérdida y fijación de alelos. Esta fijación se refiere a la propagación completa de una mutación en una población de tal manera que reemplaza todos los demás alelos de un sitio (Ellergren y Galtier, 2017), y depende del tamaño de la población.

### **2.2.1.1 Diversidad genética en ovinos.**

La oveja juega un papel fundamental en los sistemas de producción alimentaria y con frecuencia es reconocida como un animal multipropósito capaz de potenciar la economía rural. Su rusticidad, adaptabilidad y alta prolificidad le dan mucha popularidad (Ocampo *et al*, 2016). Los ovinos criollos son importantes debido a su

adaptación y aclimatación a condiciones ambientales específicas del lugar donde han habitado por tiempo prolongado, así como también por ser animales mucho más rústicos y resistentes a parásitos ya que no reciben ningún tratamiento sanitario, aunque con bajos niveles productivos de lana y carne (Ochipinti *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a su manejo reproductivo inadecuado en las poblaciones y tamaño de la población, han aumentado los niveles de consanguinidad y por lo tanto, la pérdida de la productividad, suponiendo un riesgo para la conservación de los recursos genéticos de la población (Ocampo *et al.*, 2016). Se ha comenzado a reconocer el valor de resistencia de las razas criollas y están empezando a ser utilizados en programas de cruzamiento o para la introducción de genes de adaptación y resistencia a otros ovinos. Es por esto, que es importante el estudio de su diversidad genética para preservar el patrimonio genético de los ovinos criollos (Ochipinti *et al.*, 2012).

En los últimos años, ha tomado lugar el desarrollo de herramientas moleculares Y estadísticas para el análisis de estructuras genéticas para la caracterización de la diversidad entre y dentro de las razas. La caracterización tradicional restringida por medio de atributos fenotípicos puede ahora complementarse con un número cada vez mayor de marcadores moleculares disponibles y el desarrollo de técnicas estadísticas especializadas para su análisis. Todo el uso de estas técnicas es con la finalidad de ayudar en el análisis de de la variabilidad genética tanto dentro como entre razas y para contribuir a establecer prioridades de conservación (Toro *et al.*, 2009).

### **2.3. Técnicas para el análisis de diversidad genética en ovinos.**

### **2.3.1. Marcadores moleculares.**

Los marcadores moleculares son una herramienta para estudios de diversidad genética, entre otras aplicaciones. De manera general, los marcadores genéticos se pueden clasificar en citogenéticos (cromosomas), bioquímicos (electroforesis de enzimas) y los basados en ADN, que a su vez se agrupan, según el método de identificación, en: a) los de clonación (obtención de fragmentos idénticos de ADN a partir de una misma secuencia original) y de secuenciación (determinación del orden de bases nucleotídicas en fragmentos de ácidos nucleicos); y b) los de impresión única o fingerprinting (utilización de pequeñas secuencias de ADN que se sabe que varían entre individuos). Se espera que un marcador molecular sea capaz de discriminar diversos alelos (diferentes versiones de un mismo gen) de un mismo locus, y sea útil para detectar polimorfismos en el mayor número posible de locus al mismo tiempo, en una única reacción (Ríos *et al.*, 2009).

En la actualidad, existen varias técnicas moleculares que permiten conocer la proporción y variación de genes en las poblaciones naturales de manera directa a partir de regiones flanco del ADN (Rentarúa, 2007). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* (alelos o genes) únicos o múltiples (*locus*) y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). Estos han sido utilizados como herramientas efectivas para evaluar la diversidad genética y las estructuras poblacionales en distintos animales (Zhou *et al.*, 2021). En particular, Los marcadores de ADN se utilizan en los análisis filogenéticos y en la búsqueda de genes útiles en la selección asistida por marcadores, trazabilidad de alimentos y pruebas de paternidad.

### **2.3.1 Marcadores Microsatelites (SSRs o STRs).**

Los marcadores de microsatélites son secuencias cortas repetidas, Simple Sequence Repeats (SSR), Short Tandem Repeats (STR) o mejor conocidos como microsatélites

son abundantes en el genoma eucariota, están constituidas por unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Cada secuencia SSR se define por el tipo de unidad repetida y por su posición que ocupan en el genoma (*locus*), cuya frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies. Por ejemplo, son abundantes en genomas de peces, insectos himenópteros y mamíferos, pero no son frecuentes en aves, en plantas y lepidópteros (González, 2003). Estos marcadores se heredan de manera codominante, permitiendo diferenciar bandas en individuos homocigotos y heterocigotos. Los microsatélites presentan altas tasas de mutación, lo que permite diferenciar individuos estrechamente emparentados (Zhang, 2004; Espinoza *et al.*, 2007).

Los microsatélites pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos), por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos), cada motivo único se consideran puros o perfectos: AAAAAAAAAA o (A)11); aquellos conformados por dos o más motivos se denominan compuestos: AAAAAATTTTTT o (A)7(T)7) y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de la repetición: AAAAAAGAAAAA o (A)6G(A)6) (Schlötterer, 2000). Debido a esta diversidad de tipos y en los diferentes genomas que se localizan, pueden brindar información a diferentes niveles. Es decir, los mononucleótidos y dinucleótidos son más abundantes y tienen una tasa de mutación mayor que los demás, por lo que son apropiados para detectar diferencias entre individuos de una misma población, mientras que aquellos con repeticiones de tres o más nucleótidos muestran menor variabilidad y permiten la determinación de paternidad y el análisis de variación entre poblaciones e incluso entre especies (Vázquez y García-Morales, 2014).

Ciertos alelos SSR con suficiente diferencia de tamaño, pueden ser visualizados mediante un gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio, geles de poliacrilamida seguido de secuenciación (Sirvent y Gómez 2012).

### **2.3.1.1 Amplificación de los microsatélites**

Los microsatélites son amplificados a través de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), con iniciadores que se alinean en las regiones flanqueantes de la secuencia repetida. Las condiciones para la amplificación por PCR son variables, dependen de la temperatura empleada en la fase de hibridación a amplificar y las condiciones del laboratorio, sin embargo, se puede partir de un programa general (Vázquez y Morales, 2014).

#### **2.3.1.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): técnica para amplificar microsatélites**

La PCR es una reacción *in vitro* que se utiliza para amplificar microsatélites, realizada con una mezcla reactivos y mediante la programación de ciclos de temperatura variable en un termociclador, las muestras de ADN se incuban por intervalos de tiempo (Brown, 2000). Los pasos básicos de una PCR, según Martínez y Silva (2004), son:

- A. Desnaturalización del ADN: las dos cadenas de ADN se separan por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95 °C por 30 s o 97 °C por 15 s; pero temperaturas más altas pueden ser apropiadas para cadenas ricas en G + C.
- B. Hibridación de primers: El termociclador baja la temperatura y las condiciones facilitarán la unión de los primers a las cadenas separadas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers a amplificar. Una temperatura de alineamiento óptima es 5 °C por debajo de la Temperatura media ( $T_m$ ) de los

primers. Debido a que la ADN polimerasa se activa en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85 °C y la temperatura de alineamiento entre 55 a 72 °C genera buenos resultados (Martínez y Silva, 2004).

C. Extensión: se lleva a cabo a 72° C, temperatura en la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, inserta los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del ADN molde (Martínez y Silva, 2004).

### **2.3.2 Técnicas para la visualización de alelos derivados de microsatélites**

La electroforesis es definida como una técnica separativa que emplea un campo eléctrico aplicado que actúa sobre partículas cargadas causando movimiento a través de una matriz (Jorgenson y Lukacs 1959). Las moléculas de ADN tienen una carga eléctrica negativa, cuando estas moléculas son colocadas en el campo eléctrico migran hacia el polo positivo este proceso es llamado electroforesis de ADN (Brown, 1994). Los ácidos nucleicos migran a través del gel dependiendo del tamaño, con una pequeña influencia de la composición de bases (Berger y Kimmel, 1987; Robinson y Lafleche, 2000; Sealey y Southern, 1982).

Los geles de poliacrilamida, tienen una mayor capacidad de resolución con respecto a los geles de agarosa y además dan posibilidad de cargar una mayor cantidad de ADN, su tamaño hace que se puedan emplear para separar macromoléculas como

proteínas y ADN, mientras que los geles de poliacrilamida sirven para separar ácidos nucleicos de 25 a 2000 pb mientras que los geles de agarosa pueden separar fragmentos hasta 10 veces más grandes, se pueden separar ADN de tamaño desde 1 kpb hasta 20 kbp (Fierro, 2014).

La agarosa es apropiada para la electroforesis porque es neutra, adopta una estructura tridimensional de doble helice cuya cavidad central es suficientemente como para acomodar agua. Cuando se prepara el gel, la agarosa y el buffer se calientan hasta que se disuelva la agarosa, la mezcla se coloca dentro de un contenedor hasta que se enfria y gelifica. Cuando el gel se carga, se sumerge en una solución buffer y se aplica un campo eléctrico para que corra el ADN. Generalmente se usa a concentraciones de 0.5 a 2x (Fierro, 2014).

Por su parte, la poliacrilamida se utiliza en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes con preparación rápida. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además, tiene la ventaja de que, variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (García, 2000).

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida  $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2- \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$ . La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato (Chávez *et al.* 1990).

Muchos factores desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son el pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de

corrida, concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, entre otros. Las condiciones óptimas de una buena separación, en la práctica se determinan experimentalmente, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión (García-Pérez, 2000).

La concentración de acrilamida (% T) representa el porcentaje en peso del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 mL) y determina la longitud promedio de la cadena del polímero. La concentración de bis-acrilamida (% C) representa el porcentaje de este monómero en el gel y determina el grado de entrecruzamiento (García-Pérez, 2000).

La estructura del gel comienza a ser notoria a 4 % T; 0,2-5 % C (García, 2000). En general el tamaño del poro disminuye con el incremento del %T. Las proporciones en que ambas se encuentran determinan las propiedades físicas del gel como son densidad, elasticidad, resistencia mecánica y el tamaño del poro. En general se recomiendan valores de T de 5 a 15 % y de C de 2 a 4 %. Para separar moléculas por tamaño, es necesario tomar en cuenta la relación entre el poro efectivo del medio y el tamaño de la molécula que se pretende separar. Si el poro del medio es significativamente mayor que la molécula, la separación electroforética será sobre la base de diferencias de carga y el tamizaje molecular será mínimo (García-Pérez, 2000).

Al aplicar muestras biológicas en un gel con gradiente de acrilamida, todas las macromoléculas comienzan su migración a bajo porcentaje y en la medida en que avanzan se encuentran con poros más pequeños que retardan su movimiento. Las moléculas menores comienzan a tener alta fricción cuando los poros son más pequeños, mientras que las grandes comienzan la fricción en los poros de mayor tamaño. La electroforesis en geles de poliacrilamida puede realizarse en el rango de

pH de 2 a 11, sin embargo, la desaminación de las proteínas o las reacciones hidrolíticas pueden ser severas a valores de pH inferiores a 3 y superiores de 10 (García-Pérez, 2000).

#### **2.4. Microsatélites para estudios de diversidad genética en ovinos**

De acuerdo a la FAO, los microsatélites deben contar con propiedades específicas para el análisis de diversidad genética y la caracterización de las distintas especies de interés zootécnico, entre estas características se encuentran el que sean de dominio público, que las variantes alélicas tengan una herencia mendeliana simple, se debe conocer su situación en los mapas genéticos de la especie y no presentar relaciones de ligamiento entre ellos, cada microsatélite debe tener al menos cuatro alelos, aunque los marcadores con un alto grado de mutación no siempre son los más idóneos pues pueden dar lugar a desajustes en la segregación y no ser adecuados para los análisis de distancia genética y finalmente, se deben usar marcadores interespecíficos de ser posible. Para esto, la FAO recomienda una lista de 30 microsatélites para estos estudios de biodiversidad ovina, estos permiten contar con análisis precisos y se podrán realizar comparaciones con resultados previos (FAO, 2011).

**Cuadro 1** Microsatélites ovinos recomendados por la FAO para análisis de diversidad genética (FAO, 2011).

<b>Nombres</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Secuencia del primer (5'-&gt;3') Forward/reverse</b>	<b>Temperatura de hibridación</b>	<b>No. De acceso al banco de genes</b>
OarFCB128	OAR2	ATTAAAGCATCTTCTCTTTATTTCTCGC CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG	55	L01532
OarCP34	OAR 3	GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC	50	U15699
OarCP38	OAR 10	CAACTTTGGTGCATATTCAAGGTTGC GCAGTCGCAGCAGGCTGAAGAGG	52	U15700
OarHH47	OAR 18	TTTATTGACAACTCTTTCCTAACTCCACC GTAGTTATTTAAAAAATATCATACTCTTAAGG	58	L12557
OarVH72	OAR 25	GGCCTCTCAAGGGGCAAGAGCAGG CTCTAGAGGATCTGGAATGCAAAGCTC	57	L12548
OarAE129	OAR 5	AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG GTAGATCAAGATATAGAATATTTTTCAACACC	54	L11051
BM1329	OAR 6	TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC AACACCGCAGCTTCATCC	50	G18422
BM8125	OAR 17	CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG GGGGTTAGACTTCAACATACG	50	G18475
HUJ616	OAR 13	TTCAAACACTACACATTGACAGGG GGACCTTTGGCAATGGAAGG	54	M88250

DYMS1	OAR20	AACAACATCAAACAGTAAGAG CATAGTAACAGATCTTCCTACA	59	...
SRCRSP9	CHI 12	AGAGGATCTGGAAATGGAATC GCACTCTTTTCAGCCCTAATG	55	L22201
OarCB226	OAR 2	CTATATGTTGCCTTTCCCTTCCTGC GTGAGTCCCATAGAGCATAAGCTC	60	L20006
LSTS5	OAR 7	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	55	L23481
ILSTS11	OAR 9	GCTTGCTACATGGAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	55	L23485
ILSTS28	OAR 3	TCCAGATTTTGTACCAGACC GTCATGTCATACCTTTGAGC	53	L37211
SRCRSP5	OAR 18	GGA CTCTACCAACTGAGCTACAAG GTTTCTTTGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	56	L22197
MAF214	OAR 16	GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG	58	M88160
SRCRSP1	CHI 13	TGCAAGAAGTTTTTCCAGAGC ACCCTGGTTTCACAAAAGG	54	L22192
MAF33	OAR 9	GATCTTTGTTTCAATCTATTCCAATTTT GATCATCTGAGTGTGAGTATATACAG	60	M77200
MCM140	OAR 6	GTTCGTA CTCTGGGTA CTGGTCTC GTCCATGGATTTGCAGAGTCAG	60	L38979
OarFCB20	OAR 2	AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	56	L20004
OarFCB193	OAR 11	TTCATCTCAGACTGGGATTCAGAAAGGC GCTTGGAATAACCCTCCTGCATCCC	54	L01533
OarFCB304	OAR 19	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	56	L01535

OarJMP29	OAR 24	GTATACACGTGGACACCGCTTTGTAC GAAGTGGCAAGATTCAGAGGGGAAG	56	U30893
OarJMP58	OAR 26	GAAGTCATTGAGGGGTGCTAACC CTTCATGTTACAGGACTTTCTCTG	58	U35058
MAF65	OAR 15	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCTCCTCCTGAGAATATAACATG	60	M67437
MAF70	OAR 4	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC	60	M77199
MAF209	OAR 17	GATCACAAAAAGTTGGATACAACCGTGG TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG	63	...
BM1824	OAR 1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCCTTG	58	...
INRA063	OAR 14	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	58	...

## **2.5. Índices de diversidad genética.**

Los estudios de diversidad genética son primordiales para optimizar estrategias de conservación de los recursos zoogenéticos así como implementar medidas de uso en programas de mejora genética. Entre los parámetros básicos para medir la diversidad genética se encuentran:

El tamaño efectivo de la población ( $N$ ) es un índice que estima el número efectivo de animales de una población que se reproducen y aportan genes a la generación siguiente (Serna-Lagunes y Díaz-Rivera, 2011), el cual está estrechamente vinculado al nivel de endogamia y de deriva genética de una población, convirtiéndolo en un indicador para evaluar el grado de pérdida de diversidad genética de una determinada población. El porcentaje de polimorfismo o proporción de loci polimórficos ( $P$ ) que es una medida del número variable en una población y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos de ésta entre el número total de loci analizados, en este caso, es necesario el uso de un criterio arbitrario relacionando el polimorfismo de un locus con su frecuencia alélica, ya que, cuando se aumenta el número de individuos muestreados en una población, también aumenta la probabilidad de encontrar un nuevo alelo (González, 2008).

