

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



"Evaluación de la diversidad genética de razas de ovinos en México mediante el uso de marcadores microsatélites"

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
en Biotecnología Genómica

Presenta:
M.V.Z. Carlos Augusto López Morales

Noviembre, 2004

Cd. Reynosa, Tamps.

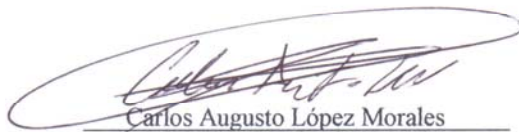


INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 25 del mes Noviembre del año 2004, el (la) que suscribe Carlos Augusto López Morales alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B021095, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Ana María Sifuentes Rincón, cede los derechos del trabajo intitulado "Evaluación de la diversidad genética de razas de ovinos en México mediante el uso de marcadores microsatélites.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. Del Maestro Esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Carlos Augusto López Morales
Nombre y firma

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del
Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional
Bajo la dirección de la Dra. Ana María Sifuentes Rincón.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, institución pública líder de la educación tecnológica en México, por abrirme sus puertas y beneficiarme con todos los apoyos necesarios para mi buen desempeño académico.

Al Centro de Biotecnología Genómica, que dentro de sus instalaciones pude ver cristalizada esta meta y a toda la gente que ahí labora por su apoyo y facilidades en el desarrollo de esta maestría.

A la Dra. Ana María Sifuentes Rincón, por compartir sus conocimientos como mi tutora académica y directora de esta tesis.

A la comisión revisora: Dr. Netzahuacóyotl Mayek Pérez, Dra. Ninfa María Rosas García, Dra. Claudia Patricia Larralde Corona y M. en C. Xóchitl Fabiola de la Rosa Reyna por sus acertadas observaciones y aportaciones a este trabajo.

Al MVZ. Jorge Osorio Ávalos por todas las facilidades y apoyo extraordinario para la colecta de las muestras y colaboración en el desarrollo de este trabajo

A mis compañeros en el Laboratorio: Alex, Ana, Herlinda, Humberto, Victor y Xóchitl.

Un agradecimiento especial a Abraham, Amanda, Cristian, Chabelita, Elma, Maurilio, Mary Carmen, Miryam y Norita por su valiosa colaboración en el desarrollo cotidiano de mis actividades.

GRACIAS

Dios que siempre me acompañas, que me has regalado el don de la vida y me has dado la fortaleza interna para alcanzar esta meta.

A mis **padres**, Arturo y Paula y mis **hermanos** José Arturo y José Luis por apoyarme incondicionalmente en cada uno de mis planes, esta tesis es una modesta muestra de que he valorado cada uno de sus sacrificios y enseñanzas.

A mis **amigos**, son tantos que me es imposible enlistarlos, que sin importar la distancia y tiempo, ahí han estado en todo momento para escucharme, aconsejarme, corregirme o alentarme.

De manera especial a mis compañeros de generación; **Claudia** (Mapacha), **Edgardo** (Mapuche), **Erika** (Manchega), **Laura** (Cholula) y **Maryela** (Chula) por su compañía, amistad y apoyo incondicional dentro y fuera del CBG.

A la señora **Leonor**, el señor **Santiago** y toda la familia **Leal Peña** por su hospitalidad y hacerme sentir como uno más de ustedes.

A esos **ángeles** que me bendijeron con su compañía y me regalaron momentos especiales.

DEDICATORIA

“Recuerdo con melancolía cuando era niño y me sorprendía al escuchar que los científicos descubrían vacunas e inventaban medicamentos para combatir enfermedades, que además podían crear todo tipo de seres fuera de nuestra imaginación gracias a la ingeniería genética. Hoy me siento satisfecho porque afortunadamente he podido acceder al maravilloso mundo de la ciencia y estar cerca de esos mitos y realidades que la rodean”.

Quiero dedicar esta tesis con todo cariño, respeto y admiración a las siguientes personas

A mis padres Arturo y Paula
A mis hermanos José Arturo y José Luis
A mis abuelitos Arturo, Emelia, Guillermo † y Gertrudis
A todos mis tíos, tías, primos y primas
A mis padrinos Edita y Luis

Por ser ejemplo y motivo para seguir adelante y llegar a donde estoy.

Carlos Augusto López Morales

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE CUADROS	II
RESUMEN	III
SUMMARY	IV
ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Generalidades de los ovinos	4
2.2. La ovinocultura en México	5
2.3. Descripción de las razas ovinas analizadas en este estudio	7
2.3.1. Blackbelly	7
2.3.2. Dorper	8
2.3.3. Híbrido Hampshire x Suffolk	9
2.3.4. Pelibuey	11
2.4. Importancia de la conservación de la diversidad genética en las poblaciones animales	11
2.5. Estudio de la diversidad genética: marcadores moleculares	13
2.5.1. Marcadores microsatélites	14
2.5.2. Aplicaciones de los microsatélites	17
2.6. Avances en la genómica de la especie ovina	18
2.7. Análisis de la diversidad genética	19
2.8. Programas computacionales utilizados para el análisis de diversidad genética.....	20
2.8.1. Programa SAGA ^{GT}	21
2.8.2. Programa Cervus 2.0	21
2.8.3. Programa Genetix 4.02	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVO GENERAL	25
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26

6.1. Materiales	26
6.2. Métodos	26
6.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de pelo	26
6.2.2. Extracción de ADN genómico a partir de papel manchado con sangre	27
6.2.3. Selección y optimización de las condiciones de amplificación de los microsatélites	27
6.2.4. Establecimiento del panel bovino	29
6.2.5. Establecimiento del panel ovino	29
6.2.6. Genotipificación	31
6.2.7. Análisis de la diversidad alélica	31
6.2.8. Prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg y determinación de distancias genéticas	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Extracción de ADN genómico y optimización de los paneles de marcadores	32
7.2. Genotipificación de las poblaciones	32
7.3. Análisis de la diversidad alélica	34
7.3.1. Frecuencias alélicas	36
7.3.2. Heterocigocidad y contenido de información polimórfica	38
7.3.3. Prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg	39
7.3.4. Exploración de la diversidad mediante análisis factorial de correspondencias...	40
7.3.5. Distancias genéticas	44
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	51
10. RECOMENDACIONES	52
11. REFERENCIAS	53
12. ANEXOS	62
13. GLOSARIO	77

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Clasificación taxonómica de los ovinos	4
2. Ejemplar de la raza Blackbelly	8
3. Ejemplar de la raza Dorper	9
4. Ejemplar de la raza Hampshire	10
5. Ejemplar de la raza Suffolk	10
6. Ejemplar de la raza Pelibuey	11
7. Arquitectura típica de un microsatélite perfecto y uno imperfecto	14
8. Polimorfismo de los microsatélites	15
9. Mecanismo de slippage	16
10. Gel de electroforesis en el equipo LI-COR	33
11. Genotipificación en el programa SAGA ^{GT}	34
12. PIC obtenido con el panel ovino	39
13. PIC obtenido con el panel bovino	39
14. Gráfica tridimensional del AFC obtenido con el panel bovino	41
15. Gráfica tridimensional del AFC obtenido con el panel ovino	42
16. Gráfica tridimensional del AFC obtenido con el panel bovino y ovino de manera simultánea	43
17. Dendrograma de distancias genéticas	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Genes de interés en la especie ovina	20
2. Características de los microsatélites analizados	28
3. Programas de amplificación por PCR	29
4. Condiciones de las PCR para los marcadores de bovino	30
5. Experimentos de optimización de la PCR para los marcadores de ovino	30
6. Condiciones optimizadas de la PCR con los marcadores de ovino	30
7. Panel de los marcadores microsatélites optimizados	32
8. Número de individuos analizados con el Programa SAGA ^{GT} por población y por <i>locus</i>	34
9. Número de alelos por <i>locus</i> encontrados en cada población	35
10. Comparación de los rangos alélicos reportados contra los obtenidos	35
11. Frecuencias alélicas	36
12. Valores de H_E y H_O	38
13. Valores del F_{IS} calculados para la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	40
14. Distancias genéticas obtenidas con el panel bovino	44
15. Distancias genéticas obtenidas con el panel ovino	44
16. Resultados del cálculo de distancias con los paneles ovino y bovino de manera simultánea	45

RESUMEN

Los ovinos (*Ovis aries*) son una especie de importancia económica que posee gran diversidad biológica, sin embargo, en México se ha puesto poca atención en el establecimiento de programas de evaluación genética, por lo que es necesario sentar las bases que permitan en un futuro aprovechar la diversidad de esta especie, para incrementar su productividad. Actualmente es posible analizar la diversidad genética de las poblaciones a través del análisis de sus genomas; por sus características, los microsatélites se han convertido en los marcadores moleculares más utilizados para este tipo de estudios. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la diversidad genética de cuatro poblaciones ovinas; tres de ellas correspondientes a las razas Blackbelly, Dorper y Pelibuey y la otra correspondiente a un híbrido F_1 de las razas Hampshire y Suffolk; mediante cuatro marcadores microsatélites descritos para bovino (ETH10, INRA23, INRA37 y TGLA53) y cinco descritos para ovino (BM143, BM6444, MAF36, MAF70 y OarFCB11) todos reportados como altamente polimórficos en las especies correspondientes. Se genotipificaron 25 individuos de cada población, con los 9 *loci* descritos. Los marcadores del panel bovino mostraron menor grado de polimorfismo con respecto al de ovino; en ambos casos y con excepción del marcador INRA37, los rangos alélicos fueron cercanos a los reportados. La prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg demostró que, en general, los *loci* estuvieron en desequilibrio debido a un déficit de heterocigotos, con excepción de BM143 en la población F_1 y TGLA53 en la población Blackbelly, en los que se observó exceso de heterocigotos. El único *locus* en equilibrio fue ETH10 en la población Pelibuey. El *locus* INRA37, que está reportado como polimórfico en la especie bovina, mostró una sola forma alélica conservada en las cuatro poblaciones analizadas, éste alelo es 10 pb más pequeño que el tamaño alélico más bajo del rango reportado en bovino. El AFC y el cálculo de distancias genéticas mostraron resultados similares; en ambos se observó que el panel de marcadores de bovino tuvo menor poder para diferenciar las poblaciones con respecto al panel ovino; sin embargo, éste se vio incrementado al utilizar los dos paneles. Las poblaciones más cercanas fueron Pelibuey y Blackbelly, la población F_1 fue cercana a estas dos poblaciones, aunque como un grupo bien definido; mientras que Dorper fue una población independiente de las otras tres. Los resultados establecen las bases para el análisis posterior de la diversidad genética de diferentes razas de ovinos en México.

SUMMARY

Sheep (*Ovis aries*) is an economic important specie with a great biological diversity. In Mexico there are not programs focused on the establishment of genetic evaluation of this specie. In order to get the foundations that allow taking advantage of this specie diversity and increasing their productivity in a near future, it is necessary to initiate these evaluations. Nowadays, the populations genetic diversity can be studied analysing the genome, microsatellite have become the most popular molecular markers for this studies. The goal of this study was to evaluate the genetic diversity in four sheep populations. Three of them corresponded to a breed: Blackbelly, Dorper and Pelibuey, the fourth one was a F₁ hybrid of Hampshire and Suffolk breeds. Twenty-five individuals of each population were analysed using nine microsatellites, four of them from bovine genome (ETH10, INRA23, INRA37 and TGLA53) and five reported for sheep (BM143, BM6444, MAF36, MAF70 and OarFCB11). Amplification products were observed by electrophoresis in LI-COR sequencer and genotyped in SAGA^{GT} software. Cervus 2.0 program was used in allelic diversity analysis that included: alleles by *locus*, allelic range and frequencies, H_o and H_E, and PIC. Genetix 4.02 software was used to determinate Hardy-Weinberg equilibrium, AFC and genetic distances. Polymorphism in bovine markers was lowest than sheep markers. In both cases allelic ranges were near to those previously reported, except for INRA 37 *locus*. Hardy-Weinberg equilibrium test indicate that all *loci* were in disequilibrium by heterozygotes deficit, except for BM143 in Hampshire/Suffolk and TGLA53 in Blackbelly populations, which had an increase of heterozygotes. ETH10 in Pelibuey population was the only *locus* at equilibrium. INRA37 is reported as polymorphic in bovines, but in this study the four analysed sheep populations presented one conserved allelic form with an allelic size smallest (10 bp) than reported in bovines. In both cases bovine markers were less powerful to differentiate populations than sheep markers. However, their use as a panel was successful in the sheep genetic diversity analysis.

ABREVIATURAS

AFC	Análisis Factorial de Correspondencias
° C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
cM	Centimorgan
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
F₁	Primera generación filial
g	Gramos
H_E	Heterocigocidad esperada
H_o	Heterocigocidad observada
ISAG	Sociedad Internacional de Genética Animal
kg	Kilogramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mm²	milímetro cuadrado
min	minuto
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PE	Poder de exclusión
PIC	Contenido de información polimórfica
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
<i>Taq</i>	ADN Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
U/μL	Unidades por microlitro
X	Veces de concentración

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad biológica o biodiversidad se define como "la variedad de organismos en todas sus formas, interacciones y niveles"; se ha considerado también como sinónimo de diversidad de especies, diversidad de ecosistemas y diversidad genética. En esta definición es importante la interdependencia entre la conservación y el ecosistema, ya que la aplicación adecuada y prioritaria de estos campos de estudio es sinónimo de manejo sustentable [García, 2001].

Uno de los componentes básicos para la conservación y explotación de las especies y/o poblaciones es el conocimiento de la diversidad genética, pues mediante el análisis de sus genomas se puede obtener el perfil genético de cada individuo debido a que es exclusivo, lo que hace posible diferenciarlo de los demás salvo en el caso de gemelos homocigotos [Cockett, 1999 a; García, 2001].

Entre los animales domésticos, el ganado ovino (*O. aries*) posee gran diversidad biológica debido a los procesos adaptativos que ha tenido en el transcurso de su evolución, así como al proceso de selección desde que se inició su domesticación hasta nuestros días; ésta diversidad permite que la especie sea utilizada para diferentes propósitos zootécnicos. Actualmente existen razas y líneas especializadas en la producción de leche, carne y lana; así como otras con mejores características de prolificidad, instinto maternal, longevidad, menor edad a la pubertad y estacionalidad [Leymaster, 2002].

Los ovinos domésticos no existían en el Continente Americano y los primeros ejemplares introducidos tienen su origen en las razas europeas que llegaron poco después de los viajes de conquista y colonización a principios del siglo XVI. Durante el período colonial llegaron a México ovinos provenientes de España que dieron origen al ganado criollo [Perezgrovas, 1998]. La posterior introducción y adaptación de diferentes razas provenientes principalmente de Australia y Estados Unidos ha permitido incrementar el acervo genético y actualmente se cuenta con ejemplares de la especie que se han adaptado a los diferentes nichos ecológicos del país [Medrano, 2000].

Según datos oficiales, en México se explotan veinte razas de ovinos, de las cuales sólo cinco han participado en pruebas de comportamiento productivo, pero en ninguna se está llevando a cabo evaluaciones genéticas [SAGARPA, 2001 a].

De manera general, las razas adaptadas a cada uno de los nichos ecológico-agropecuarios del país deben ser consideradas como recursos genéticos sujetos de evaluación para que sean aprovechados tanto para fines productivos como de conservación; por ejemplo, existe un interés marcado en evaluar genéticamente al borrego criollo de Chiapas, el cual tiene mejores niveles de supervivencia debido a que ha sido seleccionado en forma empírica por más de 480 años; sin embargo, las evaluaciones realizadas hasta el momento se han basado solamente en características fenotípicas [Perezgrovas, 1998].

Actualmente se cuenta con herramientas tecnológicas como los marcadores moleculares que permiten evaluar los niveles de diversidad genética presentes en las diferentes poblaciones animales y detectar aquellas que pueden ser reservorios de variantes genéticas únicas, potencialmente importantes en la industria pecuaria, tales como resistencia a enfermedades o adaptación a situaciones ambientales extremas [SAGARPA, 2001 b].

Los marcadores moleculares más utilizados para este tipo de investigaciones son los microsatélites; estos marcadores se encuentran dispersos por todo el genoma de los eucariotes, son altamente polimórficos, se heredan de manera codominante [Ciampolini *et al.*, 1995] [Morera *et al.*, 1999] y permiten determinar la variabilidad genética con base en las frecuencias alélicas de dichos *loci* en las poblaciones; además permiten obtener genotipos individuales con los cuales es posible establecer las relaciones filiales entre los individuos que conforman un hato. Una característica adicional de los microsatélites es que se encuentran conservados entre especies que comparten un mismo origen evolutivo [FitzSimmons *et al.*, 1995] lo que permite que los marcadores obtenidos a partir del genoma de una especie puedan ser aplicados potencialmente para realizar estudios entre especies emparentadas filogenéticamente [Ellegren *et al.*, 1997]. Por ejemplo, las especies ovina (*O. aries*) y bovina (*Bos taurus*) divergieron de un ancestro, lo que ha permitido realizar diversos trabajos en los que se han utilizado con

éxito marcadores genéticos derivados del genoma bovino para diversos estudios genómicos en la especie ovina [Ellegren *et al.*, 1997; Cockett, 1999 a].