La riqueza alélica ( $A$ ) que es el número medio de alelos por locus y cuantifica el número total de alelos diferentes detectado en cada uno de los loci de una población (González, 2008). A partir de eso surge la frecuencia alélica o génica, que se refiere a la medida de la abundancia de un alelo en una población. El número medio de alelos ( $NA$ ) y la heterocigosidad observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ), son los parámetros más usuales en la evaluación de la

diversidad intrarracial.

La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) es la proporción de individuos heterocigotos observada en una muestra de la población. Se calcula directamente a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los loci. La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) es referida a la proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas siguiendo el binomio cuadrado  $(p+q)^2$ , en donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias alélicas y  $2pq$  corresponde a la frecuencia de heterocigotos (Tripp, 2009). El Equilibrio de Hardy-Weinberg que es alcanzado en las frecuencias alélicas en una población panmíctica (aquella donde todos los individuos de una población tienen la misma probabilidad de aparearse) donde no hay perturbaciones por efecto de la mutación, migración, selección o deriva. Si dos alelos,  $A_1$  y  $A_2$  tienen frecuencias  $p$  y  $q$ , las frecuencias en equilibrio de H-W para los genotipos  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ , y  $A_2A_2$  serán  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$  respectivamente (Peña, 2019).

Otros parámetros importantes son los índices de diferenciación o fijación genética ( $F_{ST}$ ), se mide el grado de diferenciación genética de las subpoblaciones, calculando las varianzas estandarizadas de frecuencias alélicas entre poblaciones (Weir y Basten, 1990). Este último indicador se puede calcular para los pares de poblaciones en estudio (Weir y Cockerham, 1984), y determinar el grado de diferenciación genética entre poblaciones, esto como resultado de la partición de la diversidad genética en la población. un análisis de varianza molecular (AMOVA) jerárquico (Excoffier *et al.*, 1992),

se puede aplicar para evaluar la distribución de diversidad dentro y entre grupos de razas o subpoblaciones, lo que indica el reparto de la diversidad genética en las distintas fuentes de variación existentes en la población bajo estudio (entre individuos, dentro de individuos, entre subpoblaciones o entre poblaciones). Para evaluar las relaciones genéticas o de parentesco entre poblaciones o individuos, se calculan las distancias genéticas entre pares de poblaciones e individuos y con base a su afinidad genética se asocian a los niveles de parentesco como: sin relaciones, medios hermanos y totalmente emparentados (Piñero *et al.*, 2008).

## **2.6 ADN mitocondrial. ADN mitocondrial en mamíferos**

El ADN mitocondrial (ADNmt) se localiza en las mitocondrias, organelos que se encargan de llevar a cabo la transformación de los nutrientes y el oxígeno en energía química útil (Olazabal, 2014).

El ADNmt es uno de los marcadores genéticos de poblaciones más utilizado en animales, debido a su alto nivel de variabilidad, su herencia clonal (materna) y su supuesto modo de evolución casi neutral (Nabholz, 2008).

Diferentes regiones del ADNmt son reconocidas por su variabilidad, lo cual lo ha convertido en una de las herramientas principales para el estudio del origen de las especies, puesto que, al ser de herencia materna y por ausencia de recombinación, ha permitido realizar inferencia sobre los ancestros (Alvarez-Iglesias, 2008).

Puesto que la única manera en que se presentan cambios dentro del ADNmt es por mutaciones, la única manera en que las secuencias del ADNmt pueden cambiar es

gracias a la acumulación secuencial de mutaciones en distintos linajes maternos, lo que le ha conferido una gran tasa evolutiva (Coral-Vazquez *et al.*, 1995).

En cada mitocondria se encuentran contenidas multiples copias de un mismo cromosoma circular, el ADNmt es haploide, se presenta como una sola secuencia o haplotipo por individuo lo que se denomina como homoplasmia. A diferencia del ADN nuclear, el cual presenta recombinación y alberga la información genética de ambos progenitores, dado que es de herencia biparental (Vergara, 2016).

El ADNmt se utilizan para estimar filogenia y para realizar estudios de diversidad genética (Narisara *et al.*, 2019).

La tasa de mutación del ADNmt con respecto a la del ADN nuclear es 10 veces mayor. Dentro del ADNmt hay regiones codificadoras y no codificadoras, una de estas ultimas es la región D-loop, la cual funciona como sitio de inicio de la replicación (Scotto, 2006). La cual es ampliamente utilizada como un marcador en estudios de diversidad genética, la relación filogenética entre poblaciones y especies, y el origen y dispersión de especies (Bahri-Binabaj-2018).

## **2.7. Estudios de diversidad genética y origen ancestral en ovinos.**

Se han realizado diversos trabajos que se enfocan en realizar el rastreo genético de la descendencia de razas de ovinos criollos y en la caracterización de su diversidad genética, tanto diferentes marcadores genéticos y regiones genómicas.

Neubauer *et al.*, (2015) estudio la diversidad y estructura genética de la raza de ovinos Zackel y otras razas de ovinos de Hungría por medio de la toma de muestras de 6000 ovejas. Los estudios revelaron que la población de ovinos húngara de leche

británica es la que se encuentra más diferenciada con respecto de las otras poblaciones, caso contrario la raza Awassi es la que se encuentra más cercana genéticamente a las otras razas de ovinos. Por su parte, las dos variedades húngaras de la raza Zackel, la blanca y la negra se encuentran muy cercanas genéticamente y tiene un alto grado de polimorfismo genético. Sin embargo, la variedad Zackel de Transilvania no es muy cercana a las Zackel húngaras. Esto indica que no comparten ninguna característica en común, más que el nombre.

Ocampo *et al.* (2016), con el uso de microsatelites determinaron la diversidad genética en 549 individuos correspondientes a 13 razas de ovinos en Colombia, utilizando un panel de 11 marcadores moleculares de microsatélite. Ellos encontraron un total de 157, con un rango de heterocigosidad observada y esperada de 0.44 a 0.84 y 0.67 a 0.86, respectivamente.

En el 2017, Dymova *et al.* realizaron un análisis comparativo de la diversidad genética de ovejas antiguas y modernas para conocer el origen de estos animales y su distribución. Así como para evaluar el papel de los humanos en cada etapa de formación de diferentes razas de ovejas en Siberia del sur, específicamente en la región de Alsai. Ellos encontraron una diversidad alta de haplotipos ovinos, incluida la presencia de dos haplotipos basales, lo que indica que la región de Altai pudo haber sido una ruta de transporte de la migración humana.

En el ADNmt se han utilizado dos regiones, el COI y D-Loop, como en el estudio realizado por Alonso *et al.*, 2017 quienes identificaron el origen evolutivo y la diversidad de poblaciones criollas de ovinos en México. Ellos encontraron que las

poblaciones de ovinos en México tenían un origen filogenético común que descenden de poblaciones de ovinos ibéricas de la raza Churro y Entrefino Trunk. Por su parte Ulloa *et al.*, 2009 también determinaron el origen genético de ovinos criollos mexicanos. A partir de un análisis del gen Citocromo C oxidada subunidad I del ADNmt, donde mostraron también que los ovinos domésticos de México descenden de ovinos europeos.

Muchos otros estudios se han realizado en diferentes países para conocer la filogenia de los ovinos. Prueba de esto se tiene el estudio realizado por Sanna *et al.*, (2015) quienes, a partir de muestras de las islas mediterráneas de Cerdeña y Córcega, usaron ADNmt para inferir la historia evolutiva y las relaciones filogeográficas entre las especies actuales del género *Ovis*. Obtuvieron como resultado que el aumento de los haplogrupos de ovinos modernos ocurrió en un lapso de entre 6 y 32 000 años atrás. Además, el árbol filogenético que construyeron determinó una clasificación más exacta de las especies de ovinos actuales.

Siguiendo con el contexto de la historia evolutiva, Liu *et al.*, (2018) determinaron está junto con la filogeografía de ovejas tibetanas por medio de secuencias de la región D-loop del ADNmt. Ellos tomaron muestras de sangre de 636 ovejas pertenecientes a 15 poblaciones que viven dentro de las áreas de Quinghai y la meseta tibetana en China. Sus resultados revelaron la existencia de 4 linajes maternos y una alta diversidad dentro de ellos. La estimación de los parámetros demográficos a partir del análisis de desajuste reveló que hubo al menos una expansión demográfica de las ovejas tibetanas dentro de las áreas de Quinghai y la meseta tibetana.

Otro estudio sobre el origen genético de los ovinos fue realizado por Brahi *et al.*, (2015) para determinar el origen de ovinos de África occidental. Ellos encontraron que los ovinos estudiados tiene un origen euro asiático. En 2011, Pariset *et al.*, investigaron la distribución geográfica de la diversidad genética de las razas ovinas de Albania, Grecia, e Italia para recopilar información sobre la historia migratoria de la especie. Los resultados que obtuvieron revelaron una diferenciación genética significativa dentro de las razas de ovinos, además de que encontraron un patrón de migración que ocurrió en tiempos postneolíticos.

Por su parte, Koseniuk y Słota, 2016 determinaron la diversidad genética de las razas ovinas polacas Świniarka, Wrzosówka, Pomorska y Wielkopolska basándose en el polimorfismo de la región D-loop del ADN mitocondrial. Y realizaron también un análisis filogenético para conocer el origen genético de las razas. Encontraron que, entre las 4 razas polacas analizadas, Wrzosówka tuvo la diversidad genética más alta, mientras que Świniarka obtuvo los valores más bajos. Identificaron también un intercambio extenso de haplotipos, lo que reveló una estructura débil de razas polacas y la existencia de flujo de genes entre las razas estudiadas.

En 2018, Mustafa analizó las secuencias de ADNmt de ovinos y bovinos para conocer como varían en abundancia, composición y organización entre individuos, razas y especies relacionadas. Este autor encontró que las secuencias repetitivas que evolucionan rápidamente permiten estudiar los procesos de evolución cromosómica o genómica, homogeneización o diversificación en ovejas y más ampliamente a lo largo de los bóvinos.

Debido a la falta de estudios que se centran en la relación genética entre las poblaciones de ovinos criollos de Europa y Sudamérica, Bravo *et al.*, (2019) analizaron la diversidad y estructura genética de 179 ovinos pertenecientes al sur de Chile. Ellos confirmaron el origen genético de la población criolla doméstica en Chile y su relación con las razas europeas. Además de que las poblaciones conservaron altos niveles de diversidad genética. Aunado a esto, Bravo *et al.*, (2015) realizaron un estudio de diversidad genética en ovinos criollos para evaluar la variación genética dentro y entre las razas, además de estimar la relación filogenética entre razas con fines de conservación. Los resultados indicaron una alta variabilidad genética, baja consanguinidad y diferenciación genética. El árbol filogenético mostró una separación entre Hampshire de Valdivia, Hampshire de San José y las otras poblaciones de ovinos criollos.

En el ganado, la mayoría de los rasgos de importancia económica son de naturaleza cuantitativa, resultado de la interacción entre el genotipo y el ambiente (Haley, 2002; Cañon, 2006), los cuales presentan un nivel alto de heredabilidad ( $h=0.9$ ). Esto hace posible integrarlos en programas de mejoramiento genético para incrementar la productividad animal, previo a la identificación de genes que codifican a rasgos morfológicos de interés comercial (Casas *et al.* 2000).

## **2.8 LITERATURA CITADA.**

Aguilar-Martínez, C. U., Berruecos-Villalobos, J.M., Espinoza-Gutiérrez, B., Segura-Correa, José Candelario; Valencia-Méndez, Javier; Roldán-Roldán, A. (2017) "Origen, historia y situación actual de la oveja pelibuey en México", *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(3), pp. 429–439

- Alonso, R.A., Ulloa, A. R., y Gayosso-Vázquez A. (2017). Mitochondrial DNA sequence analysis of the Mexican Creole sheep (*Ovis aries*) reveals a narrow Iberian maternal origin. *Mitochondrial DNA Part A*, 28:6, 793-800.10.1080/24701394.2016.1192613
- Alvarez-Iglesias, V. 2008. Estudio multidisciplinar de la variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones humanas. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Álvarez, J. y Medellín, R.A. (2005). *Ovis aries* (doméstica). Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Berger S.L., Kimmel A.R. (1987). *Guide Molecular cloning techniques*. NY: Academic Press Inc.
- Bernoco D., Oliveira D., Kuabara M. 1997. Análise de parentesco em cavalos de grupos sanguíneos e polimorfismos bioquímicos á tipagem por DNA. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 21(4): 38-44.
- Bahri-Binabaj, F., Bihamta, G., Pirkhezranian, Z. (2018). Diversidad genética y análisis filogenético de la región del bucle D del mtDNA en la raza de oveja Baluchi. *Revista Iraní de Investigación en Ciencia Animal*, 10 (1), 131-139. doi: 10.22067 / ijasr. v10i1.63715

- Bravo, S., Laram, G., Ortíz, M. and Sepúlveda, N. 2015. Genetic differentiation between 'Araucana' creole and 'Hampshire Down' sheeps in Chile. *Chilean journal of agricultural research* 75(1). pp 131-136.
- Bravo, S., Larama, G., Quiñones, J., Pazac, E., Roderod, E. and Sepúlveda, N. 2019. Genetic diversity and phylogenetic relationship among araucana creole sheep and Spanish sheep breeds. *Small Ruminant Research*. 172: 23-30.
- Brahi, O.H.D., Xiang, H., Chen, X., Farougou, S., Zhao, X. 2015. Mitogenome revealed multiple postdomestication genetic mixtures of west African sheep. *Animal Breed Genetics*. 132:399–405.
- Brown, T. (1994). *DNA sequencing: The basics*. Oxford: Oxford University Press.
- Brown, T. (2000). The polymerase chain reaction. En: *Essential molecular biology. A practical approach 2° Ed. Vol 2.*: 89-120. Oxford: Oxford University Press.
- Cañon, J., (2006). Utilización de información molecular en programas de mejoramiento animal. *Revista Corpoica- Ciencia y tecnología agropecuaria*, 7, pp.5–15.
- Casas E., Shackelford D., Keele J.W., Stone R. T., Kappes S. M. y Koohmaraie M. (2000). Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *Journal of animal science*, 78, pp.560–569.
- Castillo-Páez A.Y. 2017. Influencia del comportamiento reproductivo en la distribución de la variabilidad genética en la guitarra rayada, *Zaptryx exasperata*

en el Pacífico mexicano. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1394/3/Tesis%20doctoral%20Ana%20Castillo-Pa%CC%81ez%20%28002%29.pdf>

Chávez Planes MA, Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. 1990. Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana. Cuba.

Citlahua, A.E. y Vargas, L. S. (2009) "La cría de borregos en la Sierra de Zongolica, Veracruz, México en: Fundación Produce Veracruz.", Colegios de Postgraduados campus Puebla, pp. 3–52

Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca. (s.f.). Oveja canaria. Gobierno de Canarias. Disponible en: [https://www.gobiernodecanarias.org/ganaderia/temas/razas\\_autoctonas/oveja\\_canaria.html](https://www.gobiernodecanarias.org/ganaderia/temas/razas_autoctonas/oveja_canaria.html) Accesado: 28 de marzo de 2021.

Coral-Vázquez, R., Salamanca-Gómez, F. y Buentello-Malo, L. 1995. Aportación del adn mitocondrial en el estudio filogenético de las poblaciones indígenas de américa. Anales de Antropología., 32. pp.73-82

Delgado Valerio, P., Núñez Medrano J., Rocha Granados M. C., Muñoz Flores H. J., Gernandt D. S., Pérez-De La Rosa J. A., Parraguirre-Lezama C., Vargas-Hernández J.J., Ramírez-Vallejo P., Ramírez-Herrera C., Ricker M., Hernández H.M. y Ledford, H. 2010. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Revista Mexicana de Biodiversidad, 4 p.78.

- Dymova, M., Zadorozhny, A., Mishukova, O., Khrapov, E., Druzhkova, A., Trifonov, V., Kichigin, I., Tishkin, A., Grushin, S. y Filipenko, M. (2017). Mitochondrial DNA analysis of ancient sheep from Altai. *Animal genetics*. 48. 10.1111/age.12569.
- Ellergren, H. y Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature* 17, 422-434.
- Espinoza, J.L., Fuentes, E., Barros, W. y Ramírez, C. (2007). Utilización de microsatélites para la determinación de la variabilidad genética de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en Chile central. *Agricultura técnica* 67(3), 244-252.
- Excoffier L., Smouse P. y Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- FAO. (1997). Ovinos y Cabras. Lista mundial de vigilancia para la diversidad de los animales domésticos. Roma, Italia.
- FAO. (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>) (traducción de la versión original en inglés, 2007).
- FAO. (2011). Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines, Rome.

- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27.
- Gabiña, D., Urarte, E., Arranz, J., Arrese, F. y Beltrán de Heredia, I. (1991). La raza ovina Latxa: características morfológicas y productivas. Programa de mejora genética. Boletín de información sobre recursos genéticos animales FAO, 27-34.
- García H.M. (2000(a)). Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. Tesis de Maestría. Facultad de Biología Universidad de la Habana. Cuba.
- García H.M. (2000(b)). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnóstico 2000;1(2):31-4
- Gayosso-Vázquez, R.A. y Morales, R., (2009). Técnica pecuaria en México. Técnica Pecuaria en México, 47(3), pp.323–328. Available at: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61312111008>
- Giraldo, P.A., Uribe, S.I. y López A. (2011). Análisis de secuencias de ADN mitocondrial (Cytb y ND1) en *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae). Revista Colombiana de Entomología 37 (2): 273-278.
- Góngora-Pérez, R., Góngora-González, S., Magaña, M. y Lara, P. (2010). Caracterización técnica y socioeconómica de la producción ovina en el estado de Yucatán, México. Agronomía Mesoamericana. 21. DO - 10.15517/am.v21i1.4919
- González, C., de la Fuente, L.F., San Primitivo, F. (2001). Situación actual de la raza ovina castellana. Archivos de zootecnia 50, 21-25

González E.G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59(2-3): 377-388.

González, E.A. (2008). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Tesis. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España.

González, F. (2017). Evaluación e interpretación de resultados en caracterización molecular. Disponible en:  
[http://fernando.gonzalez.unileon.es/web\\_mex14/presentaciones\\_teoría/lección\\_4.pdf](http://fernando.gonzalez.unileon.es/web_mex14/presentaciones_teoría/lección_4.pdf) Accesado: 10 abril 2021.

Haley C. 2002. Quantitative Trait Loci Analysis in Animals. *Journal of heredity* 88, 486.

Hernández, J.M., (2002). Análisis de la Ganadería Ovina en México 1990-2000. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Huallata, A., Alvarado, E., Andrade, R., Aragón, O., Aramayo, C., Arreaño, J.J., Ayma, C.A., Caballero, F., Cabrerizo, L., Carvajal, E., Chacolla, E., Chambi, Y.M., Chilon, E., Chuncho, W., Cruz, E., Escalier, G.M., Espinoza, L., Figueredo, R., Flores, M. Guamán, V.H., Guillén, R., Iriarte, M., Marca, A., Martínez, J. Medina, A., Montaña, R., Moridías, M., Murillo, E., Navia, A., Nina, F.P., Nogales, E., Quispe, R.F., Reyes, J.L., Rivero, M., Salas, R., Salinas, J., Sánchez, A., Sánchez, J., Tito, L., Tola, M., Valencia, C. y Vilela, M. (2012). Compendio

Agropecuaria. Observatorio agroambiental y Productivo. Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras. Bolivia.

Jamieson A. y Taylor, C.S. (1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*. 28: 397-400.

Jones A.G. y Ardren W.R., (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*. 12(10): 2511–2523.

Koseniuk, A. y Słota, E. (2016). Mitochondrial control region diversity in Polish sheep breeds. *Archives Animal Breeding.*, 59, 227-233, <https://doi.org/10.5194/aab-59-227-2016>

Liu, J., Ding, X., Zeng, Y., Guo, X., Sun, X., y Yuan, C. (2018). Phylogenetic Evolution and Phylogeography of Tibetan Sheep Based on mtDNA D-Loop Sequences. En *Mitochondrial DNA - New Insights*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76583>.

Matesanz, J. (1965). Introducción a la ganadería en Nueva España, 1521-1535. *Historia Mexicana* 4 (56), 534, 566.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (2019). Raza ovina Canaria. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/canaria/default.aspx> Accesado: 28 de marzo de 2021.

Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. 2019. Catálogo oficial de razas. Disponible en:

<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/>. Accesado: 12 de septiembre de 2021.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 2019. Raza ovina Castellana. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/castellana/default.aspx> Accesado: 28 de marzo de 2021.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 2019. Raza ovina Castellana variedad negra. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/castellana-negra/default.aspx> Accesado: 28 de marzo de 2021.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (2019). Raza ovina Churra. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/churra/default.aspx> Accesado: 28 de marzo de 2021.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (2019). Raza ovina Manchega. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/manchega/default.aspx> Accesado: 28 de marzo de 2021.

Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. (2019). Raza ovina Manchega variedad negra. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/manchega-negra/default.aspx>

ganaderas/razas/catalogo-razas/ovino/manchega-negra/default.aspx Accedido:  
28 de marzo de 2021.

Ministerio de medio ambiente, medio rural y marino. (s.f.). Raza Latxa. Disponible  
en: [https://www.infocarne.com/ovino/raza\\_latxa.asp](https://www.infocarne.com/ovino/raza_latxa.asp) Accedido: 28 de marzo de  
2021.

Ministerio de medio ambiente, medio rural y marino. (s.f.). Raza Manchega.  
Disponible en: [https://www.infocarne.com/ovino/raza\\_manchega.asp](https://www.infocarne.com/ovino/raza_manchega.asp) Accedido:  
28 de marzo de 2021.

Mustafa, S. I. (2018). Mitochondrial and repetitive DNA defining the sheep genome  
landscape. Tesis Doctoral. University of Leicester. Inglaterra.

Narisara I., Suphawadee Y., Punnarees R., Pisit P., Tossaporn I. y Wirot L. 2019.  
Phylogenetic analysis in various chicken strains inferred from mtDNA D-loop  
information. KHON KAEN Agriculture Journal. 47:1.

Navarro, R. y Bórquez, F. (2008). Resultados y lecciones en producción de leche y  
queso de oveja Latxa proyectos de innovación en región de los ríos y región de  
los lagos. Ograma Ltda, Chile.

Neubauer, V., Vogl, C., Seregi, J., Sáfár L., y Brem, G. (2015). Genetic diversity and  
population structure of Zackel sheep and other Hungarian sheep breeds. Archives  
animal Breeding 58: 3434-350.oa

Ocampo, R.J., Rocha, J.F. y Martínez, R. (2016). Diversidad genética y estructura  
poblacional de ovinos criollos colombianos usando marcadores microsatélites.  
Corporación colombiana de investigación agropecuaria.

- Ocampo, R., Cardona, H. y Martínez R. 2016. Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chilean J. Agric. Res.* vol. (76)1
- Ochipinti, G., Nuñez, L., Cazal, C., Samudio, A., Castro, L., Ramírez, L., León, D., Martínez, A., Oka-Obara, A., Landi, V. y León, D. 2012. Diversidad genética en ovejas de los humedales de la región oriental del Paraguay. *AICA* 2, 227-230.
- Olazábal, H. 2014. Evolución humana y el ADN mitocondrial- *Investigaciones Sociales.* 11. 10.15381/is. v11i19.8048.
- Ortiz-Colín P.N. y Alayón G.J.A. 2021. Sociedad, selva y ganadería. *Ecofronteras,* 25,(71):14-16.
- Pariset, L., Mariotti, M., Gargani, M., Joost, S., Negrini, R., Perez, T., Bruford, M., Marsan, P.A., y Valentini, A. (2011). Genetic Diversity of Sheep Breeds from Albania, Greece, and Italy Assessed by Mitochondrial DNA and Nuclear Polymorphisms (SNPs). *ScientificWorldJournal.* 2011; 11: 1641–1659.
- Partida, J. A., Braña, D., Jiménez, H., Ríos, F. G. y Buendía, G. (2013). Producción de carne ovina. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Peña, S. 2019. Caracterización genética y morfológica de ovinos criollos de Argentina. Tesis Doctorado. Universidad Nacional De La Plata. Argentina.
- Pérez-Hernández P. (2010). Caracterización del sistema producto ovino en el estado de Veracruz. Colegio de Postgraduados

- Perezgrovas G., R. (1998) "Comparación de recursos genéticos: el borrego chiapas (México) y las razas autóctonas de origen español", Archivos de Zootecnia, 47, pp. 425–430
- Piñero D., Barahona A., Eguiarte L., Rocha A., y Salas R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad, pp.415–435.
- Piñero D., Caballero-Mellado J., Cabrera-Toledo D., Canteros C. E., Casas A., Sortibrán A. C. y Espinoza B. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad., I, pp.437–494. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4778.4485>
- Rentaría, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Ecología molecular, (Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X.), Pp. 541-566. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Chetumal.
- Reza, H., Naderi, S., Chintauan-Marquier, L.C., Taberlet, P., Tahir, A., Reza, H., Rioux, D., Kaboli, M. y Pompanon, F. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54(2), pp. 315-326.

- Ríos, E., Mejía, H. y Álvarez, S.T. (2009). Marcadores moleculares: una Revolución en la zoología. *Ciencia*, 5-13.
- Robinson D y Lafleche G. 2000. Nucleic Acid electrophoresis in agarose gels. En *Essential molecular biology. A practical approach*: 89-120 Oxford: Ed. Oxford University Press.
- Rodriguez Bailon, J.E., 2004. Determinacion de parentesco por medio del analisis de ADN microsatelite en alpacas (*Lama pacos*) Tesis de Maestria.Universidad Nacional San Marcos. Peru.
- San Primitivo, F. y de la Fuente, C. (2000). Situación actual de la oveja de raza Churra. *Archivos de zootecnia* 49, 161-165.
- Sanna, D., Barbato, M., Hadjisterkotis, E., Cossu, P., Decandia, L., Trova, S., Pirastru, M., Leoni, G.G., Naitana, S., Francalacci, P., Masala, B., Manca, L. y Mereu, P. 2015. The First Mitogenome of the Cyprus Mouflon (*Ovis gmelini ophion*): New Insights into the Phylogeny of the Genus *Ovis*. *Phylogeny of the Genus Ovis*. *PLOS ONE* 10(12), pp.1-23.
- Saucedo, P. (1987). Industria ganadera. En *Historia de la ganadería en México*. Mexico: UNAM, pp. 31–66.
- Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*.109: 365-371.
- Scotto, E.C. 2006. Análisis filogenético comparativo entre secuencias codificadoras (Cyt b y ATPasa 8) y secuencias no codificadoras (D-Loop) del ADN mitocondrial

de primates y sus implicancias evolutivas en los homínidos. *Revista Horizonte Médico*. 6(2)

Sealey, P. y Southern, E. 1982. Gel electrophoresis of DNA. En: *Gel Electrophoresis of nucleic acids a practical approach* :39-76. Oxford. Ed. Rickwood D, Hames B. IRL Press.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). La ovinocultura, una actividad muy arropadora. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/la-ovinocultura-una-actividad-muy-arropadora#:~:text=En%202016%2C%20la%20producci%C3%B3n%20nacional,consume%20en%20forma%20de%20barbacoa>. Accesado: 28 de marzo de 2021.

Secretaría de agricultura y desarrollo rural. (2015). ¿Carnero, oveja o cordero?. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/carnero-oveja-o-cordero> Accesado: 26 de abril de 2021.

Segura, J. y Montes, R. 2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Biomed*, 12(3), pp.196–206.

Serna-Lagunes R. y Díaz-Rivera P. 2011. Variación genética y conservación de una población de *Crocodylus moreletii* en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana*. 27(3): 547-563.

Serna-Lagunes, R., Clemente-Sánchez, F., Cortez-Romero, C.2, Becerril-Pérez, C.M., Ramírez-Herrera, C. y Salazar-Ortiz, J. 2015. La filogeografía aplicada en

la conservación de fauna silvestre: revisión y resultados. *Agroproductividad*. 8,5: 34-41.

Silva, A., Artilles, A., Suárez, W., Silva, G. 2011. Secuencia y estructura de la región control mitocondrial del roedor cubano *Capromys pilorides* (Rodentia: Capromyidae). *Biotecnología Aplicada* 28:130-135

Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60: 73-76.

Sirvent M. y Gómez C., 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats or Short Tandem Repeats) Microsatélites. Universidad Politecnica de Valencia. España.

Tinaut, A. y Francisca R. 2002. Biodiversidad, clasificación y filogenia. En: Soler. Cruz, M. (Ed. Proyecto sur), *Evolución : la base de la biología*. España. Pp. 293-306.

Toro, M.A., Fernández, J. y Caballero, A. 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science* 120, 174-195.

Torrescano, G.R., Sanchez, A.P., Velázquez F.J. y Sierra, T. 2009. Características de la canal y calidad de la carne de ovinos pelibuey, engordados en Hermosillo, Sonora. *BIOtecnica* (9):41-50.

Tripp, M.A. 2009. Análisis de la estructura genética poblacional del dorado (*Coryphaena hippurus*) en el noroeste del pacífico mexicano y golfo de California

mediante el uso de microsatélites. Tesis de maestría. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, S.C., México.

Ulloa-Arvizua, R., Gayosso, A. y Morales, R.A.A. (2009). Origen genético del ovino criollo mexicano (*Ovis aries*) por el análisis del gen del Citocromo C Oxidasa subunidad I. *Téc Pecu Méx* 47 (3), 323-328.

Vázquez, I., Jaramillo, J.L., Bustamante, A., Vargas, S., Calderón, F., Torres, G. y Pittroff, W. (2018). Estructura y tipología de las unidades de producción ovinas en el centro de México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 15, 85-97.

Vázquez Lobo A. y García Morales A., 2014. Microsatélites. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, (Hancock 1999). México: SEMARNAT Recuperado a partir de: [http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id\\_pub=710](http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_pub=710)

Vélez, A., Espinosa, J.A., De la Cruz, L., Rangel, J., Espinoza, I., y Barba, C. 2016. Caracterización de la producción de ovino de carne del estado de Hidalgo, Mexico. *Archivos de zootecnia* (65) 251:426.

Vergara, M. M., Valderrama, P. P., & Barrera, M. S. P. (2016). El genoma de herencia uniparental en el estudio de las poblaciones fundadoras. In *El ADN de los chilenos y sus Orígenes Genéticos*. Editorial Universitaria.

Weir B.S. y Basten C.J. 1990. Sampling strategies for distances between DNA sequences. *Biometrics*. 46: 551-582.

- Weir B.S. y Cockerham C.C. 1984. Estimatin F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.
- Zhang, D.X. 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol. Evol.* 19, 507-509.
- Zhou, Y.L., Wu, J.J., Wang, Z.W., Li, G.H., Zhou, L. y Gui, J.F. 2021. Microsatellite polymorphism and genetic differentiation of different populations screened from genome survey sequencing in red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*).

## **CAPITULO 3. ESTIMACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA DE OVINOS CRIOLLOS EN LA REGIÓN DE LAS ALTAS MONTAÑAS.**

### **3.1 INTRODUCCIÓN.**

En México, la ganadería es una de las actividades productivas más dinámicas. Introducida en México durante la época de la colonización (Saucedo, 1987), la ganadería permanece muy arraigada al ambiente rural donde los ovinos son criados en diferentes tipos de sistemas productivos y con propósitos diversos, como la producción de carne, lácteos, piel y otros derivados (Pablo, 2017). El estado mexicano de Veracruz, es el tercer productor de ganado ovino. Esta actividad se encuentra organizada en tres distritos de producción: norte, centro y sur con un inventario de ovinos de 28%, 33% y 39%, respectivamente (SAGARPA, 2009). Dentro de esta organización, los ovinos se manejan en sistemas de producción de subsistencia, (42%), subsistencia empresarial (21%) y empresarial (37%). Aquí, las razas que se utilizan dentro del sistema de producción ovina de subsistencia son las razas puras, los cruzamientos derivados de Pelibuey, Black Belly y Dorper, y las razas criollas (Pérez-Hernández 2010). Las razas criollas son así denominadas por ser descendientes de las razas originales traídas durante la colonización. En estas razas criollas, es posible observar una amplia gama de morfotipos originados por la versatilidad genética innata de los ovinos y por la diversidad de condiciones climáticas y geográficas de cada región rural. Pocos estudios han explorado la extensión de la diversidad genética de los morfotipos de ovinos que se observan en las regiones rurales en México. Debido a que la diversidad genética es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones (Rimieri, 2017), evitar la vulnerabilidad a factores bióticos y abióticos (Herrera *et al.*, 2010), mejorar la

respuesta a los cambios en su entorno (Nicolás-Tamqmone, 2016), desarrollar planes y estrategias de conservación y mejoramiento (Espinosa-García *et al.*, 2015), entre algunos, existe interés en su estudio para el aprovechamiento y desarrollo de sistemas de producción ovina que fortalezcan la soberanía alimentaria (Mariscal y Mathez-Stiefel, 2010). Debido a lo anterior, el objetivo de este estudio fue examinar la extensión de la diversidad genética y las relaciones genéticas que mantienen poblaciones de ovinos de raza criolla de las Altas Montañas de Veracruz, Mexico, particularmente de las localidades de Tehuipango, Astacinga y Tlaquilpa, mediante marcadores moleculares tipo microsatélite.