En este trabajo se evaluó la aplicabilidad de cinco marcadores microsatélites descritos como altamente polimórficos en ovinos [Arranz *et al.*, 2001 a] y cuatro descritos en bovinos [Salazar, 2002] para establecer un panel que permita analizar la diversidad genética de cuatro poblaciones ovinas correspondientes a tres razas y un híbrido F₁, con esto se pretende establecer las bases que servirán para realizar estudios genómicos que permitan a su vez el diseño de programas de mejoramiento genético mediante mecanismos de monitoreo y sistemas de evaluación continua para asegurar la preservación y mejoramiento de la productividad de esta especie [SAGARPA, 2001 b].

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de los ovinos

Los ovinos domésticos (*O. aries*) son mamíferos rumiantes que pertenecen a la familia *Bovidae* y la subfamilia *Caprinae* (Figura 1). Generalmente, su cuerpo está cubierto de lana, aunque se han desarrollado razas con pelo. Esta especie puede o no presentar cuernos, algunas veces esta característica es observada sólo en los machos. Son de temperamento dócil y con un marcado instinto gregario, en la mayoría de las razas su ciclo reproductivo es estacional y por lo general tienen de una a dos crías por parto [ERZU, 2003].

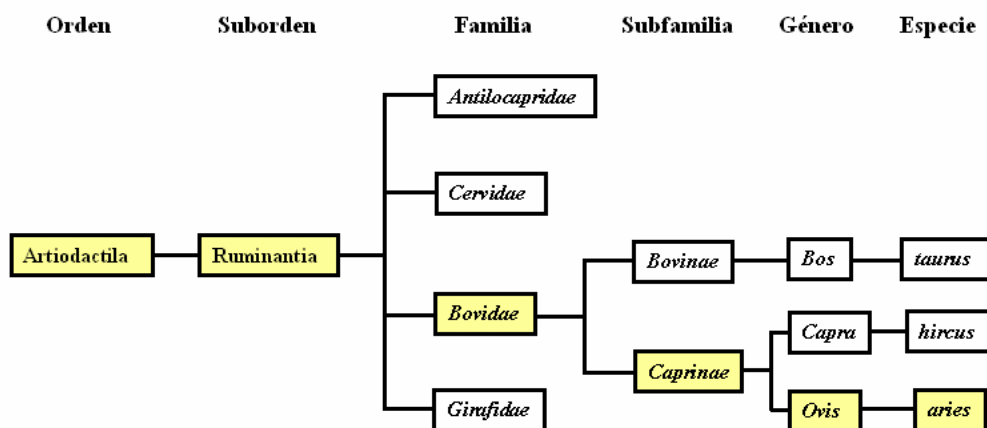


Figura 1. Clasificación taxonómica de los ovinos.

Los ovinos proveen más productos que cualquier otra especie doméstica, tales como carne, grasa y leche para elaboración de alimentos; hueso y cuernos para la elaboración de diferentes artículos; piel y lana para la elaboración de prendas [Grigaliunaite *et al.*, 2004].

A diferencia de otras especies como los bovinos, todavía existen poblaciones silvestres de los posibles ancestros de los ovinos domésticos como son; el borrego urial (*O. orientalis*) borrego muflón (*O. musimon*) y borrego argalí (*O. ammon*) sin embargo, el origen de los ovinos domésticos modernos no se ha determinado con exactitud

[Grigaliunaite *et al.*, 2004]. Se cree que la domesticación de esta especie comenzó al final del período Mesolítico en Asia Menor y desde entonces, la especie ha estado sujeta a un proceso de selección que ha dado como resultado una gran diversidad de razas, de las cuales actualmente se reconocen 450 [Arbiza y De Lucas, 1997].

Comúnmente las razas ovinas son clasificadas de acuerdo con su capa como razas de lana y razas de pelo, aunque la mejor clasificación es la de “biotipos productivos”, de esta manera se pueden clasificar en razas productoras de carne, leche, lana y pieles. Algunas razas pueden estar muy especializadas para una sola característica productiva, mientras que otras pueden ser aptas para más de un fin productivo, estas razas son denominadas de doble propósito [ERZU, 2003]; por lo que desde un punto de vista productivo, la diversidad de razas es importante ya que los productores pueden elegir aquellas que puedan satisfacer sus requerimientos de acuerdo con los objetivos de producción [Leymaster, 2002].

2.2. La ovinocultura en México

Los ovinos del continente americano tienen su origen en las razas europeas que fueron introducidas poco después de los viajes de conquista y colonización desde principios del siglo XVI. Las primeras ovejas fueron embarcadas en los puertos de Cádiz y Sevilla, o en los reabastecimientos en las Islas Canarias. Las crónicas de la época, señalan la llegada de las ovejas Churra, Lacha y Manchega; aunque estudios fenotípicos más recientes realizados en el ganado criollo sugieren que también pudieron haberse introducido las razas Castellana y Canaria [Medrano, 2000].

En México, a lo largo del período colonial comprendido de 1521 a 1821, se introdujeron de manera frecuente ovinos provenientes de España, con los cuales se fue creando un mosaico genético de la especie que actualmente se identifica como ganado criollo o autóctono [Perezgrovas, 1998].

A finales del siglo XIX, el gobierno mexicano decidió apoyar el desarrollo del campo y se organizó un congreso agrícola, con lo que se fundaron sociedades especializadas y se importó ganado de origen americano y europeo. Durante el siglo XX ingresaron al país

gran número de razas que contribuyeron a ampliar el acervo genético del ganado local y generaron individuos o poblaciones bien adaptados a las condiciones de los diferentes nichos ecológico-agropecuarios del país [Medrano, 2000].

En fechas recientes se ha incrementado el interés por la crianza y explotación de ovinos debido a que en los últimos años se ha presentado gran demanda de su carne; desafortunadamente la producción nacional sólo alcanza a cubrir el 42.3 % de la demanda, mientras que el 57.7 % restante tiene que ser cubierto con importaciones de carne congelada y animales en pie provenientes de países como Australia y Nueva Zelanda [López, 2003].

De acuerdo con datos oficiales hasta el año 2001, el inventario de ovinos en México era de 5'980,000 cabezas [SAGARPA, 2001 a] y hasta 1999 el 55 % de los rebaños se concentraba en el centro del país (México, Hidalgo, Puebla, Michoacán, Querétaro, Guanajuato, Tlaxcala, Morelos y DF.) el 23 % en la zona norte (San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Chihuahua) el 16 % en la zona sur (Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Tabasco y Yucatán) y el 6 % restante en otros estados del país [Arteaga, 1999].

La mayor parte del inventario nacional corresponde a ganado criollo y sólo un pequeño porcentaje corresponde a razas definidas y se encuentra disperso entre unos 5000 productores, de los cuales sólo el 34 % vive totalmente de la explotación de la especie y el resto son generalmente productores rurales con rebaños pequeños (de 10 a 75 cabezas) cuyo propósito productivo es el autoconsumo. En este tipo de explotaciones la mano de obra es familiar y el manejo zootécnico de los rebaños consiste en un sistema tradicional basado en el pastoreo diurno y encierro nocturno; en algunas ocasiones se da suplementación alimenticia; se maneja empadre libre y las prácticas sanitarias son mínimas, siendo la desparasitación la más común [Medrano, 2000].

Actualmente, en México se identifican veinte razas, de las cuales nueve se consideran localmente adaptadas. El grado de explotación de las razas Criollo, Hampshire, Pelibuey y Suffolk es alto, el de Rambouillet se considera moderado; mientras que el de las quince razas restantes es bajo. La mitad de las razas muestran una tendencia ascendente en cuanto a su uso, destacando las razas de pelo y algunas recién introducidas orientadas

a la producción de carne; cuatro razas muestran comportamiento estable y cinco (Criollo, Corriedale, Merino, Rambouillet y PolyPay) una tendencia descendente, debido principalmente al bajo precio de la lana [SAGARPA, 2001 a].

De todas las razas existentes en México, sólo cinco (Dorset, Hampshire, Pelibuey, Rambouillet y Suffolk) han participado en pruebas de comportamiento productivo, pero en ninguna se están llevando a cabo evaluaciones genéticas de los rebaños. Un 40 % utiliza inseminación artificial y transferencia de embriones, aunque la disponibilidad de sementales o semen con evaluaciones genéticas es limitada [SAGARPA, 2001 a].

Además de las razas descritas se cuenta con una importante población de ovinos criollos que con el paso del tiempo se han adaptado a las condiciones de los diferentes nichos ecológico-agropecuarios del país, este tipo de ganado presenta características heterogéneas, pero con una marcada influencia del tipo merino que se difundió ampliamente en gran parte del centro y norte del país y aunque su rendimiento productivo es bajo, posee características de rusticidad como resistencia a condiciones climáticas extremas y enfermedades parasitarias, que podrían ser aprovechables en producción animal [Perezgrovas, 1998].

2.3. Descripción de las razas ovinas analizadas en este estudio

2.3.1. Blackbelly

Es una raza de pelo también conocida como “Panza Negra” o “Barbados”. Se considera que esta raza surgió en la isla de Barbados como producto de la cruce de borregos de lana introducidos por comerciantes holandeses y borregos africanos traídos por los esclavos y se ha seleccionado por más de 300 años en busca de alta prolificidad, ganancia de peso y resistencia a parásitos y enfermedades. El borrego Blackbelly es rústico, prolífico, no estacional, con excelente habilidad materna y abundante producción de leche, lo que permite a las hembras criar dos o tres corderos con facilidad si cuentan con alimentación adecuada. Físicamente es un animal de talla media, la coloración que presenta varía de marrón claro hasta café oscuro en todo el cuerpo salvo la parte ventral que es de color negro (Figura 2). Algunos individuos tienen manchas negras en el cuerpo; y no presenta cuernos [AMCO, 2001]. La crianza de esta

raza se ha difundido ampliamente en México debido a que se ha adaptado a las condiciones climáticas tanto de los trópicos como de las zonas templadas, donde existe la tendencia a desarrollar animales de conformación cárnica.



Figura 2. Ejemplar de la raza Blackbelly [Tomada de AMCO (2001)]

2.3.2. Dorper

Raza de pelo desarrollada durante la década de 1930 como resultado de la cruce de las razas Dorset Horn y Black Head Persian, para obtener un animal capaz de soportar las condiciones climáticas extremas de Sudáfrica en donde fue generada. Las hembras tienen fuerte instinto maternal con larga vida productiva y facilidad de parto. Esta raza se caracteriza por ser animales robustos sin deposición de grasa y algunos individuos poseen cuernos pequeños [AMCO, 2001]. Los machos maduros alcanzan pesos que varían entre 110 y 140 kg y las hembras entre 90 y 100 kg; su cuerpo es de color blanco y la cabeza negra (Figura 3), aunque existen animales completamente blancos y son conocidos con el nombre de White Dorper [OSU, 2003]. A pesar de que es considerada como raza de pelo, es común encontrar individuos cuya capa es una mezcla de pelo y lana; sin embargo, esta característica no es deseable. En su introducción a México la raza Dorper demostró alto desempeño productivo en el trópico y en el norte del país y se ha utilizado para cruces con animales criollos.



Figura 3. Ejemplar de la raza Dorper [Fotografía cortesía del Centro de Mejoramiento Genético Ovino del Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México (CEMEGO-UAEM)].

2.3.3. Híbrido F₁ Hampshire x Suffolk

En la zona centro del país es muy común encontrar explotaciones que utilizan la cruce entre individuos de las razas Hampshire y Suffolk, ya que se ha observado que el híbrido de ambas razas tiene una tasa de crecimiento mayor que las razas puras [Comunicación personal. Jorge Osorio Ávalos. Coordinador del Centro de Mejoramiento Genético Ovino del Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México]; sin embargo, en la literatura no existe la descripción de las características de este híbrido, por lo cual serán descritas por separado cada una de las razas que la constituyen a fin de que se conozcan sus características.

La raza Hampshire es considerada de doble propósito y fue desarrollada en el Condado de Hampshire, Inglaterra de donde obtuvo su nombre. Se originó a partir de la mezcla de estirpes de ovejas que coexistían a lo largo de las fronteras del Condado. Históricamente, se reconocen dos contribuciones principales; la de Sir John Twyman con el uso de un morueco Costwold y la de Sir William Humprey por la introducción de dos moruecos Southdown más grandes y destacados; posteriormente, los granjeros del Condado continuaron con la selección y la mejora de la raza que en aquel tiempo se consideró superior a cualquier otra oveja [OSU, 2003]. Esta raza es de tamaño medio, cara negra, lana blanca, miembros fuertes cubiertos de lana en el tercio inferior sobre pelo oscuro, la lana es más densa en los miembros posteriores, no posee cuernos y la cabeza se encuentra cubierta de lana, excepto en la nariz y cualquier cobertura de lana

que interfiera con la visión es considerada como un defecto serio. Los machos maduros pueden alcanzar hasta 130 kg de peso, mientras que las hembras hasta 95 kg (Figura 4) [AMCO, 2001].



Figura 4. Ejemplar de la raza Hampshire [Fotografía cortesía del CEMEGO-UAEM]

La raza Suffolk es considerada también de doble propósito y se originó en Inglaterra como resultado de la cruce de carneros Southdown con borregas Norfolk Horned; aparentemente, el resultado de esta cruce mejoró las características de las dos razas progenitoras. Los individuos de esta raza son animales de talla grande y conformación musculosa, su cuerpo es largo y alto con vellón de lana blanca y pelo negro en cabeza y patas; no tienen cuernos, sus patas son largas, rectas y negras, y están cubiertas de lana hasta la rodilla y corvejones, hacia abajo están limpias. Los machos maduros pueden alcanzar un peso hasta de 160 kg, mientras que las hembras alcanzan hasta 115 kg (Figura 5)[AMCO, 2001].



Figura 5. Ejemplar de la raza Suffolk [Fotografía cortesía del CEMEGO-UAEM)

2.3.4 Pelibuey

Es una raza de pelo también conocida con los nombres de “Carnero pelo de buey”, “Cubano rojo” y “Borrego Tabasco”. Es descendiente de la raza West African Dwarf. Esta raza se ha adaptado muy bien a las zonas tropicales y en México ha tenido éxito al introducirla a las zonas costeras; sin embargo, su uso se ha vuelto cada vez más común en zonas templadas. Los borregos Pelibuey tienen una conformación cárnica con buenas masas musculares, están cubiertos de pelo espeso y corto, su cabeza es mediana, con orejas de implante lateral y no tienen cuernos. Los colores que se distinguen en esta raza son: canelo, blanco y pinto. Los animales de esta raza son de talla mediana, los machos adultos alcanzan un peso de 54 kg mientras que las hembras llegan a los 34 kg; su índice de prolificidad es de 1.24 corderos por parto (Figura 6)[AMCO, 2001].



Figura 6. Ejemplar de la raza Pelibuey (color canelo). [Fotografía cortesía del CEMEGO-UAEM].

2.4. Importancia de la conservación de la diversidad genética en las poblaciones animales

La diversidad genética se refiere a la variación a nivel de los genes del individuo (polimorfismo) y provee un mecanismo para que las poblaciones se adapten a su ambiente cambiante. A un mayor número de variaciones ambientales, existen más posibilidades de que al menos uno de los individuos tenga una variante alélica que se adapte al nuevo ambiente y produzca descendencia con la variante que se reproducirá y continuará en la población en las generaciones siguientes [NBII, 2004].

En los mamíferos, las fuentes de variación se deben principalmente a dos eventos que pueden ocurrir a nivel de su ADN: la mutación y la recombinación durante la gametogénesis. La mutación es el cambio en la secuencia nucleotídica del ADN y puede darse de manera espontánea o inducida [Lewin, 2001]. La recombinación es un evento esencial de la reproducción sexual durante la meiosis, que consiste en el intercambio de material genético entre dos cromosomas homólogos y da como resultado diferentes combinaciones de alelos.

Durante los últimos años la conservación de razas y/o poblaciones ha tomado auge, debido principalmente a la conciencia que se ha tomado sobre la necesidad de preservar los recursos genéticos, tal como quedó patentado a partir de la “Cumbre Sobre el Medio Ambiente y Desarrollo” celebrada en Río de Janeiro, Brasil en 1992. [Aranguren y Jordana, 2001].

La importancia e interés de la conservación de razas se puede resumir en cuatro aspectos: el primero de ellos es de orden genético-productivo, ya que la diversidad es necesaria para mantener la variabilidad de las poblaciones, lo que permite la adaptación a diferentes ambientes, algunas veces adversos. El segundo aspecto es científico, ya que el estudio de cada raza en particular puede ser de interés para detectar a corto o mediano plazo posibles genes únicos y valiosos desde el punto de vista productivo, en el momento actual o en el futuro. El tercero es de orden histórico-cultural, ya que es necesaria la conservación de determinadas razas que representan el patrimonio genético de un país al ser parte viva de su historia. Y el cuarto es de índole ecológico-ambiental, ya que los ecosistemas son el resultado del equilibrio entre el clima, flora y fauna, por lo que cualquier factor que afecte a alguno de estos componentes estaría atentando en contra de dicho equilibrio; la finalidad de un programa de conservación de animales vivos *in situ* es el mantenimiento de la cantidad máxima de diversidad genética con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación [Aranguren y Jordana, 2001].

En los animales domésticos, los recursos genéticos constituyen un patrimonio de valor inestimable, ya que la pérdida de la diversidad genética puede causar problemas asociados a la consanguinidad como son baja fertilidad, susceptibilidad a agentes

infecciosos y la aparición de síndromes o enfermedades que repercuten en la calidad de vida y eficiencia productiva del animal [Aranguren y Jordana, 2001].

2.5. Estudio de la diversidad genética: marcadores moleculares

En la actualidad, el estudio de la diversidad genética se ha enfocado en la determinación de los patrones de diversidad del genoma de los individuos haciendo uso de los marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con algún rasgo genético en un organismo. Los primeros estudios para realizar perfiles genéticos estaban basados en el uso de proteínas y durante mucho tiempo la tipificación sanguínea fue una herramienta utilizada principalmente para determinar parentesco entre individuos; posteriormente, se comenzaron a utilizar marcadores inmunológicos; sin embargo, el uso de proteínas presenta varias limitantes, que van desde el tipo de muestra que se utiliza (en la mayoría de los casos debe ser obtenida a partir de sangre fresca) hasta la escasa disponibilidad comercial de antisueros, por lo que en la mayoría de los casos los laboratorios tenían que elaborar sus propios reactivos [Bowling, 2001].

A partir de la primera mitad de la década de 1990 surgió una nueva generación de marcadores basados en técnicas moleculares para analizar el ADN, que resultaron más confiables debido a que la muestra para analizar podía ser de cualquier tejido, incluso de individuos ya fallecidos. Estos marcadores mostraron mayor polimorfismo y su disponibilidad comercial para realizar estos ensayos resultó ser muy amplia. En animales domésticos los marcadores de ADN han tenido mucha aplicación para realizar mejoramiento asistido [Haley y Visscher, 2000].

Dentro de los marcadores genéticos basados en polimorfismos del ADN se encuentran los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP's) Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP's), Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTR's) y las Repeticiones Cortas en Tándem (STR's) que son conocidos también con el nombre de microsatélites [Bowling, 2001; Dunner y Cañón, 2003].

2.5.1. Marcadores microsatélites

Los microsatélites se han convertido en una herramienta útil para realizar estudios de diversidad genética en poblaciones. Teóricamente se encuentran en todos los eucariotes y consisten en repeticiones de secuencias que van de 2 a 6 nucleótidos dispuestos en tándem, distribuidos de manera uniforme por todo el genoma como *loci* y presentan herencia mendeliana simple; son codominantes, por lo que se pueden diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos [Aranguren y Jordana, 2001]. Se ha observado que existe conservación de las secuencias de microsatélites entre especies que comparten el mismo origen evolutivo [Ellegren *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1998]. La importancia funcional de estas secuencias aún no está completamente establecida; sin embargo, se ha observado que pueden estar asociados a regiones codificantes, donde pueden servir como potenciadores de las mismas [Goldstein y Schlötterer, 1999].

La arquitectura típica de un microsatélite consiste en secuencias conservadas que flanquean a las secuencias repetitivas, a lo que se le conoce como microsatélites perfectos; en algunos casos existen algunas secuencias intercaladas con las repetitivas (microsatélites imperfectos) los cuales adoptan esta estructura por la adquisición de diferentes mutaciones puntuales hasta que eventualmente se convierten en secuencias no repetitivas (Figura 7) [Goldstein y Schlötterer, 1999].

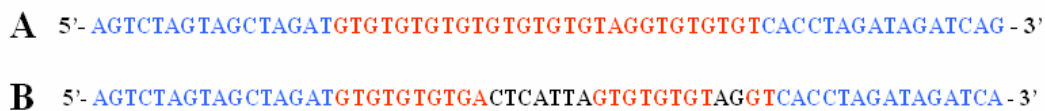


Figura 7. Arquitectura típica de un microsatélite perfecto (A) y uno imperfecto (B). Las secuencias flanqueantes conservadas se muestran en azul, las secuencias repetitivas en naranja y las mutaciones puntuales del microsatélite imperfecto en negro.

La arquitectura de los microsatélites permite que puedan ser fácilmente analizados por PCR, ya que las secuencias no repetitivas flanqueantes permiten diseñar los iniciadores

específicos para cada *locus* y el tamaño del fragmento amplificado depende del número de repeticiones que tenga cada alelo (Figura 8).

Alelo 1: 72 pb

5'-ACCTGGGAAGCCTCCATATACACACACACACACACACACACACACACACACACCCATAAAGAATCTGCCTGC-3'

Alelo 2: 66 pb

5'-ACCTGGGAAGCCTCCATATACACACACACACACACACACACACACCCATAAAGAATCTGCCTGCAG-3'

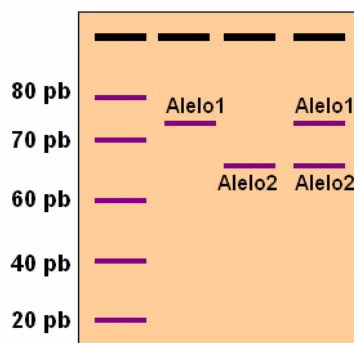


Figura 8. Polimorfismo de los microsatélites. La imagen muestra dos formas alélicas de un microsatélite (Alelo 1: 72 pb y Alelo 2: 60 pb) las secuencias flanqueantes (azul) permiten diseñar los iniciadores para la amplificación por PCR, las secuencias repetitivas (naranja) determinan el tamaño del producto de amplificación.

Actualmente es aceptado que el mecanismo principal que genera variaciones en la longitud de los microsatélites es un evento denominado “slippage” el cual consiste en un desplazamiento de las cadenas del ADN desnaturalizado, seguido de un mal apareamiento de las bases complementarias. En teoría, a medida que hay ganancia de repeticiones, las secuencias proveen un sustrato más eficiente para el slippage, lo que dará como resultado la expansión o reducción del tamaño de la secuencia. Algunos estudios *in vitro* indican que la proporción de este evento es dependiente del tamaño de la unidad repetitiva (mayor para repeticiones de dinucleótidos) y de su secuencia (menor para segmentos ricos en G-C), aunque se ha sugerido que la proporción de mutación muestra una correlación con la longitud de la secuencia [FitzSimmons *et al.*, 1995; MacHugh, 1996; Goldstein y Schlötterer, 1999].

En la figura 9 se describen las fases del mecanismo de slippage: en (a) se representa un punto durante la replicación en la cual las cadenas están separadas temporalmente en

una de las secuencias (región en negro); (b) el slippage ocurre a ambos lados de la separación y forma “loops” en la cadena debido al mal apareamiento de una repetición; (c) el loop se mueve a lo largo de la secuencia, en el lado izquierdo del hueco, el loop encuentra un reemplazo de un solo nucleótido (en color blanco) que lo interrumpe; (d) la interrupción evita que el slippage continúe y el loop se mueve en la dirección opuesta; (e) al lado derecho del hueco, el movimiento del loop es libre y continúa hasta llegar a la secuencia flanqueante (región en blanco); (f) aunque el loop queda junto a la región flanqueante, el hueco puede cerrarse a medida que la cadena superior aumenta su número de repeticiones, arreglada en la mayoría de los casos por el sistema de reparación de desapareamiento [MacHugh, 1996].

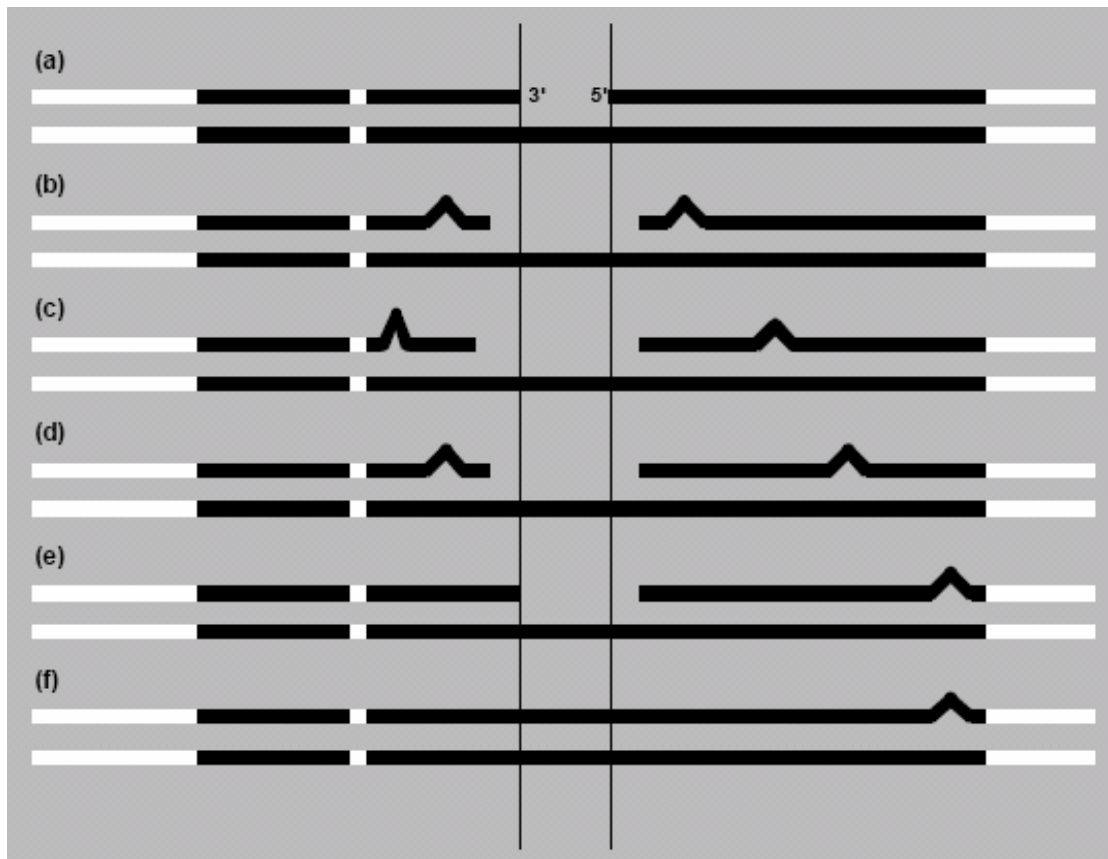


Figura 9. Mecanismo de slippage (Tomado de MacHugh, 1996).

La velocidad de mutación de los microsatélites es más alta que la de las mutaciones puntuales, que son del orden de 10^{-9} a 10^{-10} . En sistemas *in vivo* se han estimado

alrededor de 10^{-3} eventos de mutación por generación en el ratón, mientras que en el ser humano se han estimado alrededor de 10^{-3} a 10^{-4} eventos [Goldstein y Schlötterer, 1999].

Existen dos métodos para generar secuencias de microsatélites. El primero es conocido como *de novo* y consiste en la clonación en bibliotecas y posterior secuenciación de las clonas. El segundo es el método de inter-especies y consiste en evaluar la aplicabilidad de los marcadores generados en una especie, en otra emparentada filogenéticamente [Morin *et al.*, 1998]. Este método ha sido importante dentro de la genómica comparativa, ya que ha permitido establecer mapas genéticos en gran número de especies estrechamente relacionadas [O'Brien *et al.*, 1999].

2.5.2. Aplicaciones de los microsatélites

Debido a que los microsatélites poseen características tales como: polimorfismo, herencia mendeliana simple, codominancia, además de la facilidad para su análisis en el laboratorio, son considerados por varios autores como una herramienta poderosa para estudios de genética de poblaciones [Aranguren y Jordana, 2001] y han sido utilizados para realizar estudios evolutivos, reconstrucción de árboles filogenéticos, análisis de diversidad genética en poblaciones, identificación de alelos específicos de raza y especie, determinación de flujo genético, elaboración de mapas genómicos, identificación de QTL's, diseño de esquemas de introgresión de genes para mejoramiento genético y determinación de paternidad, entre otras aplicaciones [Goldstein y Schlötterer, 1999].

Desde su descripción los microsatélites han tenido uso relevante en biotecnología animal, tanto en especies domésticas como en silvestres. Actualmente se han reportado microsatélites para las principales especies domésticas que incluyen al bovino, ovino, cerdo, caballo, perro, gato, gallina, pavo e incluso algunas especies menos comunes como las vicuñas [Wheeler *et al.*, 2001] y avestruces [Bello y Sánchez, 2004]. La mayoría de los trabajos realizados incluyen la evaluación de la diversidad genética dentro de algunas razas para evitar los efectos adversos de la consanguinidad [Morera *et al.*, 1999; Blott *et al.*, 2003], la evaluación de la variabilidad entre razas para determinar

sus distancias genéticas [Ciampolini *et al.*, 1995], el análisis de la diversidad genética en poblaciones de animales autóctonos con fines de conservación [Li *et al.*, 2001] el establecimiento de paneles con alto poder de exclusión para verificación de paternidad [DeNise *et al.*, 2003; Salazar, 2002] mapeo genético [Burt *et al.*, 2003] y detección de QTL's [Moore *et al.*, 2001; Walling *et al.*, 2004].

2.6. Avances en la genómica de la especie ovina

Los ovinos son organismos diploides y su genoma se encuentra organizado en 26 pares de autosomas y 2 cromosomas sexuales ($2n=54$). Los autosomas son telocéntricos, con excepción de tres pares de cromosomas grandes metacéntricos (1, 2 y 3). El cromosoma X es el más grande de los acrocéntricos y el Y es el menor de los metacéntricos. Diversos estudios han revelado que existe gran similitud entre los cromosomas de ovino (*O. aries*) y los de bovino (*B. taurus*) basados en patrones de bandas similares y *loci* mapeados [Cockett, 2001], lo que ha permitido aprovechar muchos de los marcadores generados en el bovino para generar el mapa genómico del ovino, ya que taxonómicamente los bovinos y los ovinos se encuentran agrupados en la familia *Bovidae* [Fox y Myers, 2001] y se ha documentado que divergieron a partir de un ancestro común hace aproximadamente 16 a 28 millones de años [Ellegren *et al.*, 1997].

Lo anterior ha permitido que muchos de los marcadores estudiados en la especie bovina se hallen conservados en otros rumiantes y puedan ser aplicables en la especie ovina con éxito; incluso muchos de ellos se mantienen en la misma posición en el genoma y son denominados microsatélites ortólogos [Goldstein y Schlötterer, 1999].

La primera versión del mapa genómico ovino fue publicada por Crawford *et al.* (1995) [Cockett, 2001] y contenía 246 marcadores, de los cuales 86 fueron microsatélites *de novo* de la especie ovina, 126 microsatélites bovinos, 1 microsatélite de venado y 33 genes específicos previamente descritos. La cobertura total de este mapa fue de 2070 cM (cerca del 75 % del genoma) y los marcadores fueron asignados a los 26 autosomas. Tres años después, de Gortari *et al.*(1998) [Cockett, 2001] publicaron la segunda versión del mapa, que contenía 519 marcadores, de los cuales 402 fueron microsatélites de bovino, 101 microsatélites de ovino y 16 genes específicos, con una cobertura de

3063 cM y un promedio de 6.5 cM de espaciamento entre cada marcador [Cockett *et al.*, 2001].

A diferencia de otras especies domésticas, en la especie ovina existen menos reportes publicados en cuanto a la identificación QTL's, por lo que se han establecido proyectos para este fin tomando como referencia lo reportado en otras especies de mamíferos [Walling *et al.*, 2004] y ha permitido la identificación QTL's asociados con: resistencia a infestaciones parasitarias, producción de leche y calidad de la lana y la canal, algunos de estos QTL's se han asignado a cromosomas específicos como características monogénicas (Cuadro 1) [Cockett *et al.*, 2001].

Adicionalmente, se han realizado algunos trabajos para la producción de ovejas transgénicas que son utilizadas como biorreactores para la producción de proteínas de interés farmacológico y terapéutico, por ejemplo, la alfa-1antitripsina empleada en el tratamiento de la fibrosis quística [PPL Therapeutics, 2004]. Pero quizás el evento más conocido de la genómica en ovinos ha sido la clonación de la oveja Dolly mediante la transferencia nuclear a partir de células de la glándula mamaria, lograda por el equipo del Dr. Wilmut y colaboradores en el Instituto Roslin de Edimburgo [Campbell *et al.*, 1996].

En lo que respecta a estudios de diversidad genética en ovinos basados en microsatélites, existen trabajos realizados principalmente para diferenciación entre razas autóctonas, estos estudios han permitido inferir sobre su posible origen con fines de conservación [Arranz *et al.*, 2001; Stahlberger-Saitbekova, 2001; Grigaliunaite *et al.*, 2003].

2.7. Análisis de la diversidad genética

La diversidad genética típicamente se estudia mediante medidas tales como el polimorfismo, promedio de heterocigocidad, diversidad alélica y frecuencias alélicas y genotípicas. La diversidad alélica es el número promedio de los alelos por *locus*, y las frecuencias alélicas y genotípicas corresponden a las proporciones de cada alelo y cada genotipo para cada *locus* analizado en una población [García de León, 2003]. Dentro de

una población con reproducción sexual y cruzamientos aleatorios (panmíctica) se establece un equilibrio de las frecuencias alélicas y la frecuencia de cada alelo permanece constante de generación en generación. Esto ocurrirá mientras se cumplan las condiciones de la ley de Hardy-Weinberg [García de León, 2003]. En la actualidad, la necesidad de facilitar el análisis de los datos genéticos ha propiciado la generación de programas computacionales con base estadística que puedan desarrollar estos cálculos de manera sencilla y en un lapso de tiempo muy corto [Weir, 1996].