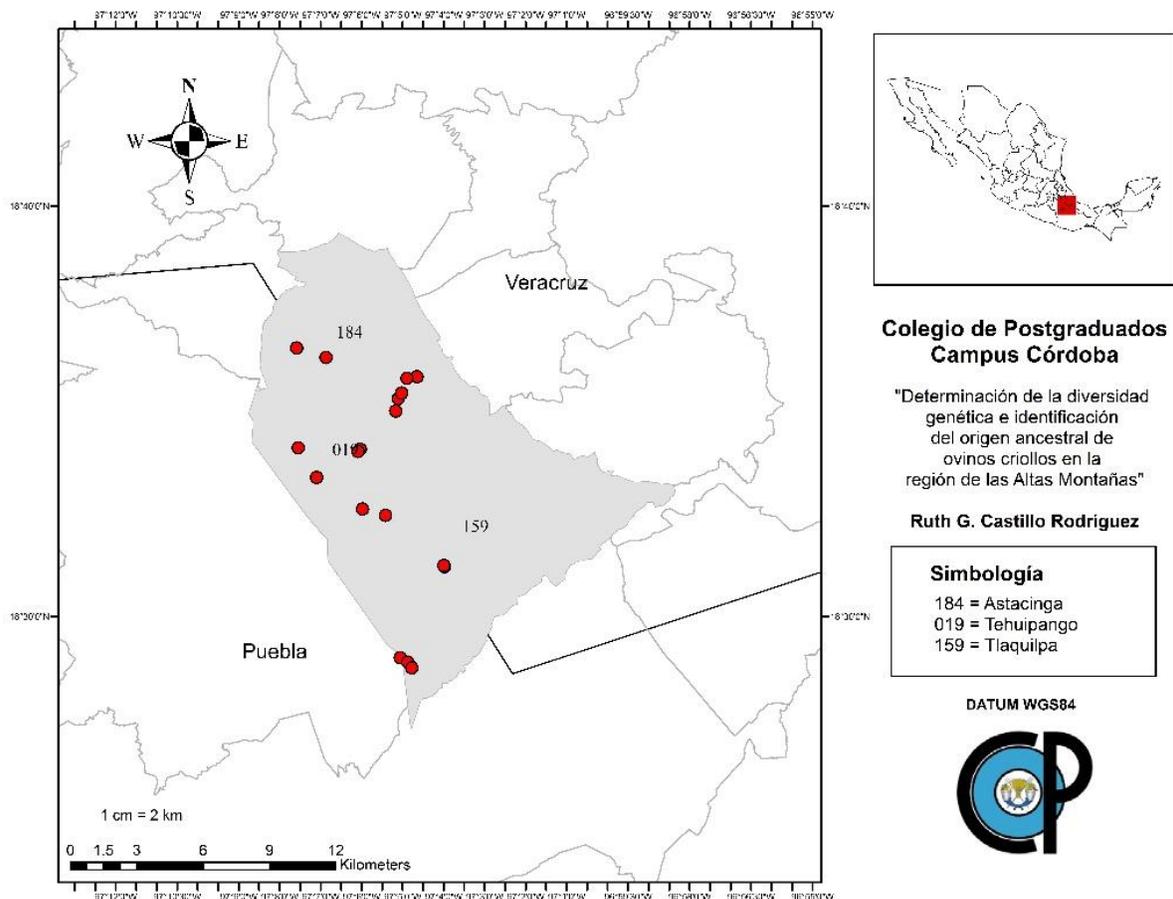
### **3. 2 MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.2.1 Poblacion muestral y muestreo:**

Las poblaciones de ovinos bajo estudio se seleccionaron de los municipios de Tehuipango, Astacinga y Tlaquilpa ubicados en la Región de las Altas Montañas de Veracruz, México (Figura 6). Rebaños de ovinos criollos con supuesto trasfondo genético de las razas Churra, Laza, Castellana, Canaria y Manchega se eligieron para el muestreo, el cual quedó dividido en tres poblaciones: Población 1 (Astacinga) de la cual se recolectaron 21 muestras, Población 2 (Tehuipango) donde se recolectaron 33 muestras y Población 3 (Tlaquilpa) donde se recolectaron 36 muestras. El número total de individuos muestreados fue de  $n=90$ .

Las muestras consistieron de sangre obtenida de cada animal mediante punción cardíaca de la vena yugular (Figura 7) de acuerdo con el procedimiento reportado por Burgos-Paz y colaboradores (2007) y la utilización de tubos plásticos Vacutainer

Plus con EDTA (Becton-Dickinson) en donde se recolectó de 3 a 4 ml sangre de cada animal.



**Figura 6** Ubicación de los puntos de muestreo en los municipios de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa.



**Figura 7** Toma de muestras de sangre en ovinos criollos de la Región de las Altas Montañas.



**Figura 8** Ovinos criollos muestreados en la región de las altas montañas: A) Ovino criollo negro, B) Ovino criollo negro/blanco/café, C) Ovino criollo blanco, D) Ovino criollo gris, E) Ovino criollo café/ cara negra, F) Ovino criollo negro/ blanco/ café, G) Ovino criollo café y H) Ovino criollo blanco/gris/negro.

### 3.2.2 Extracción de ADN y PCR.

El ADN se extrajo con el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) con algunas modificaciones descritas en el Anexo 1. La genotipificación de cada individuo se hizo con cuatro marcadores moleculares tipo microsatélite (SSR). Estos marcadores fueron OarFCB128, SRCRSP9, ILSTS5 y ILSTS11 los cuales se escogieron con base en el panel de marcadores recomendado por la FAO (2011) y el valor del PIC reportado por diferentes estudios de diversidad genética. Las secuencias flanqueantes de estos SSR y el tamaño en pares de bases (pb) se indican en el Cuadro 2. La amplificación de los SSR se hizo mediante PCR en volúmenes de reacción de 20 ul con los siguientes componentes: 40 ng de ADN, buffer 1X, 0.1 uM de cada primer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM de cada dNTP, 0.6 U de Taq polimerasa (Promega) y agua grado PCR suficiente para alcanzar el volumen final de reacción. El programa de amplificación para ILSTS11 e ILSTS5 consistió en una etapa inicial de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 60 s, 53°C por 60 s, 72°C por 60 s; y una extensión final de 72°C por 5 min. Para SRCRSP9 y OarFCB128, el programa siguió las mismas etapas, con excepción de la temperatura de alineamiento la cual fue de 50°C y 56°C, respectivamente. La amplificación de cada SSR se verificó en gel de agarosa 1.5% para confirmar la presencia de cada amplicón.

**Cuadro 2** Microsatélites utilizados para describir la diversidad genética de Ovinos criollos de la Región de las Altas Montañas (FAO, 2011).

<u>Locus</u>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Fuente</b>
		<b>pb</b>	

OarFCB128-F	ATTAAAGCATCTTCTCTTTATTTTCCTCGC	96-136	Agaviezor <i>et al.</i> , 2012
OarFCB128-R	CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG		
SRCRSP9-F	AGAGGATCTGGAAATGGAATC	119-143	Luna-Gonzalez <i>et al.</i> , 2012
SRCRSP9-R	GCACTCTTTTCAGCCCTAATG		
ILSTS5-F	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC	174-221	Sifuentes-Rincón, 2007
ILSTS5-R	TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC		
ILSTS11-F	GCTTGCTACATGGAAAGTGC	256-294	Carrera-Menezes <i>et al.</i> , 2020
ILSTS11-R	CTAAAATGCAGAGCCCTACC		

### 3.2.3 Electroforesis de los SSR

Para determinar el tamaño en pb de cada amplicón, se hizo electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante. Para ello se siguió el protocolo descrito en CIMMYT (2006) utilizando 3 ul de cada reacción por pozo en geles preparados con acrilamida:bisacrilamida 19:1 y el sistema de electroforesis vertical MGV-216-33 (CBS Scientific®, USA) con los siguientes parámetros: migración a 250 V durante 1.5 h, amortiguador de corrida TBE 1X (0.09 M Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8.0) y 25 ng de marcador de peso molecular de 20 pb (Sigma-Aldrich) colocado cada 10 muestras. La detección de cada fragmento se hizo mediante tinción con plata siguiendo el protocolo detallado por Sanguinetti y colaboradores (1994). Cada gel se documentó en formato TIFF en el transluminador MiniBis Pro16 mm (Bio Imaging Systems®, Israel). Los pesos de cada banda en pb se determinaron con el software

GelAnalyzer versión 19.1 para construir la matriz de datos moleculares en hojas de trabajo Excel.

### **3.2.4 Análisis de la diversidad y estructura genética.**

Cada marcador fue probado para determinar su equilibrio de Hardy-Weinberg mediante Chi cuadrada y también fue examinado para calificar su polimorfismo y obtener los parámetros de diversidad poblacional. Estos parámetros fueron: frecuencias alélicas al 5% de confiabilidad, número de alelos por locus ( $N_a$ ), número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), índices de fijación F ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$ ), así como el AMOVA, todos los cuales se obtuvieron mediante el soporte de los softwares GenAlEx V.6.503 (Peakall y Smouse, 2012), DarWin V. 6.0 (Perrier y Collet, 2006) y PowerMaker V.3.25 (Liu y Muse, 2005) (Peakall y Smouse, 2012; Bernard, 2018). Un árbol de relaciones genéticas, con base en distancias euclidianas promedio entre pares, se construyó utilizando el software DarWin.

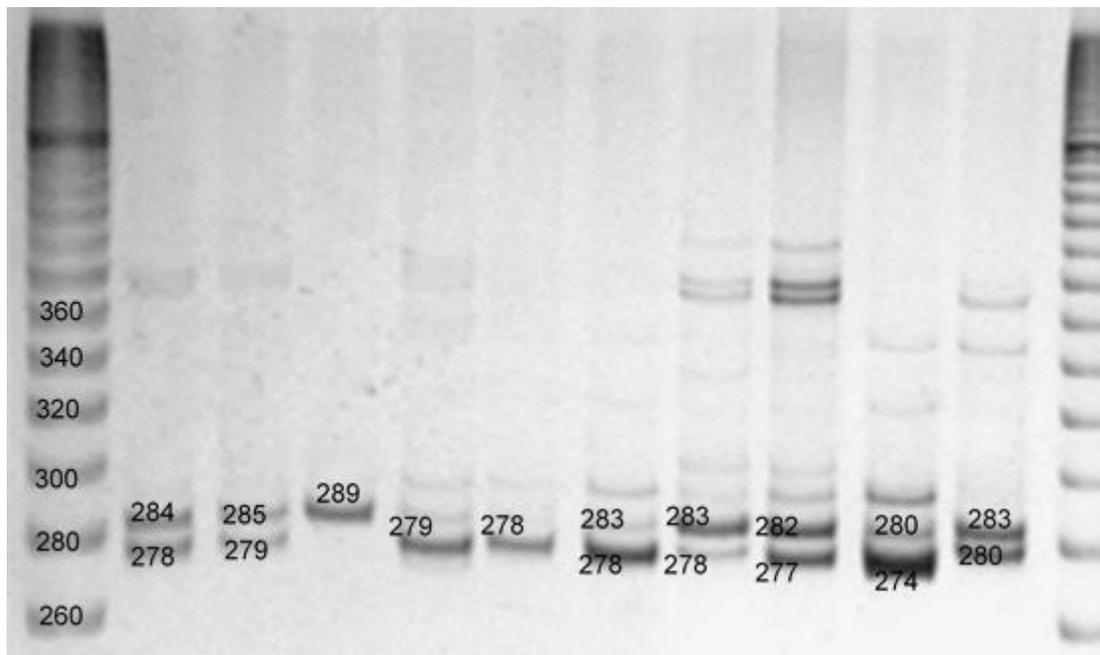
## **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **3.3.1 Extracción de ADN y PCR.**

Se obtuvieron 90 muestras de ADN genómico de buena calidad a partir de las muestras de sangre colectadas, las concentraciones de ADN se llevaron a un volumen final de 25ng/ul para amplificar los loci microsatelites (Cuadro 2).

### 3.3.2 Electroforesis de los SSR.

De las 90 extracciones de ADN correspondientes al número de individuos de los que se tomaron muestras, las cuales fueron sometidas a PCR y posteriormente visualizadas por medio de electroforesis en acrilamida (CIMMYT, 2006), señalaron la presencia de más de un alelo en los cuatro microsatélites, lo que indica que fueron 100% polimórficos (OarFCB128, SRCRSP9, ILSTS5 y ILSTS11).



**Figura 9** Ejemplo de alelos observados para el locus ILSTS11. Primera línea corresponde al marcador de peso molecular, las siguientes a los polimorfismos detectados en 10 individuos de la población 2 que corresponde a Tehuipango

### 3.3.3 Análisis de diversidad y estructura genética.

Desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en algunos de los loci examinados sugirieron apareamientos no aleatorios en las poblaciones de ovinos criollos. Se encontró que solo el locus ILSTS11 está en HWE en las 3 poblaciones, el resto de loci microsatélites se encontraron en HWE solo en una de las tres poblaciones. En este caso, el locus ILSTS5 se encontró en equilibrio para la Población 1 (Astacinga) y el locus OarFCB128 junto con el locus SRCPS9, se encontraron en HWE dentro de la Población 2 (Tehuipango) (Cuadro 3). Como la ley del equilibrio Hardy-Weinberg enuncia que las proporciones genéticas se mantendrán estables dentro de las generaciones solo cuando se cumplen criterios como una población con un número considerable de individuos, con reproducción aleatoria y sin que ninguna fuerza evolutiva actúe sobre ellos (Ortega, 2017), dentro de un estudio de diversidad genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del HWE en los loci utilizados para tener una perspectiva sobre la estabilidad sexual, estructura y dinámica de las poblaciones (Luque, 2014), y entender cómo se está presentando la herencia y variación genética en los individuos (Bjorklund, 2005).

El equilibrio Hardy-Weinberg mostró que las frecuencias de los microsatélites evaluados en las tres poblaciones ovinas, no se han mantenido estables entre generaciones, probablemente debido a que estos animales ovinos provienen de una población con un bajo número de individuos fundadores o a que ha existido escasa reproducción aleatoria. El desequilibrio detectado en los loci pudo ser motivado, en parte, por la necesidad de los productores indígenas de dirigir cruzamientos con sementales con características fenotípicas de valor comercial (Ortega, 2017), o bien, por la selección familiar habitual entre los productores de la

región. Desde esta perspectiva de frecuencias alélicas, es claro que la herencia y variación genética en los ovinos criollos empieza a ser afectada por al menos una de las fuerzas evolutivas, una situación que pone en riesgo a esta variabilidad genética que se ha conjuntado en respuesta a la adaptación a las condiciones de Altas Montañas de la región central de Veracruz, y que bajo términos de supervivencia, resistencia a enfermedades, identidad regional, etc. ha sido fundamental para estos ovinos y sus pro-ductores.

**Cuadro 3** Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci en las poblaciones de Ovinos criollos.

<b>Pop</b>	<b>Locus</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Chi-cuadrada</b>	<b>Probabilidad (p-valor)</b>	<b>Significancia</b>
<b>Pop1</b>	ILSTS11	36	23.833	0.940	ns
<b>Pop1</b>	ILSTS5	66	69.686	0.355	ns
<b>Pop1</b>	SRCRSP9	10	26.071	0.004	**
<b>Pop1</b>	OarFCB128	28	52.308	0.004	**
<b>Pop2</b>	ILSTS11	36	41.382	0.247	ns
<b>Pop2</b>	ILSTS5	66	148.901	0.000	***
<b>Pop2</b>	SRCRSP9	45	56.012	0.126	ns
<b>Pop2</b>	OarFCB128	36	49.965	0.061	ns
<b>Pop3</b>	ILSTS11	36	41.348	0.248	ns
<b>Pop3</b>	ILSTS5	45	68.033	0.015	*
<b>Pop3</b>	SRCRSP9	55	88.053	0.003	**
<b>Pop3</b>	OarFCB128	28	80.500	0.000	***

Ns = No significativo, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

\*Marcadores que no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (p<0,05).

Los cuatro microsatélites (OarFCB128, SRCRSP9, ILSTS5 e ILSTS11) fueron todos polimórficos y codominantes (Figura 9). Se considera un loci polimorfo, cuando éste presenta más de un alelo entre todos los loci analizados dentro de una población (Beretti, 2017). Por lo tanto, de los cuatro microsatélites genotipados, los valores de polimorfismo fueron 0.83, 0.88, 0.84 y 0.85 para ILSTS11, ILSTS5, SRCRSP9 y OarFCB128, respectivamente. Los loci examinados representaron una herramienta que además de discriminar a nivel genético los individuos, fueron útiles para distinguir la pequeña diferenciación poblacional que se detectó. Con ello, el valor informativo de los loci seleccionados podría aplicarse en otras poblaciones ovinas criollas que se desarrollan en sistemas de producción indígena, con la finalidad de establecer un pedigree que ayude a la toma de decisiones en la mejora genética y la conservación del germoplasma animal. Por lo que la selección de estos loci para genotipificar las tres poblaciones de ovinos fue altamente informativa con base en aquello reportado por Botstein *et al.* (1980), quienes enuncian que los loci son altamente informativos cuando sobrepasan valores de  $>0.50$  (Cuadro 4).