Cuadro 1: Genes de interés en la especie ovina.

Gen o QTL	Característica	Descripción
Booroola de la Fecundidad (<i>FecB</i>)	Una copia del gen incrementa en un cordero el tamaño de la camada.	Mutación codominante para el rango de ovulación y parcialmente dominante para el tamaño de la camada localizada en el cromosoma 6 (Cockett <i>et al.</i> , 2001).
Callipyge (<i>CLPG</i>)	Hipertrofia pronunciada en los músculos de los cuartos traseros. Se desarrolla aproximadamente a las tres semanas de edad.	Mutación heredada de forma única denominada "sobredominancia polar" localizada en la terminación distal del cromosoma 18 (Cockett <i>et al.</i> , 1999 (b))
Carwell	Incremento del músculo <i>longissimus</i> de las chuletas.	Mutación localizada aproximadamente en la misma posición que Callipyge en el cromosoma 18. (Cockett <i>et al.</i> , 2001)
Condrodisplasia Hereditaria Ovina (Síndrome del Cordero Araña)	Desorden genético recesivo causante de deformidades esqueléticas en corderos jóvenes que incluyen alargamiento y desviación de los miembros y encorvamiento de la columna vertebral.	Ubicado en la terminación telomérica del cromosoma 6. Se ha propuesto como gen candidato al Receptor 3 del factor de crecimiento de los fibroblastos (Cockett <i>et al.</i> , 1999 (b)).
Doble musculatura de la oveja Texel	Incremento de la masa muscular similar a la doble musculatura de los bovinos	Se ha sugerido al gen de la miostatina o a un <i>locus</i> cercano como responsable. El análisis con microsatélites ha permitido detectar QTL's asociados en los cromosomas 2 y 18 (Walling <i>et al.</i> , 2001).

2.8. Programas computacionales utilizados para el análisis de diversidad genética

A la fecha existen una gran cantidad de paquetes computacionales que permiten realizar el análisis de diversidad genética. A continuación se describen los utilizados en este trabajo.

2.8.1. Programa SAGA^{GT}

El programa SAGA^{GT} está diseñado para genotipificar mediante el análisis de microsatélites; este programa permite analizar de manera automatizada los geles de electroforesis como imágenes obtenidas desde un servidor (secuenciador), para ello transfiere automáticamente la imagen del gel después de la electroforesis e inicia el análisis, posiciona los carriles y calibra los tamaños de las bandas de acuerdo con los rangos de peso establecidos de los *loci* en la base de datos creada para el proyecto. Finalmente proporciona un informe que incluye la identidad de la muestra analizada, el *locus* analizado y el tamaño de los alelos para la muestra y el *locus* en particular [LICOR, 2002].

2.8.2. Programa Cervus 2.0

El programa Cervus 2.0 fue diseñado para realizar análisis de paternidad a gran escala utilizando *loci* codominantes. Los tipos de análisis que realiza el programa son: cálculo de frecuencias alélicas, simulación de análisis de paternidad y análisis de paternidad propiamente dicho; los métodos que utiliza Cervus son de exclusión y de probabilidad [Marshall *et al.*, 1998]. Los resultados que incluye el análisis con Cervus para cada *locus* son: el número de alelos encontrado y sus frecuencias alélicas, número de individuos analizados, total de homocigotos y heterocigotos, H_o y H_E , PIC (número de alelos encontrados por *locus* para cualquier marcador de ADN, en donde a mayor número de alelos, el valor de PIC es más alto [Liu y Cordes, 2004].

2.8.3. Programa Genetix 4.02

El programa Genetix 4.02, permite el cálculo de un conjunto de parámetros utilizados en genética de poblaciones tales como los estadísticos F de Wrigth, la distancia genética de Nei y el desequilibrio gamético. Para cada uno de ellos se genera, mediante procedimientos de re-muestreo, permutando alelos entre los individuos en el caso del Coeficiente de Consanguinidad Individual con relación a la subpoblación (F_{IS}) una distribución de los valores del parámetro bajo la hipótesis nula (por ejemplo, equilibrio Hardy-Weinberg en el caso de los estadísticos F) [Belkhir *et al.*, 2004].

Genetix permite realizar la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante prueba por permutaciones del F_{IS} (Coeficiente de Consanguinidad Individual con relación a la subpoblación); para ello efectúa cierto número de permutaciones (entre 50 y 50000) sobre la base de datos original. Con este análisis se obtiene una distribución del estimador bajo la hipótesis nula (H_0) de que $F_{IS} = 0$, que significa que la población se encuentra en equilibrio pues $H_o = H_e$. El desequilibrio puede deberse a déficit ($F_{IS} > 0$) ó exceso de heterocigotos ($F_{IS} < 0$).

Genetix cuenta con una herramienta que permite establecer un análisis factorial de correspondencias, este procedimiento describe la asociación de variables cualitativas, en la que cada individuo está representado sólo una vez por el valor de cada modalidad (*locus*) y variable (alelos para cada *locus*). En este caso, los individuos analizados vienen de poblaciones y están representados por los valores propios de sus frecuencias alélicas; los valores de inercia en cada eje pueden ser interpretados como combinaciones lineales de los valores F_{ST} (Varianza de frecuencias alélicas entre poblaciones) *monocus*, los resultados son mostrados como gráficas bidimensionales o tridimensionales en las que los individuos se ven como nubes de puntos en el hiperespacio, que tiene tantas dimensiones como modalidades (alelos) haya en todas las variables (alelos en los diferentes *loci*) y la relación que guarda con respecto a los demás individuos está en función de la distancia que existe entre ellos [Belkhir *et al.*, 2004].

3. JUSTIFICACIÓN

La diversidad genética es una condición natural para todas las poblaciones de seres vivos, sin embargo, en algunas ocasiones se presentan algunos eventos que pueden conducir a la pérdida de ésta. En el caso de los animales domésticos, la diversidad genética se ha perdido como resultado de la selección artificial a la que con distintos fines los ha sujetado el ser humano, lo que ha resultado en razas con alto grado de consanguinidad. Desde el punto de vista conservacionista, la pérdida de la diversidad genética involucra la posible pérdida de genes únicos, así como la extinción de algunas razas o variedades de una especie en particular. Por otro lado, desde el punto de vista productivo está bien documentado que la pérdida de la diversidad genética, conlleva a la disminución en la productividad de los animales por depresión endogámica [Aranguren y Jordana, 2001].

A nivel mundial la ovinocultura se ha convertido en una industria muy importante, por ejemplo, en el 2002, Australia contaba con un inventario de 98.2 millones de cabezas de ganado ovino, alcanzando exportaciones relacionadas con esta actividad superiores a los 223 millones de dólares [FAO, 2003], por lo que es considerada como una de las industrias más valiosas en ese país. Entre los países con mayor producción de carne de ovino destacan China, Australia, Nueva Zelanda, Gran Bretaña, y Estados Unidos, por su parte México de acuerdo con datos de la FAO [2003] era el productor número 83 a nivel mundial y se estimaban ingresos tan sólo de 11,000 dólares.

Desde que fueron introducidos a México en la época de la conquista, los ovinos se convirtieron en una especie de importancia económica y cultural, por la facilidad de su manejo y producción de carne y lana; sin embargo, lejos de aprovechar los recursos genéticos del ganado criollo adaptado desde entonces a cada uno de los nichos ecológico-agropecuarios del país, se ha optado por introducir razas exóticas, bajo la creencia, no siempre cierta, de que éstas tienen un mejor desempeño productivo que el ganado autóctono; algunas de estas razas exóticas se han adaptado bien a las condiciones de explotación de México y han contribuido para incrementar el acervo genético; sin embargo, esta práctica ha ocasionado que en algunas regiones las poblaciones de ganado criollo hayan desaparecido y con ellas tal vez algunos genes únicos [Perezgrovas, 1998].

A diferencia de otros países, en México, la especie ovina no ha sido sometida a evaluaciones genéticas, por lo que es necesario establecer estrategias que permitan llevar a cabo este tipo de evaluaciones, encausadas a futuro hacia el mejoramiento genético asistido y conservación de los recursos genéticos de los rebaños mexicanos. El presente trabajo está dirigido al establecimiento de las herramientas moleculares adecuadas que permitan dar los primeros pasos para lograr dicho objetivo.

4. OBJETIVO GENERAL

- Establecer un panel de microsatélites que sea aplicable para el análisis de la diversidad genética de razas de ovinos en México.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la aplicabilidad de los microsatélites empleados en la genotipificación de bovino, para realizar estudios de diversidad genética en la especie ovina.
- Determinar la aplicabilidad de los microsatélites empleados en estudios de genotipificación de ovinos, para realizar estudios de diversidad genética, en distintas razas de esta especie que son explotadas en México.
- Establecer un panel de microsatélites específico para la tipificación de individuos en las razas bajo estudio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

Con el apoyo del Centro de Mejoramiento Genético Ovino de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, se seleccionaron cuatro explotaciones ovinas del Valle de Toluca en el Estado de México, tres de ellas correspondientes a las razas: Blackbelly, Dorper, Pelibuey y la cuarta correspondiente a una crucea F₁ de Hampshire x Suffolk. De cada explotación se tomaron muestras de 25 individuos. En el caso de las razas Blackbelly, Dorper y Pelibuey; el tipo de muestra obtenida fue pelo de los corvejones (incluyendo la raíz); mientras que para la crucea F₁ fue papel (Whatman Chromatography 3MM Cat. 3030 917) manchado con una gota de sangre capilar de las orejas.

Las explotaciones de Blackbelly, Pelibuey y la F₁ son de sistema semiextensivo; es decir, que los animales son mantenidos en corral pero salen a pastar en pradera, su fin productivo es vender animales para abasto. La explotación de Dorper es de sistema intensivo tecnificado en el que los animales son mantenidos en corral y su fin productivo es vender animales de raza pura para pie de cría.

6.2. Métodos

6.2.1. Extracción de ADN genómico a partir de pelo

De cada pelo se cortaron aproximadamente 5 mm incluyendo la raíz, tomando de 30 a 40 pelos por cada individuo y luego se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y a cada uno se le agregó 50 µL de resina de purificación (ReadyAmpTM Genomic DNA Purification System A7710 de PROMEGA) y se mezclaron al vortex durante 15 s, posteriormente se incubaron a 56° C durante 1 hora, enseguida se agitaron por 15 s al vortex y se incubaron a 100 °C durante 8 min, se agitaron al vortex por 15 s y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 min. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL. Las muestras obtenidas se secaron al vacío en el concentrador de ADN (CentriVap Concentrator, LABCONCO Cat. 79700-00), se resuspendieron en 40 µL de solución TE 1X y se almacenaron a -20 °C [Sifuentes *et al.*, 2004].

6.2.2. Extracción de ADN genómico a partir de papel manchado con sangre

De cada muestra se eligió la porción de papel en la que la mancha de sangre era más intensa y se recortó una pieza de aproximadamente 25 mm², la cual fue depositada en un tubo eppendorf con 1.5 mL de agua libre de nucleasas. Se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente agitando en vortex cada 2 min. Enseguida se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 min, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de la resina de purificación (ReadyAmpTM) se agitaron en vortex y se incubaron a 56° C durante 20 min, se incubó a 100 °C durante 8 min, se agitó en vortex durante 15 s y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL. Las muestras se secaron al vacío en el concentrador de ADN (CentriVap Concentrator) se resuspendieron en 40 µL de solución TE 1X y se almacenaron a -20 °C. Debido a que la cantidad de ADN obtenida con estas dos técnicas fue limitada, no se realizó cuantificación. Sifuentes *et al.* [2004] describen que la cantidad de ADN contenida en 1 o 2 µL de la solución de extracción (la cual es variable en cada muestra) es suficiente para la amplificación por PCR y lectura en el equipo de secuenciación LI-COR.

6.2.3. Selección y optimización de las condiciones de amplificación de los microsatélites

El criterio principal fue seleccionar microsatélites reportados con alto contenido de información polimórfica (PIC) y con heterocigocidad mayor a 60 % en cada una de las especies de las cuales se originaron (*O. aries* y *B. taurus*). El cuadro 2 muestra las características de los marcadores utilizados en este estudio. Para la optimización de la PCR se seleccionaron al azar quince muestras de ADN de pelo, cinco de cada una de las poblaciones de las tres razas puras y cinco de papel manchado con sangre de la población F₁.

Cuadro 2. Características de los microsatélites analizados.

<i>Locus</i>	CrBov	cM	CrOv	cM	RangoBov	Rango Ov	AlelosBov	AlelosOv	Secuencia de Iniciadores
BM143	6	49.4	6	60.2	90-116	102-128	NR	15	5'-ACCTGGGAAGCCTCCATATC-3' 5'-CTGCAGGCAGATTCTTTATCG-3'
BM6444	2	88.4	2	252.2	147-157	NR	NR	13	5'-CTCTGGGTACAACACTGAGTCC-3' 5'-TAGAGAGTTTCCCTGTCCATCC-3'
ETH10	5	70	NR	NR	211-219	NR	8	NR	5'-GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACAA-3' 5'-CCTCCAGCCCACTTTCTCTTC-3'
INRA23	3	NR	NR	NR	197-223	NR	11	NR	5'-GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC3' 5'-TAACTACAGGGTGTAGATGAATC-3'
INRA37	10	69.9	NR	NR	120-146	NR	12	NR	5'-GATCCTGCTTATATTTTAAACCAC-3' 5'-AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC-3'
INRA40	2	7.5	NR	NR	156-240	NR	36	NR	5'-TCAGTCTGGAGGAGAGAAAAC-3' 5'-CTCTGCCCTGGGGATGATTG-3'
MAF36	26	72.6	22	77.9	NR	117	NR	19	5'-CATATACCTGGGAGGAATGCATTACG-3' 5'-TTGCAAAAGTTGGACACAATTGAGC-3'
MAF70	4	41.7	4	53.3	NR	140	NR	13	5'-CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC-3' 5'-GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC-3'
OarFCB11	2	120.4	12	34.4	NR	126-138	NR	10	5'-GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCAC-3' 5'-GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC-3'
TGLA53	16	40.6	12	34.4	152-186	NR	12	NR	5'-GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA-3' 5'-ATCTTCACATGATATTACAGCAGA-3'

Cr Bov (Cromosoma Bovino), Cr Ov (Cromosoma ovino), cM (Distancia en Centimorgan), Rango Bov (Rango alélico en bovino), Rango Ov (Rango alélico en ovino), Alelos Bov. (Número de alelos reportados en Bovino), Alelos Ov. (Número de reportados en Ovino). NR (No reportado),

6.2.4. Establecimiento del panel bovino

Se evaluó un panel integrado por nueve microsatélites derivados del genoma bovino (D1S34, D2S26, ETH10, INRA23, INRA37, INRA40, TGLA126, TGLA53 y TGLA44) reportados por la ISAG como altamente informativos para la genotipificación en ésta especie [Salazar, 2002]. Para la optimización de estos marcadores se tomaron como referencia las condiciones de amplificación descritas por Salazar [2002] y De la Rosa [2003]. El volumen final en todas las reacciones de PCR fue de 10 μ L y las concentraciones de Buffer (1X), dNTP's 0.4 mM (Promega, Cat. U1240) y *Taq* Polimerasa 0.125 U/ μ L (Promega, Cat. A351H) se mantuvieron constantes. En el Cuadro 3 se muestran los cuatro programas de amplificación basados en la técnica de "Touch Down" [McPherson y Møller, 2000] que fueron utilizados para la optimización, mientras que las condiciones de amplificación iniciales y las optimizadas se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Programas de amplificación por PCR.

Tiempo	TDTG		TD55		TD60		TD65		
	Temp. °C	No.Ciclos	Temp. °C	No.Ciclos	Temp. °C	No.Ciclos	Temp. °C	No.Ciclos	
5 min	95	1	95	1	95	1	95	1	
45 s	95		95		95		95		
45 s	58 – 2 cada ciclo	5	62 – 2 cada ciclo	5	65 – 2 cada ciclo	5	68 – 2 cada ciclo	5	
45 s									72
45 s									95
45 s									50
45 s	72	30	72	30	72	25	72	25	
10 min	72	1	72	1	72	1	72	1	

6.2.5. Establecimiento del panel ovino

Se evaluó un panel de seis microsatélites reportados como altamente polimórficos en estudios de diversidad genética en ovinos [Arranz *et al.*, 2001 a]. Los microsatélites fueron: BM143, BM6444, BM4621, MAF36, MAF70 y OarFCB11. Para su optimización se diseñaron cuatro experimentos con distintas combinaciones de concentraciones de ADN, cloruro de magnesio, los iniciadores y los programas del

termociclador (Cuadro 5) hasta obtener las condiciones que permitieran una amplificación de buena calidad (Cuadro 6).

Cuadro 4. Condiciones de PCR para los marcadores de bovino.