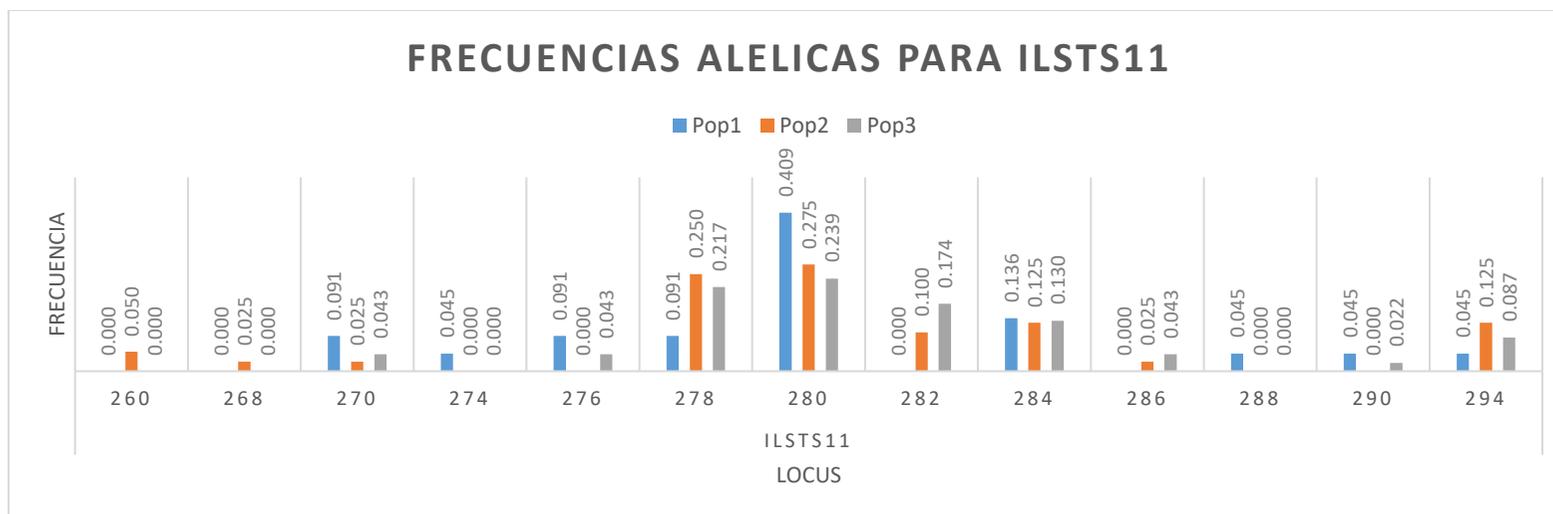
Las frecuencias alélicas y el recuento de alelos por microsatélite dentro de cada población, se presentan en el Cuadro 4. El microsatélite ILSTS11 presentó un total de 15 alelos diferentes dentro de las 3 poblaciones, ILSTS5 presentó un total de 20 alelos SRCRSP9 contabilizó 13 alelos y OarFCB128 registró 12 alelos diferentes. El tamaño mínimo y máximo de los alelos osciló entre 260 pb y 294 pb para ILSTS11, 186 pb y 216 pb para ILSTS5, 108 pb y 130 pb para OarFCB128 y 90 pb

**Cuadro 4.** Frecuencias alélicas de los marcadores microsatélite examinados en tres poblaciones de ovinos criollos de Veracruz, México.

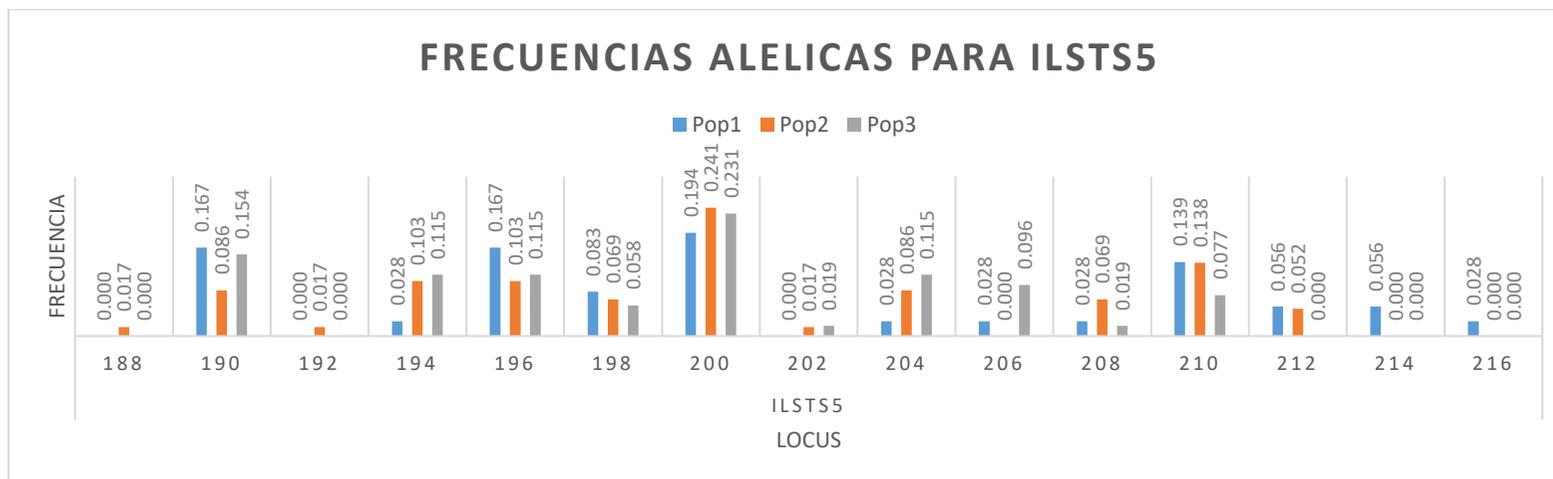
Marcador	Alelo	Pop 1	Pop 2	Pop 3
ILSTS11	260	0.000	0.030	0.000
ILSTS11	268	0.048	0.015	0.028
ILSTS11	270	0.048	0.000	0.028
ILSTS11	274	0.024	0.000	0.000
ILSTS11	276	0.048	0.000	0.056
ILSTS11	278	0.190	0.182	0.167
ILSTS11	279	0.000	0.015	0.000
ILSTS11	280	0.262	0.318	0.222
ILSTS11	282	0.000	0.091	0.125
ILSTS11	284	0.214	0.136	0.167
ILSTS11	286	0.000	0.015	0.056
ILSTS11	288	0.024	0.000	0.000
ILSTS11	289	0.000	0.030	0.000
ILSTS11	290	0.024	0.030	0.014
ILSTS11	294	0.119	0.136	0.083
ILSTS5	186	0.048	0.000	0.000
ILSTS5	188	0.000	0.015	0.000
ILSTS5	190	0.143	0.076	0.111
ILSTS5	192	0.000	0.015	0.000
ILSTS5	193	0.000	0.015	0.000
ILSTS5	194	0.024	0.076	0.069
ILSTS5	195	0.000	0.000	0.014
ILSTS5	196	0.143	0.152	0.083
ILSTS5	198	0.119	0.061	0.042
ILSTS5	200	0.167	0.212	0.208
ILSTS5	214	0.024	0.000	0.000
ILSTS5	202	0.000	0.015	0.000
ILSTS5	204	0.024	0.076	0.083
ILSTS5	206	0.024	0.030	0.069
ILSTS5	208	0.024	0.061	0.014
ILSTS5	210	0.119	0.121	0.056
ILSTS5	212	0.048	0.045	0.000

Marcador	Alelo	Pop 1	Pop 2	Pop 3
ILSTS5	212	0.048	0.045	0.000
ILSTS5	214	0.024	0.000	0.000
ILSTS5	216	0.024	0.000	0.000
OarFCB128	108	0.048	0.015	0.000
OarFCB128	110	0.190	0.227	0.111
OarFCB128	112	0.095	0.152	0.000
OarFCB128	114	0.000	0.030	0.000
OarFCB128	116	0.000	0.045	0.042
OarFCB128	118	0.286	0.121	0.111
OarFCB128	119	0.000	0.000	0.014
OarFCB128	120	0.167	0.182	0.153
OarFCB128	124	0.000	0.000	0.097
OarFCB128	126	0.024	0.000	0.125
OarFCB128	128	0.071	0.045	0.014
OarFCB128	130	0.048	0.015	0.000
SRCRSP9	90	0.262	0.197	0.042
SRCRSP9	92	0.214	0.182	0.194
SRCRSP9	94	0.024	0.015	0.069
SRCRSP9	96	0.190	0.121	0.194
SRCRSP9	98	0.167	0.197	0.250
SRCRSP9	100	0.048	0.076	0.014
SRCRSP9	102	0.000	0.045	0.014
SRCRSP9	104	0.000	0.000	0.042
SRCRSP9	106	0.000	0.030	0.000
SRCRSP9	108	0.000	0.015	0.014
SRCRSP9	110	0.000	0.000	0.014
SRCRSP9	112	0.000	0.000	0.014
SRCRSP9	200	0.000	0.061	0.000

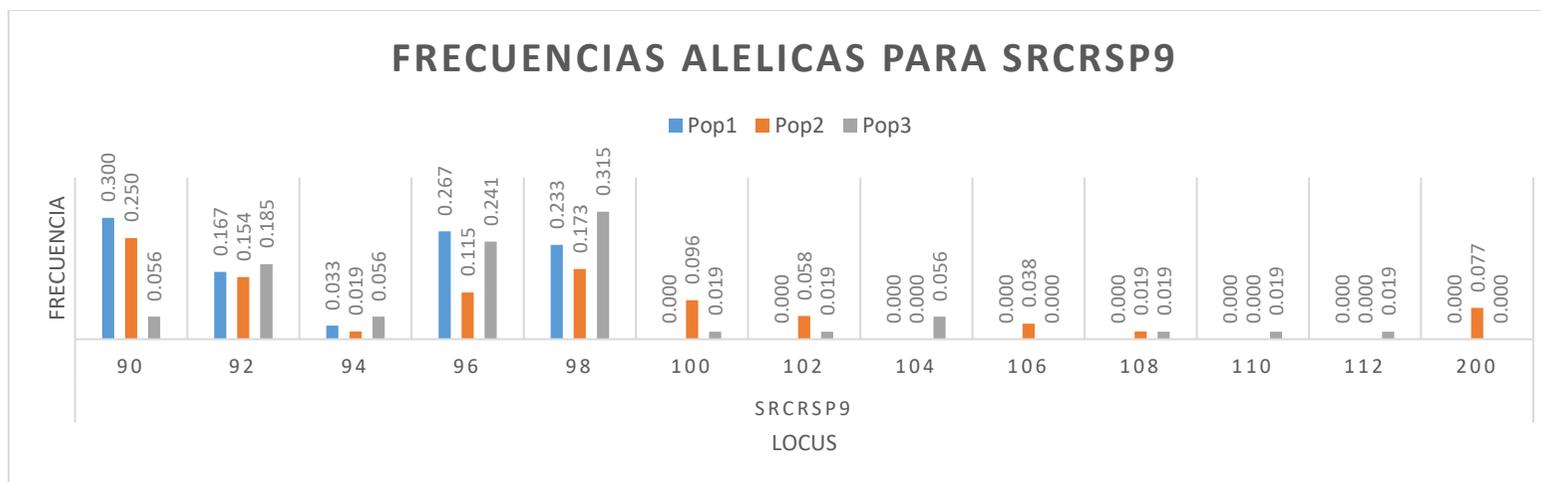
y 200 pb para SRCRSPS9. Estos tamaños e intervalos son similares con lo reportado en otros trabajos de diversidad genética, tales como el realizado por Agaviezor *et al.*, 2012, en una población de ovinos nigerianos, donde OarFCB128 registró valores de 96 a 130 pb. Luna-Gonzalez y colaboradores, en 2012, reportaron alelos de entre 119 y 200 pb, para el microsatélite SRCRSPS9, en un estudio de diversidad genética y paternidad en una población de cabras. Ocampo-Gallego, 2014, reportó tamaños de alelos de entre 262-292 pb para ILSTS11 y un intervalo de 107-133pb para SRCRSPS9, en un estudio de caracterización genética de ovinos en Colombia. Por su parte, Da Silva (2012) en un estudio de caracterización zoométrica y genética de ovinos en Brasil, utilizando los microsatélites ILSTS11, ILSTS5 y SRCRSP9, reportaron tamaños que oscilaron entre 266-288pb, 181-201pb y 99-135pb respectivamente. Por su parte, Ocampo *et al.*, 2017, en un estudio de caracterización genética de ovinos criollos colombianos, también utilizaron los microsatélites ILSTS11, ILSTS5 y SRCRSP9, para los cuales obtuvieron tamaños de alelos entre los rangos de 262-292 pb, 176-214 pb y 107-133 pb, respectivamente. Hussain y colaboradores, en el 2019, realizaron un estudio de diversidad genética molecular y relación de razas indígenas de ovinos criollos de Pakistán por medio loci de microsatélites, dentro de los marcadores seleccionados se encontraban ILSTS11 y OarFCB128 para los cuales reportaron un tamaño de alelos que oscilaba entre 300-382pb y 106-136pb, respectivamente.



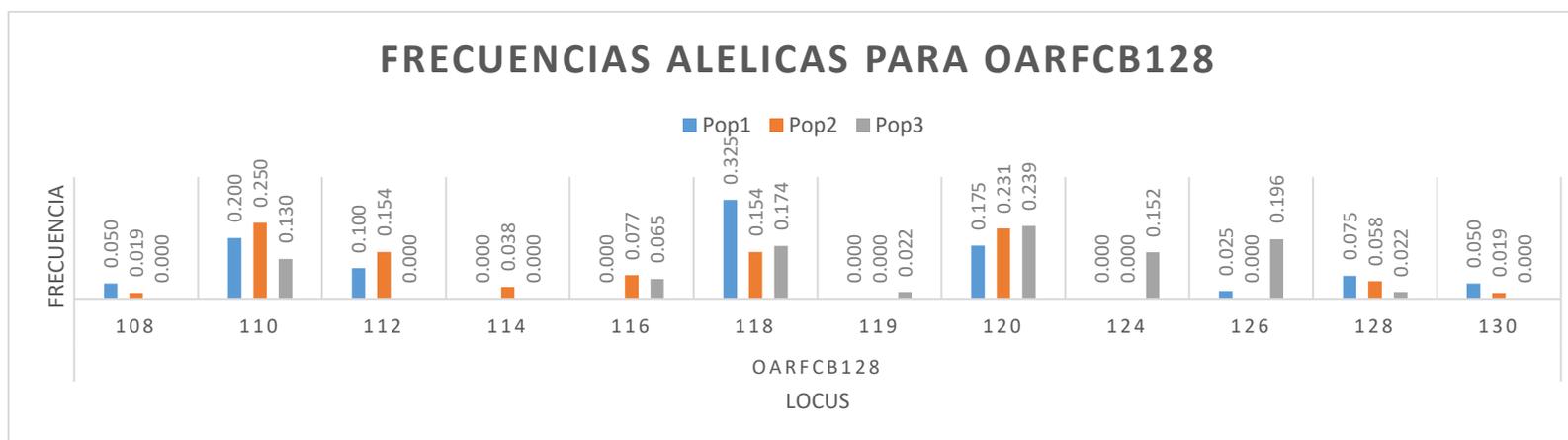
**Figura 10** Frecuencias alélicas del locus ILSTS11 dentro de las 3 poblaciones.



**Figura 11** Frecuencias alélicas del locus ILSTS5 dentro de las 3 poblaciones.



**Figura 12** Frecuencias alélicas del locus SRCRSP9 dentro de las 3 poblaciones.



**Figura 13** Frecuencias alélicas del locus OasFCB128 dentro de las 3 poblaciones.

Los estudios de diversidad genética son esenciales para la conservación de especies ya que la diversidad garantiza su supervivencia. Dentro de los programas de mejoramiento genético, la diversidad genética es la base para el éxito dentro de las poblaciones sometidas a mejoramiento (Zhang *et al.*, 2009).