Reactivo	ETH10		INRA23		INRA37		INRA40		TGLA53	
	A	B	A	B	A	B	A*	B	A	B
ADN	50 ng	1 µL	50 ng	3 µL	50 ng	2 µL	50 ng	2 µL	50 ng	2 µL
MgCl ₂	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	3mM	2.5mM	2.5mM	2mM	2mM
Iniciador Sentido	0.005µM	0.01µM	0.02µM	0.0125µM	0.015µM	0.015µM	0.02µM	0.02µM	0.01µM	0.025µM
Iniciador Antisentido	0.025µM	0.05µM	0.1µM	0.0625µM	0.075µM	0.075µM	0.1µM	0.1µM	0.05µM	0.125µM
Programa	TD55		TDTG		TDTG		TD60		TDTG	

Las columnas A muestran las condiciones de amplificación descritas por Salazar (2002) y De la Rosa (2003) (A*) para bovino. Las columnas B muestran las condiciones finales de amplificación optimizadas para ovino.

Cuadro 5: Experimentos de optimización de la PCR para los marcadores de ovino.

Reactivo	Experimento A	Experimento B	Experimento C	Experimento D
ADN	Bajo 1 µL	Bajo 1 µL	Alto 2 µL	Alto 2 µL
MgCl ₂	Bajo 2mM	Alto 3mM	Bajo 2mM	Alto 3mM
Iniciador Sentido	Alto 0.072mM	Bajo 0.02mM	Bajo 0.02mM	Alto 0.072mM
Iniciador Antisentido	Alto 0.36mM	Bajo 0.1mM	Bajo 0.1mM	Alto 0.36mM

Cuadro 6. Condiciones optimizadas para la PCR con los marcadores de ovino.

Reactivo	BM143	BM6444	MAF36	MAF70	OarFCB11
ADN	1 µL	1 µL	2 µL	1 µL	1 µL
MgCl ₂	2 mM	2 mM	3 mM	2 mM	1.5 mM
Iniciador Sentido	0.072 µM	0.02 µM	0.015 µM	0.02 µM	0.01 µM
Iniciador Antisentido	0.36 µM	0.1 µM	0.075 µM	0.1 µM	0.05 µM
Programa	TD65	TD60	TD55	TD60	TD65

6.2.6. Genotipificación

Se amplificaron los diez marcadores para los 25 individuos de cada una de las poblaciones y el producto de amplificación fue visualizado por electroforesis en gel de acrilamida al 6.5 % de 25 cm de longitud y 0.4 mm de grosor de acuerdo con las especificaciones para genotipificación del proveedor [LI-COR, 1999]. Para determinar el tamaño de los alelos se utilizó como referencia un marcador de peso molecular (Size Standard IRDye 800 50-350bp, LI-COR). La genotipificación se realizó utilizando el programa SAGA^{GT}, con las imágenes de los geles de electroforesis obtenidas desde el secuenciador LI-COR, aunque el programa posiciona los carriles y calibra los tamaños de las bandas de manera automática, se realizó una corrección manual de aquellos carriles y bandas mal asignados.

6.2.7. Análisis de la diversidad alélica

El análisis de la diversidad alélica se realizó con el programa Cervus 2.0 [Marshall *et al.*, 1998] a partir de los datos obtenidos de la genotipificación con el programa SAGA^{GT}. El análisis para cada *locus* incluyó: el número de alelos encontrado y sus frecuencias alélicas, número de individuos analizados, total de homocigotos y heterocigotos, H_o y H_E , PIC y PE.

6.2.8. Prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg y determinación de distancias genéticas

La prueba para medir la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó en el programa Genetix 4.02 la prueba del F_{IS} sobre 1000 permutaciones para todos los *loci* utilizados en las poblaciones. Con el mismo programa se realizó un AFC para el panel ovino y bovino por separado y posteriormente con los dos paneles de manera simultánea. Así mismo se calcularon las distancias genéticas entre las poblaciones con el método de Nei, 1972. Una vez obtenidos los datos de las distancias genéticas, éstos fueron editados para generar un árbol con el programa Neighbor Joining.

7. RESULTADOS

7.1. Extracción de ADN genómico y optimización de los paneles de marcadores

Se obtuvo ADN genómico de buena calidad a partir de pelo y papel manchado con sangre; puesto que no se llevó a cabo la cuantificación del ADN, se observó que, en general, la concentración obtenida a partir de 30 de raíces pelo y de 25mm² de papel manchado fue suficiente para llevar a cabo todo el análisis; sin embargo, para el caso de algunos *loci* (INRA23, INRA40 y OarFCB11) fue necesario incrementar a 40 el número de raíces de pelo. De los nueve marcadores derivados del genoma bovino que fueron elegidos para este trabajo, se lograron optimizar las condiciones de amplificación para cinco tomando como base las condiciones descritas por Salazar [2002]. De igual forma, de los seis marcadores derivados del genoma ovino propuestos se optimizaron las condiciones para cinco. De esta manera quedó integrado un panel con un total de diez marcadores para el análisis de la diversidad genética (Cuadro 7).

Cuadro 7: Panel de los marcadores microsatélites optimizados

Panel de Microsatélites	
Panel Bovino	Panel Ovino
ETH10	ETH10
INRA23	INRA23
NIRA37	NIRA37
INRA40	INRA40
TGLA53	TGLA53

7.2. Genotipificación de las poblaciones

La amplificación de los diez marcadores microsatélites para los 25 individuos de cada población se llevó a cabo de manera exitosa, salvo algunos problemas técnicos mínimos, los cuales se debieron principalmente a las cantidades limitadas de ADN, mismos que se resolvieron incrementando la cantidad de ADN por reacción de PCR o bien concentrando los productos de amplificación para mejorar su lectura en el equipo LI-COR; en la Figura 10 se muestra un gel de electroforesis con la calidad ideal para ser leído por el programa SAGA^{GT} para genotipificación, se muestran las amplificaciones

de la población F_1 con MAF70 e INRA37. Los marcadores que mostraron mayor requerimiento de ADN fueron INRA23, INRA40 y OarFCB11, lo que limitó el número de individuos analizados con estos marcadores (Cuadro 8), de estos tres marcadores INRA40 no pudo ser amplificado en las poblaciones Pelibuey y Blackbelly, por lo que se descartó para realizar el análisis de diversidad entre poblaciones.

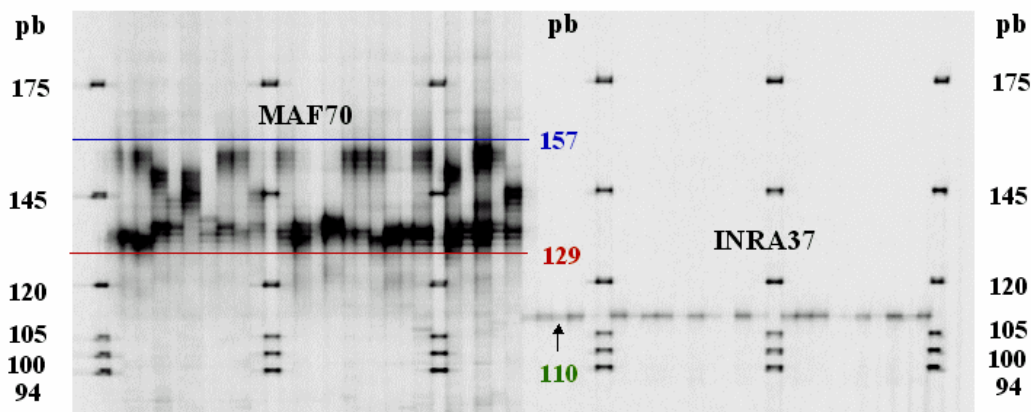


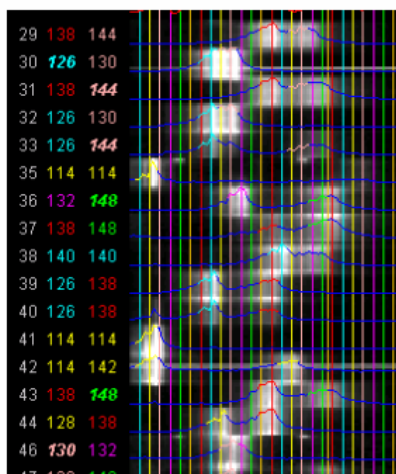
Figura 10. Gel de electroforesis en el equipo LI-COR.

En general la asignación de tamaños alélicos de manera automatizada con el programa SAGA^{GT} se realizó de manera adecuada, únicamente se tuvo que hacer una corrección manual de algunas bandas, cuando la fluorescencia en ellas era demasiado intensa o débil y el programa fue incapaz de discriminar para la asignación de alelos. El número de individuos analizados por población y por *locus* se muestra en el Cuadro 8. La figura 11 muestra la manera en que el programa SAGA^{GT} presenta la asignación de alelos para cada individuo durante la genotipificación. (A) muestra la diversidad de alelos encontrados (dentro del rango de 114 a 164 pb) para el *locus* BM6444 en la población Blackbelly. (B) muestra a INRA37 en la población F_1 Hampshire/Suffolk con un solo alelo (110 pb) para todos los individuos. Los números en colores representan el tamaño de cada alelo encontrado, aquellos que aparecen cursivas son los que se corrigieron manualmente.

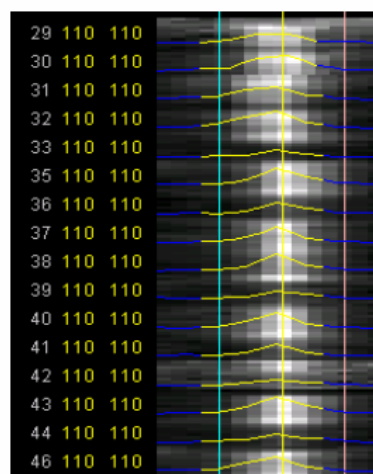
Cuadro 8. Número de individuos analizados con el Programa SAGA^{GT} por población y por *locus*.

<i>Locus</i>	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey
BM143	24	25	25	24
BM6444	25	25	25	25
ETH10	25	25	25	25
INRA23	24	25	21	16
INRA37	25	22	25	25
INRA40	0	18	23	11
MAF36	24	25	25	25
MAF70	24	24	25	25
OarFCB11	15	25	25	21
TGLA53	23	25	25	23

(A) BM6444 Blackbelly



(B) INRA37 Hamp/Suff

Figura 11. Genotipificación en el programa SAGA^{GT}

7.3. Análisis de la Diversidad Alélica

El análisis de diversidad alélica realizado con el programa Cervus 2.0 mostró que la mayoría de los *loci* fueron polimórficos; el número de alelos encontrados por *locus* fue variable para cada población y se describe con detalle en el Cuadro 9. Por ejemplo, el *locus* BM6444 tuvo el mayor número total de alelos (21), mientras que MAF36 presentó el mayor número de alelos dentro de una población (13) para la población F₁. Dentro de los marcadores polimórficos ETH10 tuvo el menor número total de alelos (7) de los cuales cuatro se encontraron en la población Dorper. El marcador INRA37 sólo mostró un alelo, el cual estuvo conservado en las cuatro poblaciones.

Cuadro 9. Número de alelos por *locus* encontrado en cada población.

<i>Locus</i>	<i>Población</i>				Total
	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey	
BM143	9	7	8	8	11
BM644	10	8	10	9	21
ETH10	2	4	1	2	7
INRA23	9	7	10	9	12
INRA37	1	1	1	1	1
MAF36	9	9	13	8	17
MAF70	7	10	8	9	14
OarFCB11	9	9	6	9	13
TGLA53	10	4	9	8	14

Los rangos alélicos obtenidos fueron cercanos a los reportados en la literatura [Salazar, 2002, US-MARC, 2003], sin embargo, se observó que los marcadores de bovino tuvieron menor número de alelos en la especie ovina con respecto a los reportados en la especie focal y que los rangos se encontraron dentro de los valores bajos reportados. Por otro lado, los microsatélites de ovino mostraron mayor número de alelos con respecto a los de bovino y los rangos observados fueron más amplios que los reportados. El *locus* INRA37 del panel bovino mostró un sólo alelo conservado en las cuatro poblaciones ovinas analizadas; este alelo único fue de 110 pb, 10 pb más corto que el tamaño alélico más bajo del rango reportado para la especie bovina (120-146 pb) en la que además es polimórfico (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de los rangos alélicos reportados contra los obtenidos.

<i>Locus</i>	Reportado	Obtenido
BM143	90-116	95-115
BM6444	147-157	114-164
ETH10	211-219	193-213
INRA23	197-215	195-219
INRA37	120-146	110
MAF36	117	96-128
MAF70	140	129-157
OarFCB11	126-138	112-142
TGLA53	155-179	129-157

7.3.1. Frecuencias alélicas

Los *loci* BM143 y MAF36 mostraron series alélicas de 95 a 115 pb y 96 a 128 pb respectivamente, mientras que los *loci* BM6444 y MAF70, con excepción de un alelo (120 y 141 para cada caso) también mostraron series alélicas de 114 a 164 pb y 129 a 157 pb respectivamente (Cuadro 11).

Cuadro 11. Frecuencias alélicas

<i>Locus</i>	Alelos pb	<i>Frecuencias Alélicas</i>				
		Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey	
BM143	95	0.0625				
	97	0.1042	0.12	0.1	0.1875	
	99	0.0208		0.04	0.0642	
	101	0.125	0.04		0.0417	
	103	0.125	0.28	0.02		
	105	0.3333	0.38	0.36	0.3958	
	107		0.02	0.02	0.0625	
	109	0.0625		0.1	0.125	
	111	0.1042		0.14	0.1042	
	113	0.0625	0.02	0.22	0.0208	
	115		0.04			
	BM6444	114	0.16			
		116		0.04		0.04
118			0.12			
122				0.06		
124				0.04		
126		0.12		0.2		
128		0.02		0.28	0.14	
130		0.22		0.04	0.04	
132		0.04			0.26	
134			0.12	0.04	0.06	
136				0.02		
138		0.18	0.22		0.08	
140		0.04				
142		0.04			0.04	
144		0.06				
146					0.06	
148		0.12		0.02	0.28	
150			0			
152			0.02	0.14		
162			0.08			
164			0.02			
OarFCB11	112		0.02			
	120	0.0333				
	122	0.1	0.02		0.025	
	124	0.2333	0.14	0.38	0.05	
	126	0.1667	0.2	0.06	0.25	
	128	0.2667		0.18	0.275	
	130	0.0333				
	132	0.0333			0.05	
	134		0.12		0.1	
	136	0.0333	0.28	0.08	0.1	
	138	0.1	0.18	0.2	0.1	
140		0.02	0.1	0.05		
142		0.02				

Continúa Cuadro 11...

<i>Locus</i>	Alelos pb	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey
MAF36	96			0.02	
	98			0.02	
	100	0.02	0.02	0.04	
	102	0.06		0.1	0.16
	104	0.16	0.02	0.28	0.22
	106	0.1		0.14	0.3
	108	0.4		0.06	0.14
	110	0.14	0.02	0.04	0.04
	112	0.02	0.14		0.02
	114			0.02	
	116			0.06	
	118		0.06		
	120		0.68	0.1	
	122		0.02	0.02	
	124		0.02	0.1	
	126	0.06	0.02		0.06
	128	0.04			0.06
MAF70	129	0.0208			
	131		0.0208		0.06
	133	0.1042		0.02	0.16
	135	0.625	0.2292	0.32	0.08
	137	0.0833	0.3125	0.14	0.46
	139		0.0208	0.02	
	143		0.1042		
	145		0.125	0.06	
	147	0.0833	0.0208		0.02
	149		0.0833		0.08
	151		0.0417	0.06	0.04
	153	0.0625			0.06
	155	0.0208		0.14	0.04
157		0.0417	0.06		
ETH10	193		0.02		
	197	0.96		1	0.9829
	199		0.92		
	201		0.04		
	203	0.04			
	213		0.02		0.0202
INRA23	195		0.02		
	199	0.1458	0.48		
	201	0.1875		0.119	0.1875
	203	0.0208	0.08	0.0238	
	205		0.04	0.0476	0.0313
	207	0.0417	0.04	0.381	0.0313
	209	0.0417		0.119	0.0313
	211	0.1875		0.0238	0.0313
	213	0.1667	0.22	0.0476	0.2813
	215	0.1458	0.12	0.0476	0.125
	217	0.0625		0.119	0.1563
219			0.0714	0.125	
INRA37	110	1	1	1	1
TGLA53	136		0.02	0.1	
	140				
	142			0.16	
	144	0.2391	0.86	0.26	0.1304
	146	0.1304			0.1739
	148	0.1957		0.08	0.1522
	150	0.0435			
	152	0.0652	0.02	0.02	0.0217
	154	0.0652	0.1	0.02	0.0217
	156	0.0217		0.22	0.0217
	158	0.0217		0.1	0.1522
	160	0.1957			0.3261
	162	0.0217			
	174			0.04	

7.3.2. Heterocigocidad y contenido de información polimórfica

El cálculo de las frecuencias alélicas permitió determinar la heterocigocidad y comparar entre la H_E y H_O . En general, la H_E fue mayor que la H_O ; únicamente en el caso de BM143 para la población F_1 y TGLA53 para la población Blackbelly se observó que la H_E fue mayor que la H_O . El único *locus* que mostró una H_E igual a la H_O fue ETH10 en la población Pelibuey (Cuadro 12). Por su parte los valores de PIC muestran que los marcadores descritos para ovino fueron más polimórficos con respecto a los descritos para bovino (Figuras 12 y 13) ya que su valor se mantuvo siempre >0.7 excepto para MAF36 en la población Dorper y MAF70 en Blackbelly, mientras que en el panel bovino sólo INRA23 y TGLA53 (excepto en la población Dorper) tuvieron valores cercanos a 0.8; para el *locus* ETH10 el valor más alto fue de 0.147 en la población Dorper. El marcador INRA37 tuvo un valor de PIC = 0 ya que sólo mostró un alelo en todas las poblaciones.