En el Cuadro 4 se presentan los estadísticos de diversidad genética revisados para las 3 poblaciones de ovinos criollos. Dentro del cuadro se presentan el marcador, la frecuencia del alelo más común dentro de las poblaciones, el número de genotipos, el tamaño de muestra, el número de alelos observados, la diversidad genética, la heterocigosidad y el contenido de información polimórfica (PIC).

El alelo con mayor frecuencia para ILSTS11 tuvo un valor de 0.27 y corresponde al alelo con tamaño de 280 pb. Para el caso de ILSTS5, la mayor frecuencia la presentó el alelo de 200 pb con un valor de 0.2: Para OarFCB128, el alelo con mayor frecuencia fue el de 110 pb con un valor de 0.17, y para el caso del marcador SRCRSP9, la mayor frecuencia la presentó el alelo con tamaño de 98 pb con un valor de 0.21.

El número de alelos observados por locus tuvo valores de 16 (ILSTS11), 20 (ILSTS5), 14 (SRCRSP9) y 15 (OarFCB128), donde el promedio de alelos por población tuvo un valor de 16.25. Dichos resultados son superiores a los resultados reportados por Ocampo *et al.*, 2017, quienes en un estudio de caracterización de ovinos criollos colombianos reportaron 11 alelos diferentes para ILSTS11, 12 alelos para ILSTS5 y 12 alelos para OarFCB128. Los valores de diversidad del presente trabajo se encuentran por encima también de los resultados reportados por Hussain *et al.*, 2019, quienes identificaron apenas 2 alelos para el locus OarFCB128 y 4 alelos para ILSTS11 en dos poblaciones diferentes de ovinos criollos. Ocampo *et al.*, 2014, reportó la presencia de 14 alelos diferentes para ILSTS11, 16 alelos ILSTS5 y un total de 10 alelos diferentes para SRCRSP9. Otro estudio sobre el que se comparó la

diferencia superior sobre los alelos obtenidos fue con respecto al estudio realizado por Muhammad *et al.*, 2017, acerca del polimorfismo genético y análisis de cuellos de botella en ovinos, donde también utilizaron los mismos 4 marcadores microsatélites en una población de ovinos de Balkhi. En este caso, para los marcadores ILSTS11 e ILSTS5, reportaron la presencia de únicamente 2 alelos diferentes, 3 alelos para el marcador SRCRSP9 y 4 alelos diferentes para el marcador OarFCB128. Santos-Silva, (2008) en una evaluación de la diversidad y diferenciación genética en razas de ovinos portugueses de lana gruesa realizada con marcadores microsatélites, incluyó a los marcadores ILSTS5 e ILSTS11 para los cuales encontró 8 alelos. Por lo tanto, el número de alelos encontrado en este estudio, sugieren que los ovinos criollos de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa tienen una alta diversidad alélica, quizás debida al flujo constante de ejemplares entre los rebaños.

En el caso de la heterocigosidad, la cual es considerada uno de los parámetros que mejor representan la variabilidad dentro de una población (Kim *et al.*, 2002), ésta fue de 0.60 (ILSTS11), 0.81(ILSTS5), 0.76 (SRCRSP9) y 0.77 (OarFCB128), con un promedio de 0.73. Vega-Hernández y Gutiérrez-Velázquez (2015) indican que la heterocigosidad de los individuos está asociada a un mejor desempeño y adaptabilidad por parte de los individuos de las poblaciones. En este contexto, Brommer *et al.* (2015) establecen que cuando los individuos cuentan con una baja heterocigosidad, estos tienen menores aptitudes y probabilidades de sobrevivir en un medio dado y dejar descendencia, por lo que el valor de este parámetro es usado como indicador de la endogamia dentro y entre poblaciones. En este sentido, el grado de heterocigosis de los animales ovinos evaluados en este estudio sugieren que para una finalidad de aprovechamiento, la heterocigosidad poblacional podría moverse de

una manera dirigida a condiciones bioculturales de manejo de sistemas de mayor rendimiento.

**Cuadro 4** Estadísticos de diversidad genética de tres poblaciones de ovinos criollos de las Altas Montañas de Veracruz, México (n=90).

Marcador	Frecuencia del alelo más común	No. De Genotipos	No. De alelos	He	Ho	PIC
ILSTS11	0.27	34	16	0.85	0.60	0.83
ILSTS5	0.20	33	20	0.89	0.81	0.88
SRCRSP9	0.21	29	14	0.85	0.76	0.84
OarFCB128	0.17	21	15	0.86	0.77	0.85
Promedio	0.22	29.25	16.25	0.86	0.73	0.85

El grado de diferenciación genética (FST), fue de 0.025 (ILSTS11), 0.011(ILSTS5), 0.029 (SRCRSP9) y 0.034 (OarFCB128), lo cual reveló que los ovinos de las altas montañas del centro de Veracruz tienen una diferenciación genética baja que sugiere cambios mínimos en la estructura genética de la población (Cuadro 6). Por otra parte, el coeficiente de endo-gamia (FIS) para cada locus fue negativo: -0.234 (ILSTS11), -0.150 (ILSTS5), -0.248 (SRCRSP9) y -0.221 (OarFCB128), lo cual indica una mayor incidencia de apareamientos no aleatorios entre individuos emparentados.

Estos resultados difieren de aquellos reportados por Ocampo *et al.* 2014, quienes, en un estudio de caracterización genética de ovinos en Colombia, reportaron valores para FIS superiores a 0, lo que señaló un déficit de heterocigotos, atribuido principalmente a que las razas pudieran estar en endogamia o bien sometidas a selección para adquirir ciertas características. Las poblaciones de ovinos estudiadas por Muhammad *et al.*, 2017, reportaron también valores también superiores a 0 atribuidos a deficiencia de heterocigosidad y variación genética, resultado de la

tendencia reproductiva de estas poblaciones. Por consiguiente, el porcentaje de endogamia total (FIT) para cada locus examinado en los ovinos criollos de las Altas Montañas de Veracruz, México, fue de -0.203 (ILSTS11), -0.077 (ILSTS5), -0.139 (SRCRSP9) y -0.111 (OarFCB128,) (Cuadro 6).

**Cuadro 5** Estadísticos F de los loci examinados en poblaciones de ovinos criollos de Veracruz, México.

<b>Locus</b>	<b>Fis</b>	<b>Fit</b>	<b>Fst</b>
<b>ILSTS11</b>	-0.234	-0.203	0.025
<b>ILSTS5</b>	-0.150	-0.137	0.011
<b>SRCRSP9</b>	-0.248	-0.212	0.029
<b>OarFCB128</b>	-0.221	-0.18	0.034
<b>Promedio</b>	-0.213	-0.183	0.025

Las distancias genéticas de Nei o similitud de poblaciones considera cambios en las frecuencias alélicas derivados tanto de mutaciones como de efectos de deriva genética, por lo que es un parámetro adecuado para estudios filogenéticos.

En este estudio, el dendrograma mostró que las distancias genéticas de Nei oscilaron entre 0.062 y 0.089, donde se identificaron dos grupos con características genéticas similares (27%). El primero agrupa a la Población 1 (Astacinga) y a la Población 2 (Tehuipan-go), lo cual señala que estas poblaciones presentaron un alto grado de similitud genética, el segundo grupo representado por la Población 3 (Tlaquilpa), se diferenció genéticamente de población 1 y 2(Figura 14).

Las distancias genéticas también muestran la diversidad y distribución de cada una de las variantes del ADN, en tal situación, cuando se encuentran distribuidas homogéneamente en un área geográfica determinada, se consideran como una población continua en la que el flujo genético a través de la migración no tiene barreras; en caso contrario, cuando son heterogéneas o en parches, dan lugar a subpoblaciones, las cuales pueden empezar a diferenciarse entre ellas. Este proceso

ocurre de forma lenta y gradual, particularmente cuando el número de variantes génicas presentes en la población original es muy grande, pero cuando las variantes son pocas, la diferenciación se acelera notablemente (Camarena *et al.*, 2014). Vázquez (2014), afirma que cuando los miembros de una población tienen un acervo genético amplio, con suficientes alelos pre-adaptados y éstos ocupan nuevos espacios, la fuerza selectiva del nuevo ambiente favorecerá la formación de grupos locales con cierto grado de diferenciación dando lugar a subpoblaciones, si éstas conservan la capacidad de reproducirse, darán lugar a aquello que se conoce como razas o subespecies.

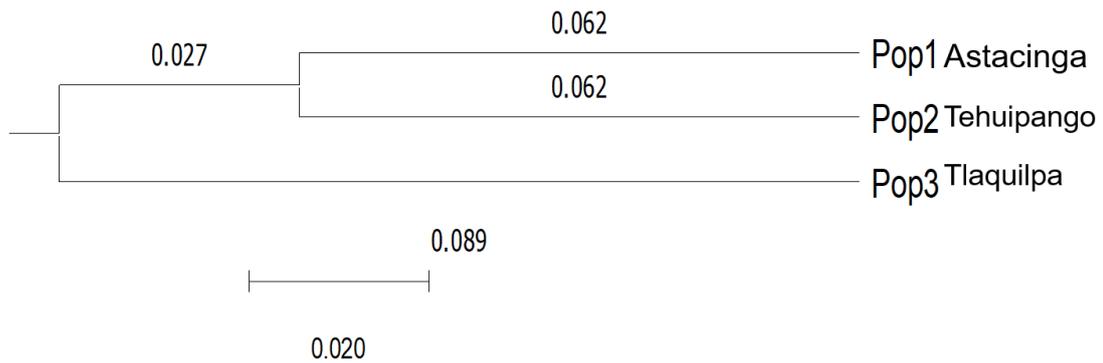
El grado de diferenciación genética obtenido por el índice  $F_{ST}$  (Cuadro 6), va de 0.025 (ILSTS11), 0.011 (ILSTS5), 0.029 (SRCRSP9) y 0.034 (OarFCB128), revelando una diferenciación genética baja y sugiere cambios mínimos en la estructura genética de la población (Hernández, 2010). El coeficiente de endogamia (FIS) obtenido en la población por cada locus fueron bajos: -0.234 (ILSTS11), -0.150 (ILSTS5), -0.248 (SRCRSP9) y -0.221 (OarFCB128), de hecho, los valores obtenidos sugieren que hay un exceso de heterocigotos para los loci. Resultados que difieren de los reportados por Ocampo *et al.* 2014, quienes, en un estudio de caracterización genética de ovinos en Colombia, reportaron valores para FIS superiores a 0, lo que indicaba un déficit de heterocigotos, esto atribuido principalmente a que las razas pudieran estar en endogamia o bien sometidas a selección para adquirir ciertas características. Las poblaciones de ovinos reportadas por Muhammad *et al.*, 2017, reportan también valores también superiores a 0 y lo atribuyen a deficiencia de heterocigosidad y variación genética, resultado de la tendencia reproductiva de estas poblaciones. El

porcentaje de endogamia total para cada locus va de -0.203 (ILSTS11), -0.077 (ILSTS5), -0.139 (SRCRSP9) y -0.111 (OarFCB128), (Cuadro 6).

La matriz de distancias genéticas de Nei o matriz de similitud de poblaciones (Figura 14) considera cambios en las frecuencias alélicas derivados tanto de mutaciones como de efectos de deriva genética la cual es adecuada para estudios filogenéticos. La distancia genética de Nei oscilo entre 0.062 y 0.089, se indetificaron dos cluster, el primero corresponde a la población 1 (Astacinga) y a la Poblacion 2 (Tehuipango), sugiriendo que estas poblaciones tienen un alto grado de similitud, el segundo cluster esta conformado solo por la población 3 (Tlaquilpa). La distancia genética entre las poblaciones muestra que están muy cerca una de la otra. La similitud entre las poblaciones puede ser atribuida a que, al estar en regiones muy cercanas, se posibilita el cucre entre ellas. La matriz de distancias genéticas muestra que la diversidad y distribución de cada una de las variantes del ADN, cuando se encuentran distribuidas homogéneamente en un área geográfica determinada, se consideran como una población continua en la que el flujo genético a través de la migración no tiene barreras; en caso contrario, cuando son heterogéneas o en parches, dan lugar a subpoblaciones, empezando a diferenciarse entre ellas. Este proceso ocurre de forma lenta y gradual cuando el número de variantes génicas presentes en la población original es muy grande, pero cuando las variantes son pocas, la diferenciación se acelera notablemente (Camarena *et al.*, 2014).

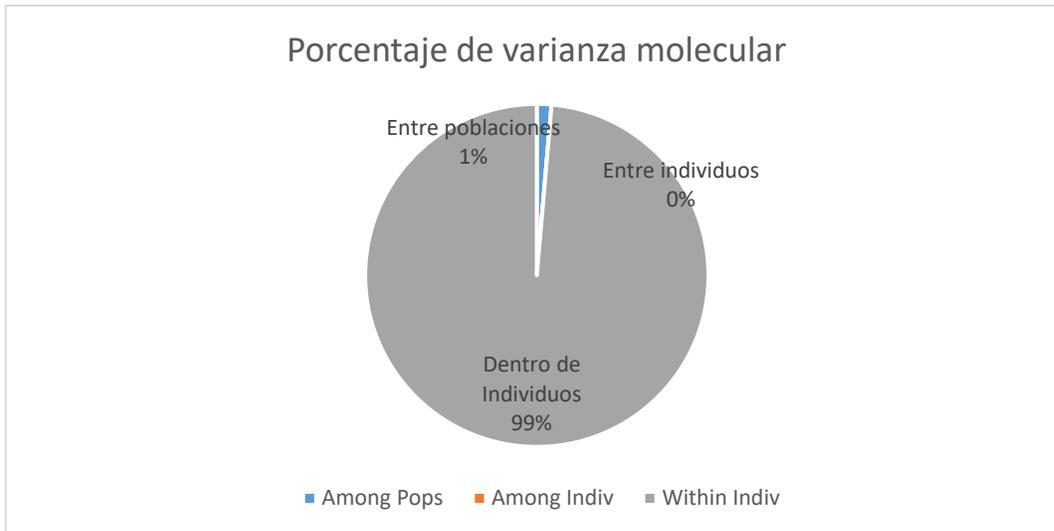
Vázquez (2014), afirma que cuando los miembros de una población que tienen un acervo genético con suficientes alelos pre-adaptados y estos ocupan nuevos espacios, la fuerza selectiva del nuevo ambiente favorece la formación de grupos locales con cierto grado de diferenciación, pero que conservan la capacidad de reproducirse, a esas supoblaciones se les conoce como razas o subespecies.

Frankham (2005), establece que en ocasiones los planes de manejo ayudan en el aumento de variabilidad genética en poblaciones pequeñas.



**Figura 14** Agrupamiento de tres poblaciones de ovinos criollos de las Altas Montañas de Veracruz, México revelado por cuatro marcadores microsatélite. Las distancias genéticas estándar de Nei se encuentran anotadas en cada rama.

Finalmente, el AMOVA corroboró la convergencia de las poblaciones e indicó que la mayor variación genética fue aportada por los individuos de la población (99%), y que hubo una casi nula variación entre las diferentes poblaciones (1%) (Figura 15). Al respecto, Dashab *et al.*, 2011 reportaron en dos subpoblaciones de ovinos que el 2.4% de la variación total fue interpoblacional y el 97,6% estuvo relacionada con la variación intrapoblacional.



**Figura 15** Partición de la diversidad genética entre individuos, dentro de individuos y entre poblaciones de Ovinos criollos mediante microsatélites

### **3.4 CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados, las tres poblaciones de ovinos criollos de las Altas Montañas de Veracruz, México, portan una alta diversidad genética calificada con base en la genotipificación de cuatro marcadores microsatélite. La diferenciación genética entre las poblaciones es baja y con exceso de genotipos heterocigóticos, muy probablemente debido a la cercanía geográfica o quizás a las prácticas de crianza. Con este estudio se tiene un panorama con respecto a la diversidad y estructura genética de los ovinos criollos de la región de las Altas Montañas, panorama que podría ayudar al diseño de planes de protección y aprovechamiento de los ovinos criollos.

### **3.5 LITERATURA CITADA.**

- Agaviezor, B.O., Peters, S.O., Adefenwa, M.A. 2017. Diversidad de ADN morfológico y microsatélite de ovejas indígenas nigerianas. *J Animal Sci Biotechnol* 3, 38. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-38>
- Botstein D., White I.; Skolmick H., Davis W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Burgos-Paz, W., Rosero-Galindo, C., Cárdenas-Henao, H., ySolarte-Portilla. C. 2007. Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® para la especie *Cavia porcellus* Lin (Rodentia: Caviidae). *Revista colombiana de ciencias pecuarias* Vol. 20:1

- CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio; laboratorio de genética molecular aplicada. CIMMYT. 3ra ed. México, D.F. 93 p.
- Da Silva R.C. 2012. Caracterização zoométrica e genética de ovinos morada nova. Tesis Doctoral. Universidade Federal Da Paraíba. Universidade Federal Rural De Pernambuco. Universidade Federal Do Ceará.
- Dashab G.R., Aslaminejad A., Nassiri M., Esmailizadeh A.K. y Saghi D.A. 2011. Análisis de la diversidad genética y estructura de la oveja baluchi mediante marcadores microsatélites. Agroecosistemas tropicales y subtropicales 14 (3), 1047-1054. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-04622011000300026&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000300026&lng=es&tlng=en).
- Espinosa-García J.A., Quiroz-Valiente J., Moctezuma-López G., Oliva-Hernández J. Granados-Zurita L. y Berumen-Alatorre A.C. 2015. Prospección tecnológica y estrategias de innovación para producción ovina en Tabasco, México. Revista Científica, FCV-LUZ. 15(2):107 – 115.
- FAO. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines, Rome.
- Herrera J., Jordán H. y Senra A.F. 2010. Aspectos del manejo y alimentación de la reproductora ovina Pelibuey en Cuba. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 44(3):
- Hussain T., Musthafa M.M., Babar M.E., Shaheen M. y Marikar F.M. 2019. Molecular genetic diversity and relationship of indigenous sheep breeds of Pakistan based on nuclear microsatellite loci. Molecular genetic diversity in sheep. Rev. Vet. 30: 1, 54-58, 211-219 pp.

- Liu K. y Muse S. 2005. PowerMaker: An integrated analysis environment for genetic maker analysis. *Bioinformatics* (Oxford, England). 21. 2128-9. [10.1093/bioinformatics/bti282](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282).
- Luna-González, A, Hernández-Arteaga, S, Sánchez-Garza, M, López-Revilla, R, Medina-Esparza, L, y Cruz-Vázquez, C. 2012. Microsatellite loci and paternity analysis in Nubia and Boer goats. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(2), 123-127. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2012000200005>
- Luque V. 2014. Leyes y modelos en la explicación biológica. *Ludus Vitalis*, 13(42) pp. 91-101
- Mariscal J. C. y Mathez-Stiefel, S. L. 2010. Fortaleciendo la soberanía alimentaria mediante la revalorización de saberes ecológicos locales: experiencia en los Andes bolivianos. *Etnobiología*, 8(1), 75-89.
- Muhammad I., Sohail A., Irfan D., Iqbal S., Munir A., Swati I. y Ahmad Z. 2017. Genetic Polymorphism and Bottleneck Analysis of Balkhi, Hashtnagri, and Michni Sheep Populations Using Microsatellite Markers. *Animal Biotechnology*, (), 1–11. [doi:10.1080/10495398.2017.1366340](https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1366340)
- Ocampo-Gallego R.J. 2014. Caracterización genética de Ovinos en Colombia por medio de Marcadores Microsatelites. Tesis Maestría. Universidad de Antioquia.
- Ocampo R.J., Martínez R.A., Zoo, Rocha J.F. y Cardona H. 2017. Genetic characterization of Colombian indigenous sheep. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. (30):116-125

- Ortega M. J. 2017. Introducción al Mejoramiento Genético. Notas De Campus, (1).  
Recuperado a partir de  
<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/notas/article/view/1809>
- Peakall R. Smouse P.E., 2006. GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2006. DarWin software. <http://darwin.cirad.fr/>.  
In., 6.0.010 edn
- Rimieri, P. (2017). La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 28(2), 7-13.
- Sanguinetti C, Dias J, Neto E, Simpson AJ. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 914–921.
- Santos-Silva F., Ivo R.S., Sousa M.C.O., Carolino M.I., Ginja C. y Gama L.T. 2008. Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers., 78(1-3), 32–40.  
doi:10.1016/j.smallrumres.2008.04.006
- Zhang, X.Y., Zhou, M.L., Zhang, X.H., Wu, D.J. 2009. Study on population genetic structure of Liangshan semi-wool sheep using microsatellite markers. *Pakistan Journal of Biology Science*. 11:2423-2427

## **CAPITULO 4. ORIGEN ANCESTRAL DE OVINOS CRIOLLOS DE LA REGIÓN DE LAS ALTAS MONTAÑAS.**

### **4.1 INTRODUCCIÓN.**

En México, la ganadería comenzó con la introducción del ganado bovino, seguida de la introducción de algunas razas ovinas por parte de los españoles (Saucedo 1987). Las razas de ovinos que se introdujeron en México durante la época de la colonización española fueron las razas: Manchega, Lacha, Churra, Merino española, Castellana y Raza Aragonesa. A los individuos que descienden de los animales que trajeron los españoles durante los siglos XV al XVII se les define como “ovinos criollos” (Gayosso-Vázquez y Morales 2009).

Posteriormente, en una época más actual, específicamente en los años treinta, ciertos programas gubernamentales comenzaron con la introducción de nuevas razas europeas modernas. La mayoría de la llegada de estos ovinos, ha sido por medio de machos y sin seguir un sistema definido de cruza, quedando animales con una composición genética en diverso grado de absorción, y en otros casos, la composición multirracial no se encuentra definida (Segura y Montes 2001; Ulloa-Arvizu *et al.*, 2009).

En el centro de México se pueden encontrar rebaños encastados con Suffolk o Hampshire, que originalmente estaban compuestos por animales “criollos” (Ulloa-Arvizu *et al.*, 2009). Cada raza ganadera es resultado de siglos de evolución de especies y sus gestores en un medio natural, maximizan la eficiencia y adaptación al medio y a la sociedad (San y Ayanz, 2015).

En las últimas décadas, las ovejas criollas han experimentado una fuerte diversificación debido a mutaciones, adaptaciones a ambientes locales y selección debido a múltiples propósitos dirigidos a satisfacer diversas necesidades humanas (Aguilar-Martínez *et al.*, 2017).

El origen de las ovejas domesticas (*Ovis aries*) datan de la descendencia del muflón asiático y se domesticaron en el cercano oriente, distribuyéndose hasta el oeste de África, lugar donde se cree, es origen de los ancestros de la oveja Pelibuey, aunque no se cuenta con un registro claro de si estos animales provenían del Oeste Africano o de las Islas Canarias (Aguilar-Martínez *et al.*, 2017).

Trabajos recientes han demostrado la eficiente identificación del ancestro de las *Ovis aries*, y la pertenencia de estas, a especies salvajes encontradas en la región de la Creciente Fértil (*Ovis orientalis*). Las especies domesticas se encuentran en al menos 4 linajes genéticos distinguibles, conocidos como “haplotipos” (Zeder, 2008). Sin embargo, no se tiene registro claro del ingreso de estas ovejas a México, pero se considera fueron introducidas entre 1930 y 1940 durante el periodo de la conquista, aunque algunos autores remarcan la ya existencia del ovino en la región (Aguilar-Martínez *et al.*, 2017).

Con base a lo anterior, podemos aseverar que los ovinos, al igual que otros animales domésticos, no son nativos de México ni del continente Americano, puesto que llegaron desde la península Ibérica; primero en calidad de alimento y luego como pie de cría, constituyendo la base racial del ganado lanar en América (Vivas *et al.*, 2020).

En este contexto, es de gran importancia estudiar el linaje materno para conocer sobre la evolución, la filogenia y la diversidad genética dentro y entre diferentes

razas de ganado (Bravo, 2019). El ADNmt es el más utilizado en la realización de estudios de filogenia y filogeografía. La Filogenia estudia las relaciones de afinidad y parentesco de los animales, tratando de explicar, en lo posible, el origen y la historia evolutiva de los taxones (Tinaut y Ruano, 2002).

Para poder determinar el correcto origen de los Ovinos Criollos de México, es necesaria la implementación de técnicas moleculares, puesto que con ellas es posible identificar con mayor exactitud los orígenes de dichos ovinos. El objetivo de este trabajo es identificar el origen ancestral a través del análisis de la región D-loop del ADN mitocondrial de razas criollas de ovinos de la región de las Altas Montañas, Veracruz, específicamente en los municipios de Astacinga, Tehuipango y Tlaquilpa.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.2.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR de la región D-loop.**

El ADN de las muestras de sangre de 90 individuos fue extraído usando el kit Wizard® Genomic DNA Purification, con algunas modificaciones. Los pasos y la adecuación de la extracción de ADN se presentan en el Anexo 1.

Una vez realizada la extracción de ADN se realizó la amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de los primers DL para la región D-loop, los cuales se encuentran detallados en el cuadro 7. Las PCR's se realizaron siguiendo los cuidados para evitar contaminación, manejo adecuado y uso eficiente de reactivos (Espinoza, 2007).

**Cuadro 6** Primers utilizados para la amplificación de la región D-loop (Lopez-Oceja, 2016).

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
<b>DL-F</b>	5'- <u>GCC TCT CCA GTA TTA AAC TTG CTA</u> -3'
<b>DL-R</b>	5'- <u>AAG ACA GAC ATA AGA TAT GTT GGG T</u> -3'

Los primers para la región D-loop se genotiparon mediante PCR a un volumen total de 20 µl con el siguiente contenido: 4 µl de ADN, 4 µl de 5x Buffer para PCR, 1.06 µl del primer Forward y 1.06 µl de primer Reverse, 7.33 µl de agua grado biología molecular, 1.2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1.3 µl de dNTPs y 0.13 µl de Taq polimerasa. El programa de amplificación de PCR incluyó las siguientes etapas, desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 60 s, 58°C por 60 s, 72°C por 60 s; 72°C por 5 min y una extensión final de 10°C hasta retirar las muestras. Los productos obtenidos a partir de las reacciones de PCR, se limpiaron mediante el método de columnas Sephadex (Saavedra-Rodríguez *et al.*, 2004) y se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen (Corea) para la secuenciación de los fragmentos obtenidos de las muestras colectadas. En MacroGen se utiliza la técnica de Sanger, la tecnología capilar y el secuenciador Applied Biosystems 3730XLs para la secuenciación simple de nucleótidos ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

## **4.2.2 Análisis estadísticos.**

### **4.2.2.1 Análisis y alineamiento de las secuencias.**

Después de obtener las secuencias se procedió a realizar su visualización, se compararán con secuencias conocidas género Ovis obtenidas en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information) y se editarán en Bioedit y en Sequencher (Nishimura, 2000; Marmi *et al.*, 2007) GeneCodes (para observar la calidad de las secuencias y posibles sitios polimórficos, que permita reconocer los diferentes haplotipos presentes en el conjunto de las poblaciones estudiadas. Posteriormente se realizó el alineamiento de las secuencias.

Las secuencias se alinearon en una matriz, con el algoritmo Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en el programa MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016) con el propósito de homogenizar la longitud de las secuencias. Una vez teniendo las secuencias alineadas, con el mismo software se estimó, la composición nucleotídica en % de cada una de las bases en las secuencias y la frecuencia de cada par de nucleótidos: (ii) pares idénticos, (si) pares transicionales, (sv) pares transversos, y la tasa de transversión y transición (R).

Se realizó una matriz de modelo de sustitución nucleotídica para conocer qué modelo se ajusta a los datos de las secuencias de los ovinos con la función “Find best DNA/Protein Models”, bajo el coeficiente del Criterio de Información Bayesiana (BIC), con valor promedio del Criterio de Información Akaike (AICc) y mayor valor del parámetro de Maximum Likelihood (lnL) (Nei y Kumar, 2000). También, se realizó una matriz de distancias genética por parejas, la cual se calculará utilizando el modelo que mejor se ajuste. Estos modelos se realizarán utilizando el software MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016).

#### **4.2.2.2 Elaboración de árboles filogenéticos**

De acuerdo con la matriz de distancias génicas creado en el programa MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2016), se realizó un árbol filogenético, utilizando el método de reconstrucción basados en matrices de distancias genéticas, con el criterio del proceso evolutivo conocido como Máxima verosimilitud (Kimura, 1980).

En el mismo programa, se utilizó el filograma más parsimonioso con Máxima Parsimonia (MP), para el análisis de diferencias entre poblaciones, que se basa en identificar entre todos los árboles, el que requiere el menor número de cambios evolutivos (mínimo número de sustituciones). El árbol se obtendrá utilizando el algoritmo de agrupamiento Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (Nei y Kumar, 2000). Para evaluar otro modelo de relaciones entre secuencias, se construyó una red de haplotipos, para determinar el número de haplotipos diferentes y la frecuencia de estos en las poblaciones estudiadas. Las relaciones genealógicas de los haplotipos se presentarán utilizando el método de Median-Joining, que será implementado en el programa Network©v.5 (Fluxus Technology Ltd, 1999-2016), que permite deducir los pasos mutacionales entre haplotipos en base a la tipología de una red o árbol de haplotipos. Una red es una alternativa heurística para inferir eventos filogeográficos, donde se trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos (alelos en poblaciones), las cuales se componen de nodos y conexiones que los unen, los nodos representan las secuencias analizadas o vectores medios y las conexiones las diferencias mutacionales entre los nodos.

### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### **4.3.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR de la región D-loop.**

Se obtuvieron 90 muestras de ADN a partir de las muestras de sangre colectadas, las concentraciones de ADN se llevaron a un volumen final de 25ng/ul para amplificar los primers de la región D-loop (Cuadro 7).

#### **4.3.2 Analisis y alineamiento de secuencias.**

Las secuencias obtenidas para la region D-loop del ADN mitocondrial a partir de las muestras de ovinos criollos, se compararon con las bases de datos públicas de secuencias nucleotídicas utilizando el algoritmo BLAST. Esto permitió determinar su identidad con los haplotipos ovinos previamente reportados para el D-Loop mitocondrial (Anexo 2). Las secuencias presentaron un porcentaje de identidad del 100%, a pesar de que el tamaño de las secuencias oscilaba en fragmentos pequeños de entre 120 y 150 pb.

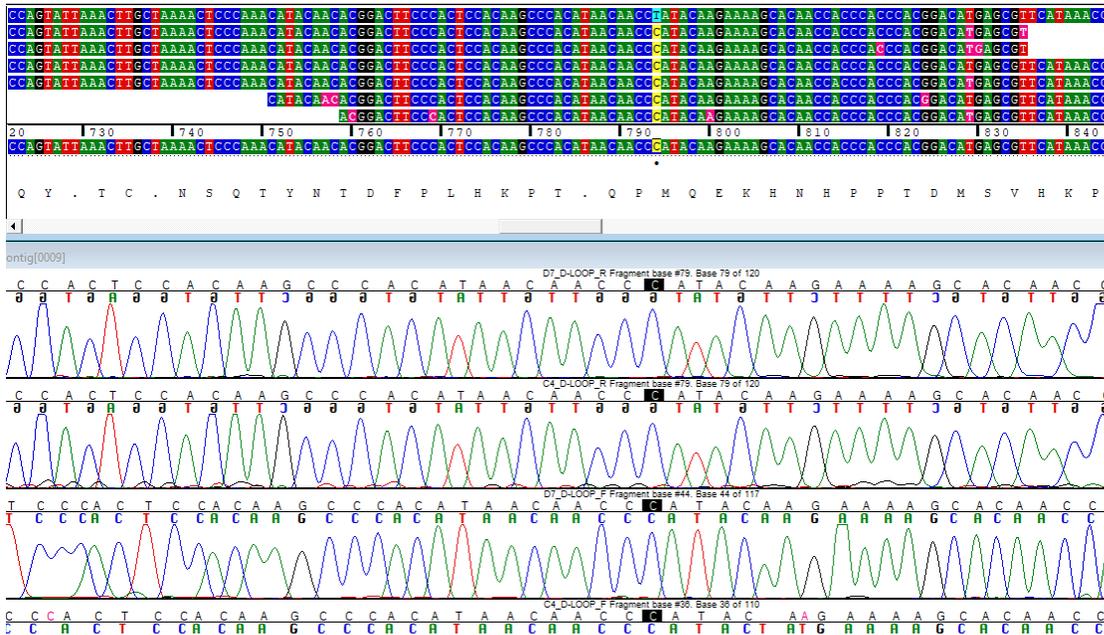
Una de las secuencias que se uso como referencia fue la secuencia de la Raza Aragonesa (L.29055.1), para realizar el alineamiento y edición de las muestras de ovinos criollos empleando el programa Sequencher (Nishimura D. 2000) (Figura 16) y el programa MEGA (Figura 17). Con base a estos alineamientos se pudo reconocer un solo sitio variable, situado en la pocisión numero 794 (Figura 16). En base al alineamiento realizado en MEGA, se pudieron detectar los sitios conservados (Figura 18), sitios variables (Figura 19), sitios parsimoniosos, donde no se logro detectar ningún sitio informativo para parsimonia (Figura 20) y sitios singleton (Figura 21). El único sitio variable, se reconoce como una mutacion en la pocosion numero 2, y al encontrarse dentro de una región codificante, esta

provocando un cambio en el marco de lectura (Figura 22), cambiando de aminoácidos, obteniendo una Prolina (P), en lugar de de Leucina (L). Dentro de los mamíferos la sustitución de los nucleótidos es rápida, se considera se sustituye un promedio de un par de nucleótidos dentro de una población cada dos años (Kimura, 1968).