Cuadro 12. Valores de H_E y H_O .

<i>Locus</i>	<i>Población</i>									
	Blackbelly		Dorper		Hamp/Suff		Pelibuey		Total	
	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O
BM143	0.841	0.667	0.756	0.52	0.8	0.84	0.788	0.667	0.817	0.673
BM644	0.873	0.8	0.771	0.771	0.844	0.24	0.833	0.32	0.929	0.4
ETH10	0.078	0	0.154	0.154	0	0	0.04	0.04	0.409	0.03
INRA23	0.87	0.625	0.711	0.711	0.82	0.714	0.853	0.688	0.886	0.674
INRA37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAF36	0.791	0.72	0.522	0.44	0.88	0.84	0.824	0.36	0.881	0.59
MAF70	0.592	0.292	0.829	0.708	0.82	0.64	0.754	0.36	0.82	0.5
OarFCB11	0.851	0.467	0.83	0.48	0.78	0.76	0.845	0.65	0.86	0.6
TGLA53	0.856	0.87	0.255	0.2	0.85	0.76	0.816	0.565	0.812	0.594

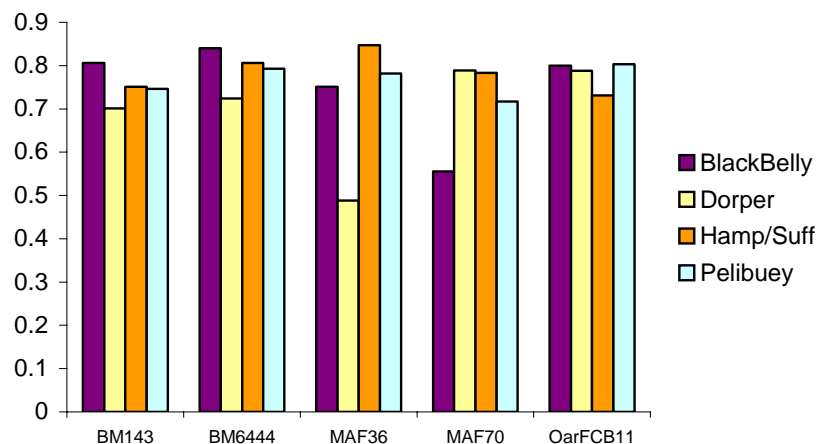


Figura 12. PIC obtenido con el panel ovino.

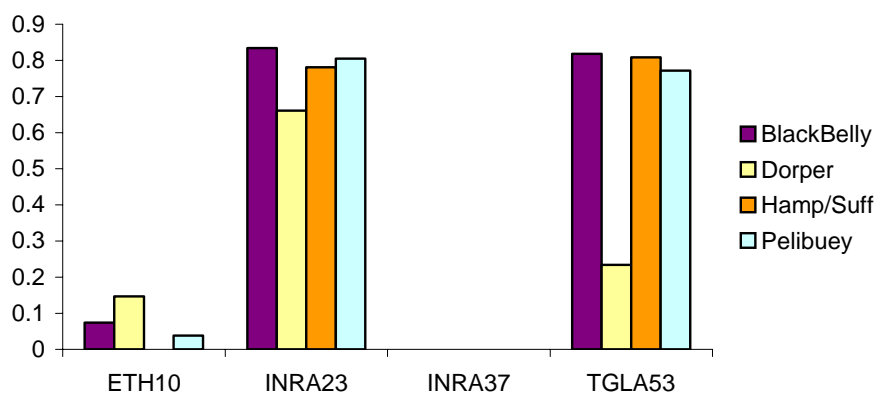


Figura 13. PIC obtenido con el panel bovino.

7.3.3. Prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg

La prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg demostró que el único *locus* en equilibrio fue ETH10 en la población Pelibuey ($F_{IS} = 0$), mientras que los demás *loci* se encontraron en desequilibrio con un $F_{IS} > 0$ y sólo en dos casos (BM143 en la población F_1 y TGLA53 en la población Blackbelly) el valor de $F_{IS} < 0$ (Cuadro 13).

Cuadro 13. Valores del F_{IS} calculados para la prueba al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Marcador	Población			
	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey
BM143	0.21115	0.31654	-0.0566	0.15693
BM6444	0.08571	0.69296	0.71984	0.62055
ETH10	1	0.48663	N.A.	0
INRA23	0.28571	0.0445	0.13043	0.19903
INRA37	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
MAF36	0.09148	0.16057	0.04364	0.568
MAF70	0.51286	0.14815	0.22659	0.52787
OarFCB11	0.46006	0.42687	0.0246	0.23529
TGLA53	-0.01617	0.21824	0.10413	0.3125

7.3.4. Exploración de la diversidad mediante el análisis factorial de correspondencias

El AFC demostró que el panel de marcadores de bovino agrupó a las poblaciones Blackbelly, F_1 y Pelibuey; sin embargo, no fue posible realizar una diferenciación clara entre ellas; por otro lado, muestra a la población Dorper fue independiente de las otras tres (Figura 14). Por su parte el AFC realizado con el panel de marcadores de ovino, mostró a las poblaciones Blackbelly, F_1 y Pelibuey relativamente agrupadas, pero diferenciadas entre si; mientras que F_1 y Pelibuey mostraron mayor grado de relación genética; nuevamente la población Dorper fue un grupo independiente de las otras tres (Figura 15). El AFC que combinó los marcadores de bovino y ovino agrupó a las poblaciones Blackbelly, F_1 y Pelibuey. A pesar de que estas poblaciones se muestran como un solo grupo, la diferenciación entre ellas es más marcada que cuando se utiliza cada uno de los paneles por separado. La población Blackbelly estuvo relacionada genéticamente tanto con F_1 como con Pelibuey; sin embargo, no existe relación genética estrecha entre éstas últimas. De nuevo la población Dorper se mostró como un grupo independiente y bien definido, aunque la distancia que mostró con respecto a las otras tres poblaciones es mayor que la observada con el panel ovino (Figura 16).

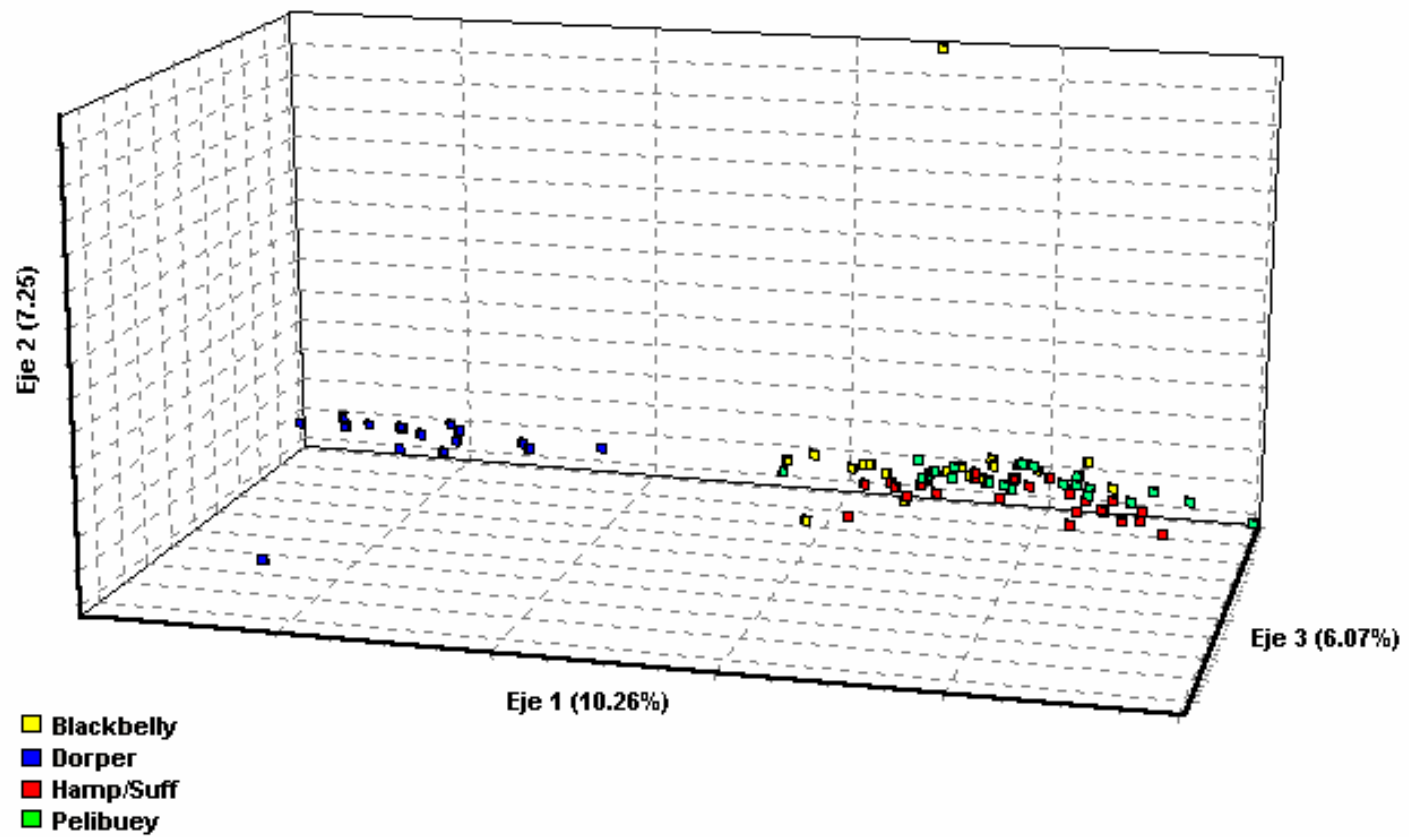


Figura 14. Gráfica tridimensional del AFC obtenido con el panel bovino.

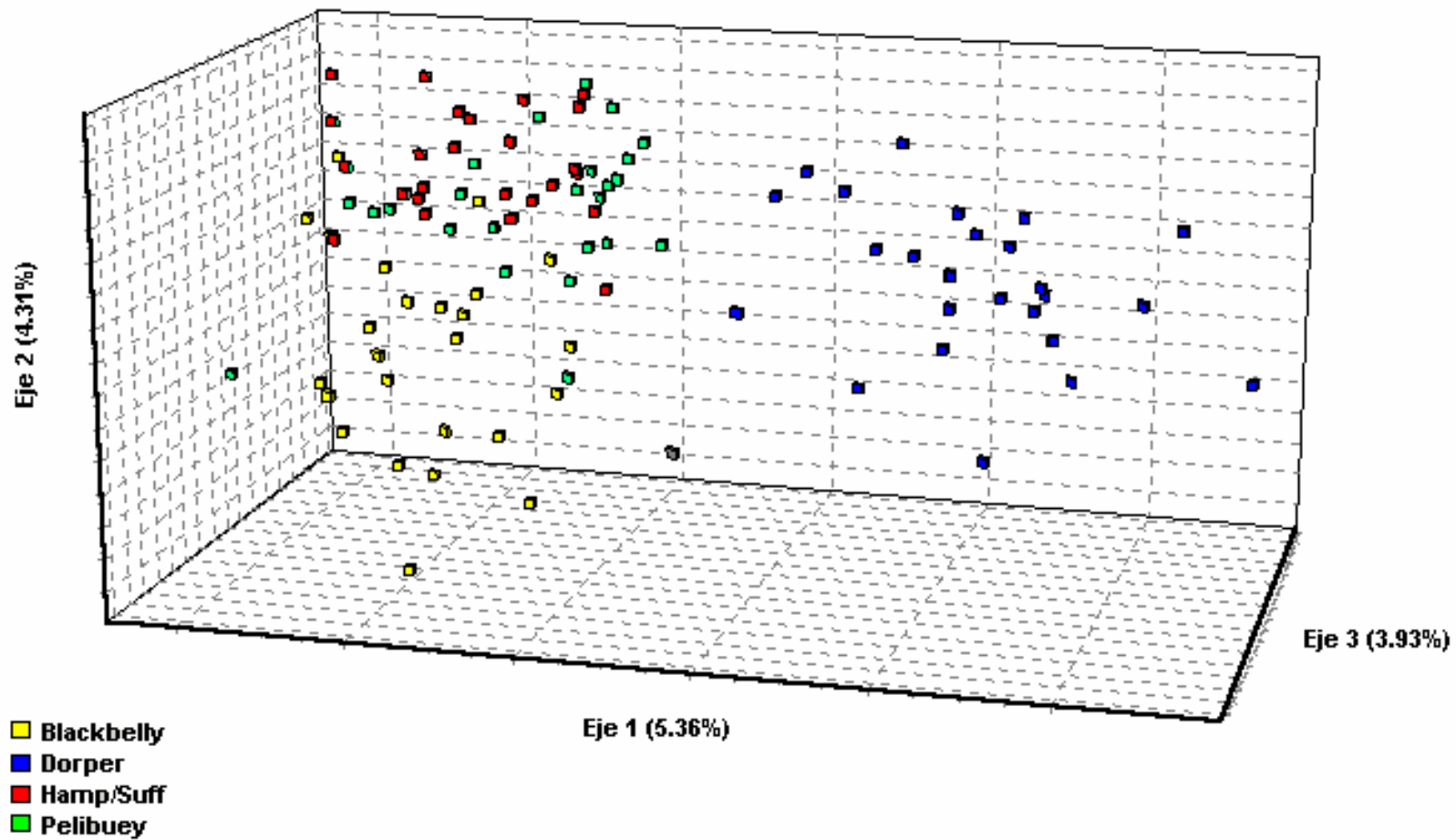


Figura 15. Gráfica tridimensional del AFC obtenido con el panel ovino.

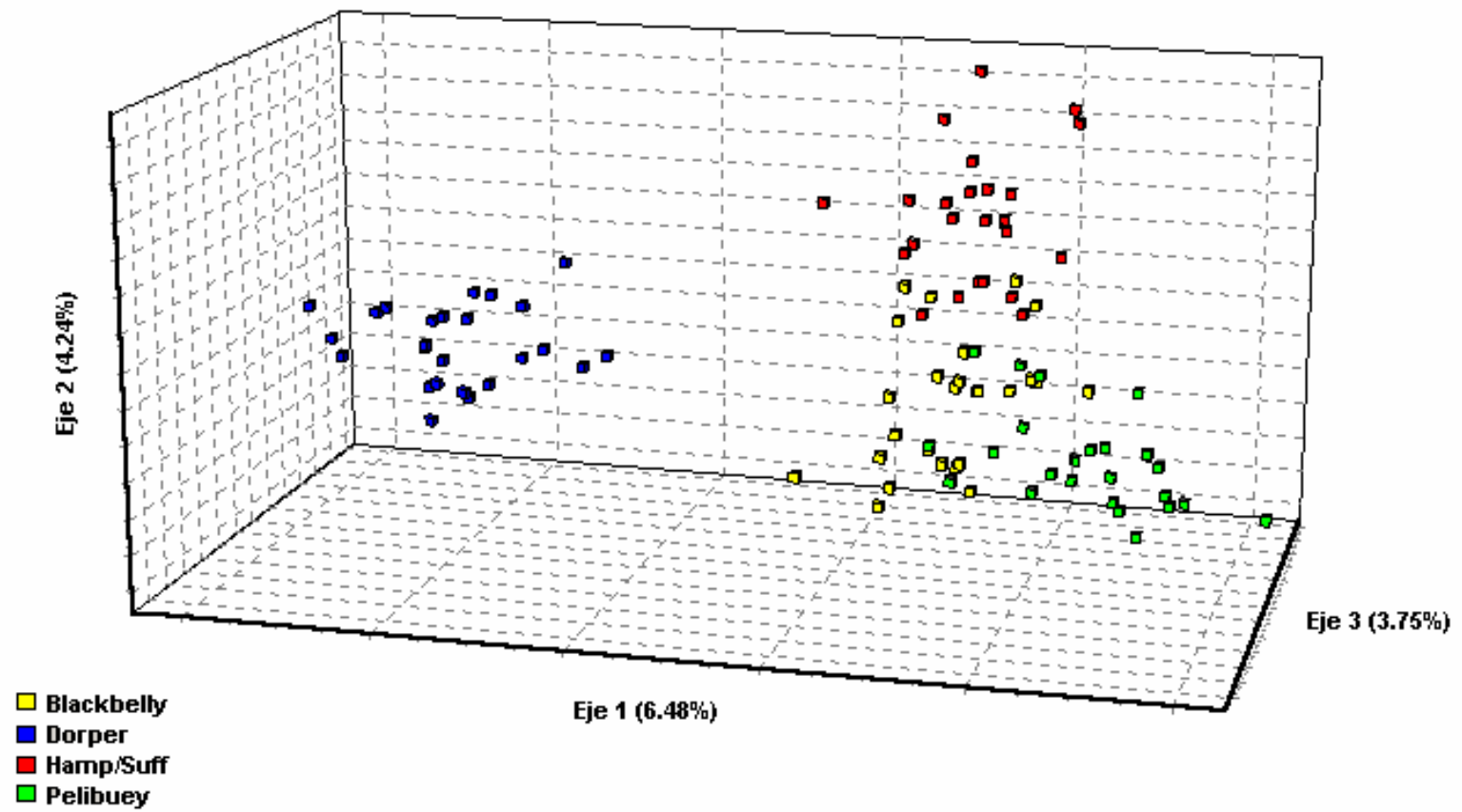


Figura 16. Gráfica tridimensional del AFC obtenido con el panel bovino y ovino de manera simultánea

7.3.5. Distancias Genéticas

El análisis de distancias genéticas de Nei 1972, mostró resultados similares a los del AFC. Al calcular las distancias utilizando los marcadores del panel bovino se muestra que las poblaciones más cercanas son Pelibuey y Blackbelly (0.032) y las más alejadas son Dorper y Pelibuey (0.780) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Distancias genéticas obtenidas con el panel bovino

Marcadores del panel Bovino				
	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey
Blackbelly	0	0.641	0.083	0.032
Dorper		0	0.732	0.78
Hamp/Suff			0	0.098
Pelibuey				0

Las distancias genéticas obtenidas con el panel de marcadores de ovino indicaron que las poblaciones más cercanas fueron F_1 y Blackbelly (0.391), mientras que las más alejadas fueron Dorper y Blackbelly (0.995) (Cuadro 15).

Cuadro15. Resultados del cálculo de distancias con el panel ovino

Marcadores del panel Ovino				
	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey
Blackbelly	0	0.995	0.391	0.522
Dorper		0	0.816	0.803
Hamp/Suff			0	0.477
Pelibuey				0

Las distancias obtenidas utilizando los dos paneles de marcadores de manera simultánea mostraron que las poblaciones más cercanas son Blackbelly y F_1 (0.171), mientras que las más alejadas son Pelibuey y Dorper (1.651) (Cuadro 16)

Cuadro 16. Resultados del cálculo de distancias con los paneles ovino y bovino de manera simultánea.

Panel con los 9 marcadores				
	Blackbelly	Dorper	Hamp/Suff	Pelibuey
Blackbelly	0	0.745	0.171	0.596
Dorper		0	0.758	1.651
Hamp/Suff			0	0.648
Pelibuey				0

El dendrograma obtenido a partir de las distancias calculadas con los dos paneles de marcadores, mostró dos grupos principales; uno de estos grupos formó dos subgrupos; el primero de ellos con las poblaciones Blackbelly y Pelibuey, y el segundo representado por la cruce F_1 . La población Dorper se mostró diferente a las otras tres poblaciones (Figura 17).

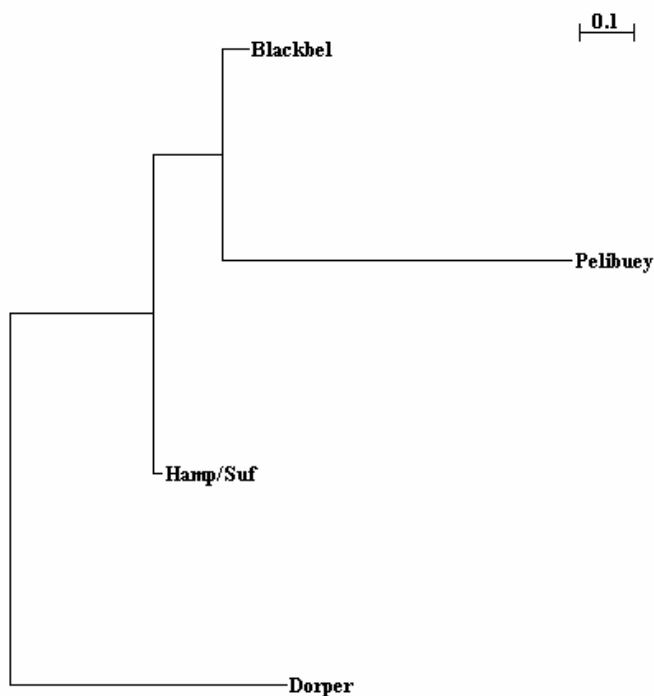


Figura 17. Dendrograma de distancias genéticas.

8. DISCUSIÓN

La ovinocultura en México es una actividad que tiene un gran arraigo cultural y gran importancia comercial; sin embargo, se ha prestado poca atención a la conservación de la diversidad y su aplicación en el mejoramiento genético de los rebaños [SAGARPA, 2001 b]. La tendencia de los últimos años en la ovinocultura mexicana ha sido preferir individuos de raza pura, con la creencia de que su rendimiento es mejor que el de los individuos híbridos o criollos, lo que ha dado como resultado la pérdida progresiva de la diversidad genética de los rebaños. Todas las razas de ovinos que existen en el país han sido de reciente introducción y generalmente el crecimiento de estas poblaciones se ha realizado a partir de un número reducido de individuos, por lo que el acervo genético de estos animales en nuestro país es probablemente menos diverso que en aquellos en los que se generaron dichas razas [Blott *et al.*, 2003].

En este trabajo se establecieron y optimizaron herramientas moleculares para la genotipificación de razas de ovinos. Primero se obtuvo ADN genómico a partir de pelo y papel manchado con sangre. La técnica empleada y optimizada permitió obtener ADN de buena calidad a partir de un promedio de 30 pelos por individuo ó 25 mm² de papel manchado con sangre. Salazar [2002] y De la Rosa [2003] utilizaron 50 ng de ADN genómico para la amplificación por PCR de microsatélites en bovinos; mientras que Arranz *et al.* [2001 a] emplearon 25 ng para la amplificación de microsatélites de ovino. En ambos, casos el ADN fue obtenido a partir de sangre periférica. El ADN obtenido con la técnica descrita en este trabajo, a pesar de ser limitada, resultó ser suficiente para la amplificación eficiente y análisis de nueve de los *loci* propuestos.

Los microsatélites elegidos para conformar el panel bovino habían sido utilizados con éxito para la genotipificación de esa especie [Peelman *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2001; Salazar, 2002] pero su uso no había sido reportado en la especie ovina. De acuerdo con autores como Ellegren *et al.* [1997], Cockett [2001] y Grigaliunaite *et al.* [2003] quienes reportan la aplicación de marcadores genéticos moleculares entre las especies bovina y ovina, se esperaba que los nueve marcadores pudieran ser aplicables en la genotipificación de ovinos para el análisis de diversidad; sin embargo, en una primera fase únicamente se pudieron optimizar las condiciones de amplificación para cuatro de ellos. El *locus* INRA40 no pudo ser amplificado en dos de las cuatro poblaciones

(Blackbelly y Pelibuey), esto coincide con lo reportado por Slate *et al.* [1998] quienes no lograron amplificación con este marcador en una raza ancestral de oveja (*O. aries*) denominada Soay, lo que deja abierta la posibilidad de que este *locus* presente alelos nulos en algunas razas de la especie ovina. La presencia de alelos nulos puede deberse a que uno o ambos sitios de unión de los iniciadores hayan sufrido mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de fragmentos de ADN, lo que impide la amplificación, para confirmar que se trata de alelos nulos la estrategia sugerida es el diseño de nuevos iniciadores, que reconozcan secuencias alternativas cercanas al microsatélite [Callen y Thompson, 1993].

En el caso de los marcadores del panel ovino, sólo uno de seis marcadores fue excluido del análisis, todos los marcadores habían sido utilizados con éxito para establecer el grado de relación genética en ovejas domésticas por Arranz *et al.* [2001], Stahlberger-Saitbekova *et al.* [2000] y variación de la estructura poblacional de Borrego Cimarrón (*O. Canadensis*) por Gutiérrez-Espeleta *et al.* [2000]; y por lo tanto, como se esperaba pudieron ser aplicables también para determinar diversidad genética en poblaciones de ovinos explotados en México.

La genotipificación y el análisis del PIC, (el cual se relaciona directamente con la H_E y conforme este valor se aproxima a 1 indica mayor variabilidad de la población [Perales, 2003]) mostraron que los marcadores de bovino tuvieron menor grado de polimorfismo con respecto a los descritos para ovino (en promedio el PIC del panel ovino fue de 0.75 y el del panel bovino de 0.37); en estudios previos realizados por Ellegren *et al.* [1997] se evaluaron de manera recíproca microsatélites de ovino y bovino para ambas especies, y se observó que el tamaño de los alelos y el polimorfismo generalmente eran mayores en la especie focal con respecto a la especie emparentada, estos investigadores sugieren que se debe a que para la mayoría de los estudios de diversidad genética se prefieren marcadores polimórficos y por lo tanto existe una selección sesgada a favor de estos en las especies que se estudian, y que sin embargo, un marcador que es polimórfico en una especie no necesariamente tiene que ser polimórfico en otra en la que pueda ser aplicable. Con base en los resultados en este trabajo los *loci* del panel ovino, así como el INRA23 y TGLA53 del panel bovino podrían ser aplicables para pruebas de identidad, como por ejemplo asignación de paternidad [DeNise *et al.*, 2003].

El *locus* INRA37 de bovino produjo un solo alelo de 110 pb, el cual estuvo conservado en las cuatro poblaciones ovinas analizadas; este hallazgo coincide con los resultados de un estudio realizado por Slate *et al.* [1998] quienes reportaron que este *locus* al ser analizado en la oveja Soay (*O. aries*), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y venado Sika (*Cervus nippon*) mostró un solo alelo; sin embargo, no se describe el tamaño del alelo en cada una de las especies estudiadas. Este tipo de resultados han despertado interés para explicar los mecanismos de evolución de los microsatélites. A este respecto Ellegren *et al* [1997] sugieren que existe una correlación positiva entre el tamaño de los alelos y el polimorfismo de los *loci* y se ha sugerido que aquellos *loci* con mayor número de repeticiones tienden a aumentar su polimorfismo debido a que la posibilidad de que ocurran malos apareamientos por deslizamiento de las secuencias (slippage) durante la recombinación, es mayor con respecto a aquellos *loci* más cortos [Rubinsztein *et al.*,1995].

Dentro de las aplicaciones que tienen los microsatélites se encuentran los estudios de trazabilidad [Cunningham y Meghen, 2001]. Un requisito indispensable para que un marcador pueda utilizarse en este tipo de estudios es que deben presentar alelos específicos, que no se encuentren en otras especies, razas o variedades de organismos que puedan alterar el producto final. De acuerdo con esto, el marcador INRA37 puede ser utilizado potencialmente como marcador específico de especie para este fin, ya que el alelo observado en las cuatro poblaciones ovinas analizadas es de 110 pb, mientras que el rango alélico reportado en la especie bovina es de 120 a 146 pb. El hallazgo de este *locus* monomórfico en la especie ovina podría tener también una aplicación potencial para realizar estudios evolutivos e incluso, puede ser indicativo de algún tipo de selección direccional asociada con alguna característica deseable en esta especie con interés productivo. Con base en lo anterior se considera necesario realizar estudios más profundos al respecto considerando mayor diversidad de razas ovinas e incluso de otras especies de rumiantes domésticos emparentados filogenéticamente como la cabra (*Capra hircus*).

Todos los *loci* analizados con excepción de ETH10 en la población Pelibuey, se encontraron en desequilibrio genético. Al asociar los resultados del F_{IS} con la H_o y H_e se observó que en todos los casos, excepto BM143 en la población F_1 y TGLA53 en Blackbelly, el valor de F_{IS} fue mayor a 0, lo que se interpreta como un déficit de

heterocigotos, mientras que en los dos casos mencionados el valor de F_{IS} fue menor a 0, lo que se interpreta como que existe un exceso de heterocigotos. El déficit de heterocigotos puede deberse a factores como la consanguinidad debida a la presión selectiva a la que se han sometido las diferentes razas [Li *et al.*, 2004] y la subestructuración poblacional (Efecto Wahlund) [Morera *et al.*, 1999], mientras que el exceso de heterocigotos puede deberse a la introgresión de variantes alélicas nuevas en la población, lo cual esta acorde con la función zootécnica y el tipo de explotación de cada una de las poblaciones, ya que en las tres poblaciones con explotación semiextensiva para producción de animales para abasto (Blackbelly, F_1 Hampshire/Suffolk y Pelibuey), es una práctica común la introducción de individuos provenientes de otras explotaciones sin importar mucho la pureza racial y fue donde se observó un *locus* en equilibrio y dos *loci* con exceso de heterocigotos. Por otro lado, en Dorper, raza que se utiliza en sistema de explotación intensivo, para producir animales para pie de cría, en la cual la introducción de nuevos individuos es más reservada, ya que la pureza racial es muy importante, mostró todos los *loci* en desequilibrio, que puede estar asociada a déficit de heterocigotos por consanguinidad.

Aunado a lo anterior, cabe mencionar que Dorper es la raza de más reciente introducción al país, por lo que esto puede ser un factor más que limite la diversidad genética de la raza [Dotter, 1999]. Es importante señalar que deberán realizarse estudios adicionales que descarten otras variables no consideradas tales como el tamaño de muestra que podría sesgar los resultados al calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El AFC representó la relación genética entre las poblaciones utilizando primero los paneles de bovino y ovino por separado y luego de manera conjunta. El AFC se mostró como método de exploración confiable para determinar las relaciones genéticas entre poblaciones, ya que los resultados obtenidos coincidieron totalmente con los de los cálculos de distancias por el método de Nei, 1972. El grado de polimorfismo observado, así como el número de marcadores empleados para el análisis de diversidad genética entre poblaciones, pueden afectar el poder de diferenciación entre ellas. El panel de bovino, al ser utilizado de manera independiente, tuvo menor poder de diferenciación entre poblaciones, lo que se debe a que los marcadores de bovino fueron menos polimórficos que los de ovino; así mismo, cuando se utilizaron los marcadores de los dos paneles de manera conjunta, el poder para diferenciar entre las poblaciones fue

mayor que cuando se utilizaron por separado. Las poblaciones que mantuvieron mayor relación genética entre sí fueron Blackbelly y Pelibuey; mientras que la F₁ mostró relación con ambas, por su parte la población Dorper no mostró ninguna relación genética con las otras tres poblaciones.

A este respecto, es importante mencionar que las razas Blackbelly, Hampshire, Pelibuey y Suffolk son las de explotación más común en el Valle de Toluca y se han realizado cruza de manera empírica e incluso accidental entre ellas, lo que ha ocasionado que haya intercambio de material genético. Generalmente los ovinocultores que llevan a cabo esta práctica deciden utilizar para su explotación, ya sea razas de lana o de pelo, pero raramente llegan a utilizar de los dos tipos, aunque no es una regla general [Comunicación personal Jorge Osorio Ávalos. CEMEGO-UAEM] por lo que no es raro encontrar que la población Blackbelly haya mostrado mayor relación con la Pelibuey que con la F₁.

Dorper no mostró ninguna relación con las otras tres poblaciones, pues es de introducción más reciente en el país y además en el Valle de Toluca el uso de esta raza no es tan común como el de las otras tres, aunado a que la explotación de donde fueron obtenidas las muestras, tiene como prioridad la pureza racial, pues su objetivo principal es vender animales para pie de cría, por lo tanto, esta población es más cerrada, lo que ha provocado que exista mayor consanguinidad debido a las prácticas endogámicas de reproducción. Es aquí donde cobra importancia el uso de los microsatélites, ya que mediante el establecimiento de programas de evaluación continua de la diversidad de las poblaciones, se puede evitar futuros efectos adversos por el manejo restringido o endogamia en los hatos explotados comercialmente.

Los marcadores microsatélites utilizados en este trabajo fueron capaces de establecer la relación genética entre las poblaciones analizadas; sin embargo, debido a la gran diversidad de razas ovinas, incluyendo individuos criollos, que son explotadas bajo distintas condiciones de manejo en México, es necesario realizar estudios complementarios que incluyan mayor número de razas con tamaños de muestra mayores, así mismo deberán evaluar otros *loci* descritos para ovino y otros rumiantes, ya que se observó que su polimorfismo puede variar con respecto a los reportados previamente. Inclusive, pueden realizarse algunos hallazgos interesantes como el de

INRA37 con posibles aplicaciones en estudios evolutivos o de búsqueda de variantes genéticas de interés productivo y trazabilidad.

9. CONCLUSIONES

Se estableció la aplicabilidad de cuatro marcadores microsatélites empleados en la genotipificación de bovino (*B. taurus*) para realizar estudios de diversidad genética en la especie ovina. El polimorfismo de los microsatélites de bovino en las poblaciones ovinas fue menor al reportado en la propia especie y el marcador INRA37 de bovino mostró una sola forma alélica conservada entre las cuatro poblaciones ovinas analizadas.

Se estableció también la aplicabilidad de cinco marcadores microsatélites empleados en estudios de genotipificación de ovino (*O. aries*) para realizar estudios de diversidad genética en razas de esta especie explotadas en México.