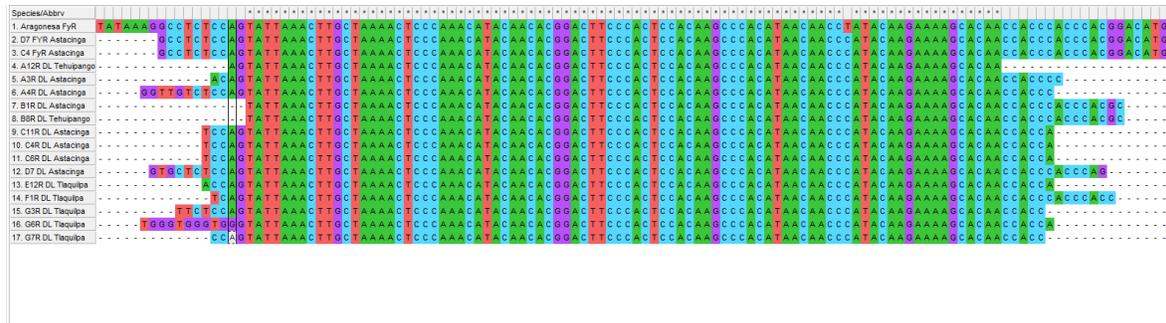
#### **4.3.3 Elaboración de árboles filogenéticos**

Al no contar con más de un sitio variable dentro de las secuencias de ovinos criollos, no es posible continuar con el análisis filogenético, puesto que, los análisis de parsimonia, requieren además de sitios polimórficos, sitios informativos: caracteres que favorezcan la construcción del árbol filogenético (Eguiarte *et al.*, 1997). Sin embargo, en un trabajo realizado por Arvizua *et al.*, 2019, estimaron el origen de una población de ovinos criollos pertenecientes al estado de Chiapas, por medio de la región Citocromo C Oxidasa del ADN mitocondrial con la técnica de PCR-RFLP, y gracias a este trabajo se determinó que las poblaciones ovinas criollas bajo estudio tenían una descendencia de origen Europeo y sugirieron la implementación de un estudio utilizando la región D-loop del ADN mitocondrial para lograr un mayor entendimiento de los orígenes de estos ovinos.

La región D-loop del ADN mitocondrial ha sido utilizada para realizar análisis filogenéticos en ganado ovino criollo mexicano, tal como en el trabajo realizado por Alonso *et al.* 2017, quienes colectaron muestras de sangre de ovinos criollos en los estados de Veracruz, México y Chiapas y compararon sus secuencias con secuencias de razas Europeas reportadas, dentro de las razas que utilizaron destacan la Raza Aragonesa, Raza Churra y la Merino Española.



**Figura 16** Analisis y edicion de secuencias de la region D-loop del ADN mitocondrial en Sequencher software.



**Figura 17** Alineamiento de secuencias de la region D-loop del ADN mitocondrial en MEGA.



Name	Sequence
1. Aragonesa FyR	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C T A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
2. D7 FyR Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
3. C4 FyR Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
4. A12R DL Tehuipango	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
5. A3R DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
6. A4R DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
7. B1R DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
8. B8R DL Tehuipango	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C C
9. C11R DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
10. C4R DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
11. C6R DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
12. D7 DL Astacinga	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
13. E12R DL Tlaquilpa	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
14. FIR DL Tlaquilpa	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
15. G3R DL Tlaquilpa	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
16. G6R DL Tlaquilpa	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A
17. G7R DL Tlaquilpa	A C A A C A C G G A C T T C C A C T C C A C A A G C C C A C A T A A C A A C C C C A T A C A A G A A A A G C A C A A C C A C C A

**Figura 21** Sitios singleton observados en las secuencias de la **region D-loop** del ADN mitocondrial de Ovinos criollos.

Species/Abbrv	Amino Acid Sequence
1. Aragonesa_FyR	Y K G L S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N L Y K K S T T T H P R T W A F M
2. D7_FYR_Astacinga	- - ? L S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T H P R T W A F M
3. C4_FyR_Astacinga	- - ? L S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T H P R T W A F M
4. A12R_DL_Tehuipango	- - - - S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T ? - - - - -
5. A3R_DL_Astacinga	- - - - ? S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
6. A4R_DL_Astacinga	- ? V V S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
7. B1R_DL_Astacinga	- - - - ? I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T H P R - - - - -
8. B8R_DL_Tehuipango	- - - - ? I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T H P R - - - - -
9. C11R_DL_Astacinga	- - - - S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
10. C4R_DL_Astacinga	- - - - S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
11. C6R_DL_Astacinga	- - - - S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
12. D7_DL_Astacinga	- - V L S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T H P ? - - - - -
13. E12R_DL_Tlaquilpa	- - - - T S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
14. FIR_DL_Tlaquilpa	- - - - ? S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T H P ? - - - - -
15. G3R_DL_Tlaquilpa	- - - - F S S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T - - - - -
16. G6R_DL_Tlaquilpa	- ? G W V G I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T ? - - - - -
17. G7R_DL_Tlaquilpa	- - - - ? S I K L A K T P K H T T R T S H S T S P H N N P Y K K S T T T - - - - -

**Figura 22** Modificaciones en el marco de lectura de las secuencias de la **region D-loop** del ADN mitocondrial de Ovinos criollos.

#### **4.4 CONCLUSION.**

La Filogenia estudia las relaciones de afinidad y parentesco de los animales, tratando de explicar, en lo posible, el origen y la historia evolutiva de estos, los del ADN mitocondrial presenta una tasa de mutación mas rápida que los genes nucleares, por lo que se has utilizado en la realización de estudios de filogenia y filogeografía. Dentro de las regiones del ADNmt, una de las más utilizadas para la reconstrucción filogenética en ovinos es la región D-loop, misma que fue utilizada en este estudio, sin embargo, la región seleccionada para amplificar fue una región pequeña, que no apporto muchos datos de variabilidad, como lo han señado otros autores en otras regiones del mundo lo que repercutio en el análisis filogenético. Por lo que es necesario el replanteamiento de la zona a amplificarpara poder inferir la historia evolutiva de los Ovinos criollos de la Region de las Altas Montañas.

#### 4.5 LITERATURA CITADA.

- Aguilar, C.U., Berruecos, J.C., Valencia, J., Roldán, A. 2017. Origen, historia y situación actual de la oveja Pelibuey en México. *Tropical and subtropical agroecosystems* 20(3), 429-439.
- Arvizua, R. U., Vázquez, A. G., Morales, R. A. A. 2009. Origen genético del ovino criollo mexicano (*Ovis aries*) por el análisis del gen del Citocromo C Oxidasa subunidad I. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 47(3), 323-328.
- Alonso A.R., Ulloa-Arvizu R. y Gayosso-Vázquez A. 2017. Mitochondrial DNA sequence analysis of the Mexican Creole sheep (*Ovis aries*) reveals a narrow Iberian maternal origin, *Mitochondrial DNA Part A* 28: 6, 793-800, DOI: [10.1080 / 24701394.2016.1192613](https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1192613)
- Bravo, S., Larama, G., Quiñones, J., Pazac, E., Roderod, E. and Sepúlveda, N. 2019. Genetic diversity and phylogenetic relationship among araucana creole sheep and Spanish sheep breeds. *Small Ruminant Research*. 172: 23-30.
- Espinoza, A.L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: *Ecología Molecular*. L.
- Kimura M. 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature*. (17):624-626.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datas ets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

- Lopez-Oceja A. 2016. ADNmt: Caracterización de razas bovinas y ovinas autóctonas del País Vasco e identificación de especies animales de interés económico y forense. Tesis Doctoral. España.
- Marmi, J., Avellanet, R., Jordana, J. 2007. Análisis de la variabilidad de la región control del ADN mitocondrial en la raza ovina xisqueta. Archivos de Zootecnia.56 (Su1), 429-434 [fecha de Consulta 8 de Julio de 2021]. ISSN: 0004-0592. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49509911>
- Nei, M. y Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.online
- Nishimura D. 2000. Sequencher 3.1. 1. Biotech Software & Internet Report, 1(1-2), 24-30.
- Saavedra-Rodríguez C.O., Gómez-González S.J., Ángel-Díaz, J.E. 2004. Detección de secuencias específicas de ADN de *Spongospora subterranea* en suelo y tubérculos de papa. Revista colombiana de biotecnología.
- Saucedo, P., 1987. Industria ganadera. En Historia de la ganadería en México. Mexico: UNAM, pp. 31–66.
- San A. y Ayanz M., 2015. Conservación (y uso) de Razas Ganaderas Autóctonas De Homo antecessor a Cromagnon (Homo sapiens): cazadores-recolectores. Disponible en:[http://www2.montes.upm.es/Dptos/Dsrn/SanMiguel/APUNTES\\_PRESENTACIONES/GESTION%20ESPECIES%20PROTEGIDAS/GEP\\_Tema%205.6%20Razas%20ganaderas%20aut%C3%B3ctonas.pdf](http://www2.montes.upm.es/Dptos/Dsrn/SanMiguel/APUNTES_PRESENTACIONES/GESTION%20ESPECIES%20PROTEGIDAS/GEP_Tema%205.6%20Razas%20ganaderas%20aut%C3%B3ctonas.pdf).
- Segura, J. y Montes, R., 2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. Biomed, 12(3), pp.196–206.

- Ulloa-Arvizu R., Gayosso-Vázquez A., Alonso-Morales R.A. 2009. Origen genético del ovino criollo mexicano (*Ovis aries*) por el análisis del gen del Citocromo C Oxidasa subunidad I. *Revista Técnica, Pecuaria, México*. 47(3):323-328.
- Vivas A.N., Landi V., Muñoz F.J., Bustamante Y.M., Álvarez F. 2020. Diversidad genética de ovinos criollos colombianos. *Rev MVZ Córdoba*. 25(3):e2185.  
<https://doi.org/10.21897/rmvz.2185>
- Zeder, M.A. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *PNAS* 133(33), 11597-11604.

## **ANEXOS.**

### **Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN Promega.**

#### **Aislamiento de ADN genómico de sangre completa.**

Nota: La sangre se debe recolectar en tubos anticoagulantes con EDTA, heparina o citrato para evitar la coagulación

1. Para 300  $\mu$ l de volumen de muestra: se agregaron 900  $\mu$ l de solución de lisis celular a un tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 ml..
2. Se agito suavemente el tubo con la sangre hasta que estuvo completamente mezclada; luego está se transfirió al tubo que contiene la solución de lisis celular y se invirtió 5–6 veces para mezclar.
3. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente invirtiendo el tubo de 2-3 veces una vez durante la incubación (para lisar los glóbulos rojos). Después, se centrifugaron los tubos a  $13,000\text{--}16,000 \times g$  durante 20 segundos a temperatura ambiente.
4. Al término, se retiró y desechó el sobrenadante sin alterar el sedimento blanco visible. Aproximadamente quedaron 10–20  $\mu$ l de líquido residual en el tubo de 1,5 ml (muestra de 300  $\mu$ l). Si la muestra de sangre fue congelada, se repitieron los pasos 1–4 hasta que el sedimento se observó blanco.

Nota: Cuando algunos glóbulos rojos o restos celulares se observaron en la pastilla, se agregó una alícuota adicional de solución de lisis celular y se repitieron los pasos 3 y 4.

5. Después se agito vigorosamente el tubo hasta que los glóbulos blancos se resuspendieron (10-15 segundos) completamente, esto para obtener una lisis celular eficiente.

6. Posteriormente se agrego la solución de lisis de núcleos en un volumen 1:1 (300 µl para un volumen de muestra de 300 µl). Se realizaron pipeteos de la solución de 5–6 veces para lisar los glóbulos blancos, hasta que la solución se torno muy viscosa. Si en los tubos se seguían observando grupos de células después de mezclar, se procedio a incubar la solución a 37 ° C hasta que los grupos se rompieron.

Si los grupos aún eran visibles después de 1 hora, se agrego solución adicional de lisis de núcleos (100 µl para un volumen de muestra de 300 µl) y se repitio la incubación.

7) Se agrego solución de ARNasa (1.5 µl para 300 µl de volumen de muestra) al lisado nuclear y se mezclo la muestra invirtiendo el tubo 2–5 veces. Posteriormente se dejo incubar la mezcla a 37 ° C durante 15 minutos, y luego se dejo enfriar a temperatura ambiente.

8. Posteriormente se agrego solución de precipitación de proteínas (100 µl para un volumen de muestra de 300 µl) al lisado nuclear y se sometio a vortex por 10-20 segundos. Pequeños grupos de proteínas fueron visibles después del vórtex.

Nota: Si se agregó solución adicional de lisis de núcleos en el **paso 6** se debía agregar un total de 130 µl de solución de precipitación de proteínas para 300 µl de volumen de muestra.

9. Se centrifugo a  $13,000\text{--}16,000 \times g$  durante 3 minutos a temperatura ambiente para un volumen de muestra de 300  $\mu\text{l}$ . A este punto debía verse un gránulo de proteína marrón oscuro.
10. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrifuga de 1.5 ml que contenía 300  $\mu\text{l}$  de isopropanol a temperatura ambiente. Nota: Puede que quedara algo de sobrenadante en el tubo original que contenía el gránulo de proteína. Se debe dejar este líquido residual en el tubo para evitar contaminar la solución de ADN con la proteína precipitada.
11. Se mezcló suavemente la solución por inversión hasta que las hebras blancas de ADN en forma de hilo formaron una masa visible.
12. Se centrifugo a  $13,000\text{--}16,000 \times g$  durante 1 minuto a temperatura ambiente para 300  $\mu\text{l}$  de muestra. El ADN fue visible como una pequeña bolita blanca.
13. Se decantó el sobrenadante y se agregó un volumen de muestra de etanol al 70% a temperatura ambiente al ADN. Se invirtió suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN y los lados del tubo de microcentrifuga. Se centrifugo como en el paso 12.
14. Se aspiró cuidadosamente el etanol con una pipeta Pasteur estirada o una punta de pipeta de 200  $\mu\text{l}$ . (Nota: La pastilla de ADN es muy floja en este punto y se debe tener cuidado para evitar aspirar el sedimento con la pipeta). Se invirtió el tubo en papel absorbente y se dejó secar el sedimento al aire durante 10-15 minutos.
15. Finalmente se agregó solución de rehidratación de ADN (100  $\mu\text{l}$  para un volumen de muestra de 300  $\mu\text{l}$ ) al tubo y se dejó rehidratando el ADN incubando a  $65^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Mezclando periódicamente la solución con golpes suaves al tubo.
16. Al ADN se almacena a  $2\text{--}8^\circ\text{C}$ .

## Anexo 2. Haplotipos ovinos previamente reportados para el D-Loop mitocondrial

Secuencias	Description	Nombre científico	Max score	Total score	Query cover	E-Value	Per. Ident
<b>A12</b>	Ovis aries isolate Bo22 D-loop, complete sequence; mitocondrial	Ovis aries	159	159	100%	2.00E-35	100.00
<b>A3</b>	Ovis aries isolate Bo22 D-loop, complete sequence; mitocondrial	Ovis aries	176	176	100%	2.00E-40	100.00%
<b>A4</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	182	242	100%	7.00E-42	100,00%
<b>B1</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	189	189	100%	3.00E-44	100,00%
<b>B8</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	183	183	100%	1.00E-42	100,00%
<b>C11</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	178	178	100%	6.00E-41	100,00%
<b>C4</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	178	178	100%	6.00E-41	100,00%
<b>C6</b>	Ovis aries isolate Bo22 D-loop, complete sequence; mitocondrial	Ovis aries	178	178	100%	6.00E-41	100,00%
<b>D7</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	195	195	97%	7.00E-46	100,00%
<b>E12</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	176	176	98%	2.00E-40	100,00%
<b>F1</b>	ADN mitocondrial Shanabla119 de Ovis aries, bucle D, secuencia parcial	Ovis aries	189	189	100%	3.00E-44	100,00%
<b>G7</b>	☐ Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	176	176	100%	2.00E-40	100,00%

<b>G3</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	180	180	98%	2.00E-41	100,00%
<b>G6</b>	Ovis aries aislar el bucle D de Bo22, secuencia completa; mitocondrial	Ovis aries	171	171	100%	1.00E-38	100,00%