Con los marcadores microsatélites de bovino y ovino optimizados en este trabajo se estableció un panel de nueve marcadores aplicable para el análisis de la diversidad genética de razas ovinas explotadas en México. El uso de los marcadores de bovino y ovino de manera conjunta permite establecer una mejor diferenciación genética de las poblaciones, que cuando son utilizados de manera independiente. El análisis de cuatro poblaciones de ovinos con este panel permitió observar que en general los *loci* se encontraron en desequilibrio de Hardy-Weinberg. Se mostró que las poblaciones Blackbelly y Pelibuey resultaron ser las que mantienen una relación genética más estrecha, mientras que Hampshire/Suffolk se observó relacionada con ambas. Por otro lado Dorper se mostró como una población independiente, lo que está de acuerdo con el tipo y objetivo zootécnico de cada una de las explotaciones.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo permiten establecer las siguientes recomendaciones:

- 1) Emplear los paneles de marcadores utilizados en este trabajo para la evaluación de la diversidad genética de otras explotaciones ovinas, que incluyan a otras razas e individuos criollos.
- 2) Realizar estudios que permitan determinar la aplicabilidad potencial del *locus* INRA37 en la especie ovina, como marcador específico de especie para estudios evolutivos o de trazabilidad.
- 3) Determinar la aplicabilidad de los marcadores usados en este trabajo para correlacionar las frecuencias alélicas con características de interés productivo e iniciar la detección de *loci* asociados a características cuantitativas (QTL's) en razas de ovinos explotados en México.

11. REFERENCIAS

- 1) Aranguren-Méndez J., Jordana J. (2001). Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. Asociación Venezolana de Producción Animal.
- 2) Arbiza S, de Lucas J. (1997). Lana, Producción y características. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México pp 9-10.
- 3) Arranz J., Bayón Y., San Primitivo F. (2001 a). Differentiation among spanish sheep breeds using microsatellites. Genet. Sel. Evol. 33: 529-542.
- 4) Arranz J., Bayón Y., San Primitivo F. (2001 b). Diferenciación entre razas ovinas autóctonas y foráneas aplicando secuencias microsatélites. Arch. Zoot. 50: 27-33.
- 5) Arteaga C. (1999) Problemática de la ovinocultura en México. La ovinocultura en México. Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos.
- 6) Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos (AMCO). (2001). Página Web. Consulta en línea: http://mx.geocities.com/amco_org/ Julio de 2003.
- 7) Belkhir K., Borsa., Chikhi L., Raufaste N., Retén F. (2004). Genetix Version 4.02. Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, France.
- 8) Bello N., Sánchez A. Análisis del polimorfismo genético mediante microsatélites en *Struthio camelus* (Avestruz). Unitat de Genètica i Millora . Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. Consulta en línea: <http://www.dcam.upv.es/acteon/CONGRESOS/Aida99/nbello.htm> Abril 2004.
- 9) Blott S., Williams J., Haley C. (1997). Genetic diversity among european cattle breeds. Roslin Institute Edinburgh, Publications. Consulta en línea:

<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/publications/9697annrep/abst-divers.html> Marzo de 2003.

- 10) Bowling A. (2001). Historical development and application of molecular genetic test for horse identification and parentage control. *Livestock Prod. Sci.* 72: 111-116.
- 11) Burt D., Morrice D., Sewalem A., Smith J., Paton I., Smith E., Bentley J. y Hocking P. (2003). Preliminary linkage map of the turkey (*Meleagris gallopavo*) based on microsatellite markers. *Animal Genet.* 34: 399-409.
- 12) Callen, D. y Thompson A. (1993). Incidence and origen of null alleles in the (AC)_n microsatellites markers. *Am. J. Human Genet.* 52: 922-927.
- 13) Ciampolini R., Moazami-Gourdazi K., Vaiman D., Dillman C., Mazzanti E., Foulley J., Leveziel H., Cianci D. (1995). Individual *multilocus* genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between italian beef cattle breeds. *J. Animal Sci.* 73: 3259-3268.
- 14) Cockett N. (1999). *Genomics of Sheep*. AgBiotechNet. Vol 1. April. pp. 1-3.
- 15) Cockett N., Jackson S., Snowden G., Shay T., Berghmans., Beever J., Carpenter C., Georges M. (1999 a). The Callipyge phenomenon: Evidence for unusual genetic inheritance. *J. Animal Sci.* 77: 221-227.
- 16) Cockett N., Shay T., Beever J., Nielsen D., Albertsen J., Georges M., Peterson K., Stephens A., Vernon W., Timofeevskaja O., South S., Mork J., Maciulis A., Bunch T. (1999 b). Localization of the *locus* causing spider lamb syndrome to the distal end of ovine chromosome 6. *Mamm. Genome* 10: 35-38.
- 17) Cockett N., Shay T., Smit M. (2001). Analysis of the sheep genome. *Physiol. Genomics* 7: 69-78.

- 18) Cunningham E., Meghan C. (2001). Biological identification systems: genetic markers. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 20: 491-499.
- 19) DeNise S., Johnston E., Halverson J., Marshall K., Rosenfeld D., McKenna S., Sharp T., Edwards J. (2003). Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *International Society for Animal Genetics*. pp1-4.
- 20) De la Rosa X. (2003). Evaluación de regiones asociadas a ganancia de peso en el genoma de individuos de la raza Beefmaster. Tesis de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa Tamps.
- 21) Dotter R. (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J. Animal Sci.* 77:61-69.
- 22) Dunner S., Cañón J. Aplicaciones de genómica en laboratorios de producción animal. Consulta en línea: <http://www.exopol.com/general/circulares/185.pdf> Julio de 2003.
- 23) Ellegren H., Moore S., Robinson N., Byrne K., Ward W., Sheldons B.C. (1997) Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous *loci* in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol.* 14: 854-860.
- 24) Enoteca recursos zoogenéticos del Uruguay (ERZU). Razas Ovinas. Consulta en línea: <http://arapey.unorte.edu.uy/amga/multimedia/ovinos/index> Julio de 2003.
- 25) FAO. Base de datos estadísticos FAOSTAT. Consulta en línea: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture&language=ES>. Octubre de 2004.
- 26) FitzSimmons N., Moritz C., Moore S. (1995) Conservation and dynamics of microsatellite *loci* over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* 12: 432-440.

- 27) Fox D. y Myers P. (2001) "Bovidae" Animal Web Diversity. Consulta en línea: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Bovidae.html>. Agosto de 2004.
- 28) García R. (2001). Huellas dactilares del ADN. Consulta en línea: <http://www.jornada.unam.mx/2001/mar01/010312/cien-huellas.html> Abril de 2003.
- 29) García de León F. (2003). Análisis de datos genéticos en ganado bovino. Memorias del Curso-Taller "Genotipificación de especies de interés económico-ecológico". 28-30 Octubre. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa Tamps.
- 30) Gardner E., Simmons M., Snustad D. (1998). Principios de genética. Colección Textos Politécnicos. Serie Biotecnologías. Noriega-UTEHA. México.
- 31) Goldstein D.B., Schlötterer (1999). Microsatellites. Evolution and applications. Oxford University Press. New York.
- 32) Grigaliunaite I., Tapio M., Kantanen J. Characterization of genetic diversity in domestic sheep. Consulta en línea: <http://www.agronet.fi/maataloustieteellinenseura/julkaisut/poste/kj03grida.pdf> Febrero de 2004
- 33) Grigaliunaite I., Tapio M., Viinalass H., Grislis Z., Kantanen J., Miceikienė I. (2003) Microsatellite variation in the baltic sheep breeds. Vet. Zoot. 21: 66-73.
- 34) Gutiérrez-Espeleta G., Kalinowsky S., Boyce W., Hedrick P. (2000). Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. Conservation Genet. 1: 3-15.
- 35) Haley C., Visscher P. (2000). DNA markers and genetic testing in farm animal improvement: Current applications and future prospects. Roslin Institute

- Edinburgh, Publications. Consulta en línea:
<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/publications> Marzo de 2003.
- 36) Leymaster K.A. (2002) Fundamental aspects of crossbreeding of sheep: Use of breed diversity to improve efficiency production. *Sheep and Goat J.* 17: 50-59.
- 37) Lewin B. (2001) *Genes VII*. Edición en español. Oxford University Press. Marban Libros, S.L. Madrid..
- 38) Li S., Yang S., Zhao S., Fan B., Yu M., Wang H., Li M., Liu B., Xiong T., Li K. (2001) Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites. *J. Animal Sci.* 82: 368-374.
- 39) LI-COR (1999). *Genetic Analysis Manual*. Lincoln Nebraska. USA.
- 40) LI-COR (2002). *SAGA™ Automated microsatellite software. Tutorial manual*. Lincoln, Nebraska. USA.
- 41) Liu B. (1998) *Statistical Genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC Press. E.U.A.
- 42) Liu Z. y Cordes J. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- 43) López R. La ovinocultura, una industria en ciernes que promete buenos resultados. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAT. Consulta en línea: <http://fmvz.uat.edu.mx/Investigacion/alfabetico/ovinos2.pdf> Mayo de 2003.
- 44) MacHugh E. (1996). *Molecular biogeography and genetics structure of domesticated cattle*. Ph. D. Thesis. Department of Genetics. Trinity College, University of Dublin.

- 45) Marshall T., Slate J., Krukk L., Pemberton J. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- 46) McPherson M., Møller S. (2000). *PCR The basics from background to bench.* Springer-Verlag New York.
- 47) Medrano J. (2000). Recursos animales locales del centro de México. *Arch. Zoot.* 49: 385-390.
- 48) Moore S., Li C., Hansen C., Snelling W., Basarab J., Murdoch B., Benkel B. (2001). The bovine genome map and molecular approaches to genetic improvement. Roslin Institute.
- 49) Morera L., de Andrés D., Barbancho M., Garrido J., Barba C. (1999). Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano español. *Arch. Zoot.* 48: 63-70.
- 50) Morin P., Mahboubi P., Wedel S., Rogers J. (1998). Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: Allele size is conserved, but allele number is not. *Genomics* 53: 12-20.
- 51) National Biological Information Infrastructure (NBII). Introduction to genetic diversity. Consulta en línea: <http://genetics.nbi.gov/GeneticDiversity.html> Mayo de 2004.
- 52) O'Brien S., Menotti-Raymond M., Murphy W., Nash W., Wienberg J., Stanyon R., Copeland N., Jenkins N., Womack J., Marshall Graves J. (1999) The promise of comparative genomics in mammals. *Science* 286: 458-481.
- 53) Oklahoma State University (OSU). Department of animal science. Breeds of livestock Consulta en línea: <http://www.ansi.okstate.edu/breeds/sheep> Julio de 2003.

- 54) Peelman L., Mortiaux F., Van Zeveren A., Dansercoer A., Mommens G., Coopman F., Bouquet Y., Burny A., Renaville R., Portetelle D. (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *J. Animal Genet.* 29: 161-167.
- 55) Perales L. (2003). Caracterización molecular del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) de granjas de cultivo del Estado de Tamaulipas. Tesis de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa Tamps.
- 56) Perezgrovas G. (1998) Comparación de recursos genéticos: El borrego Chiapas (México) y las razas autóctonas de origen español. *Arch. Zoot.* 47: 425-430.
- 57) PPL Therapeutics. Transgenic sheep (*Ovis aries*). Consulta en línea: <http://www.agresearch.co.nz/scied/search/biotech/gmosheep.pdf> Julio de 2004.
- 58) Rubinsztein D., Amos W., Leggo J., Goodburn S., Jain S., Li S., Margolis L., Ross C., Ferguson-Smith M. (1995). Microsatellite evolution-evidence for directionality and variation in rate between species. *Nat. Genet.* 10: 337-343.
- 59) Salazar E. (2002) Evaluación de nueve marcadores microsatélites para la genotipificación de ganado bovino. Tesis de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Reynosa Tamps.
- 60) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2001 a). Programa Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios (PNRGP).
- 61) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2001 b). Informe sobre la situación de los Recursos Genéticos Pecuarios (RGP)
- 62) Sifuentes A. Sánchez A. Cienfuegos E. (2004) PCR-Ready genomic DNA isolation from hair samples using the ReadyAmp™ genomic DNA purification

- system. Consulta en línea:
<http://www.promega.com/enotes/applications/shell.htm?article=app55> Agosto
de 2004.
- 63) Smith S., Zembayashi M., Lunt D., Sanders J., Gilbert C. (2001). Carcass traits and microsatellite distributions in offspring of sires from three geographical regions of Japan. *J. Animal. Sci.* 79: 3041-3051.
- 64) Stahlberger-Saitbekova N., Schläpfer J., Dolf G., Gaillard C. (2001). Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J. Animal. Breed. Genet.* 118: 379-387.
- 65) U.S. Meat Animal Research Center (US-MARC). Sheep Genome Mapping Project. Consulta en línea: <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>
Mayo de 2003.
- 66) Walling G., Visscher P., Simm G., Bishop S. (2001) Confirmed linkage for QTLs affecting muscling in Texel sheep on chromosomes 2 and 18. Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Budapest, Hungary. August 2001.
- 67) Walling G., Visscher P., Wilson A., McTeir B., Simm G., Bishop S. (2004) Mapping of quantitative trait *loci* for growth and carcass traits in commercial sheep populations. *J. Anim. Sci.* 82 : 2234-2245.
- 68) Weir B. (1996) Genetic Data Analysis. Sinauer Associates. Publishers. Sunderland Massachusetts.
- 69) Wheeler C., Fernández M., Rosadio R., Hoces D., Kadwell M. y Bruford M. (2001). Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú. *Visión Veterinaria.* Consulta en línea:
<http://www.visionveterinaria.com/articulos/26.htm> Abril de 2004.

12. ANEXOS

ANEXO A-1

Matriz de datos para su análisis en el programa Cervus 2.0 elaborada con los tamaños alélicos obtenidos de la genotipificación en el programa SAGA^{GT}. Corresponde a los loci de los microsatélites de bovino. En la columna de la izquierda se muestran números consecutivos que corresponden a: 1-25 individuos de la población Blackbelly, 26-50 individuos de la población Dorper, 51-75 individuos de la población Hampshire/Suffolk y 76-100 individuos de la población Pelibuey. Las formas alélicas para cada *locus* se denotan como A y B los valores numéricos son los correspondientes a los tamaños alélicos en pb.

	ETH10A	ETH10B	INRA23A	INRA23B	INRA37A	INRA37B	TGLA53A	TGLA53B
1	197	197	213	213	110	110	156	144
2	197	197	207	215	110	110	144	146
3	197	197	203	209	110	110	144	150
4	197	197	199	211	110	110	160	146
5	197	197	199	213	110	110	160	144
6	197	197	199	211	110	110	148	148
7	197	197	199	211	110	110	154	146
8	197	197	215	215	110	110	148	152
9	197	197	201	215	110	110	160	146
10	197	197	201	213	110	110	144	144
11	197	197	201	201	110	110	144	148
12	197	197	213	213	110	110	144	148
13	197	197	199	217	110	110	160	148
14	197	197	215	215	110	110	144	146
15	197	197	217	217	110	110	148	152
16	197	197			110	110	154	162
17	197	197	207	213	110	110	160	146
18	203	203	201	213	110	110		
19	197	197	199	211	110	110	154	160
20	197	197	211	211	110	110	144	148

21	197	197	201	211	110	110	144	152
22	197	197	199	209	110	110	160	150
23	197	197	201	201	110	110	160	160
24	197	197	201	215	110	110		
25	197	197	211	211	110	110	158	148
26	199	199	199	199	110	110	144	144
27	199	199	203	215	110	110	154	144
28	199	199	205	215	110	110	154	144
29	199	199	199	199	110	110	144	144
30	199	199	199	213	110	110	154	154
31	199	199	213	213	110	110	144	144
32	199	199	199	199	110	110	144	144
33	199	199	203	213	110	110	144	144
34	199	199	199	207	110	110	144	144
35	199	199	199	213	110	110	144	144
36	199	199	199	199	110	110	144	144
37	199	199	207	213	110	110	144	152
38	199	199	199	213	110	110	144	144
39	199	199	199	213	110	110	136	144
40	199	199	199	215	110	110	144	144
41	201	201	203	213	110	110	144	144
42	199	199	199	215	110	110	144	144
43	199	199	203	213	110	110	144	144
44	199	199	199	199	110	110	154	144
45	199	213	205	215	110	110	144	144
46	199	199	195	199	110	110	144	144
47	199	199	199	199	110	110	144	144
48	199	193	199	213	110	110	144	144
49	199	199	199	215	110	110	144	144
50	199	199	199	199	110	110	144	144
51	197	197	201	215	110	110	156	148
52	197	197	207	207	110	110	158	148
53	197	197	207	213	110	110	158	152
54	197	197	203	209	110	110	140	144
55	197	197	209	213	110	110	140	144
56	197	197	207	219	110	110	158	140

57	197	197	207	215	110	110	158	148
58	197	197	201	219	110	110	154	142
59	197	197	201	219	110	110	156	144
60	197	197	207	207	110	110	156	140
61	197	197	207	207	110	110	158	140
62	197	197			110	110	174	144
63	197	197	205	217	110	110	174	144
64	197	197	201	207	110	110	156	144
65	197	197	207	207	110	110	156	148
66	197	197	207	217	110	110	144	144
67	197	197	209	209	110	110	156	156
68	197	197			110	110	156	142
69	197	197	209	217	110	110	142	142
70	197	197	207	207	110	110	144	144
71	197	197	201	211	110	110	156	144
72	197	197			110	110	142	142
73	197	197	205	217	110	110	142	142
74	197	197			110	110	156	144
75	197	197	207	217	110	110	156	144
76	197	197			110	110	160	148
77	197	197	207	215	110	110	154	160
78	197	197	209	213	110	110	160	146
79	197	197	201	213	110	110	160	144
80	197	197	217	217	110	110	146	146
81	197	197	201	213	110	110	158	158
82	197	197	211	215	110	110	160	144
83	197	197			110	110	160	148
84	197	197			110	110	160	160
85	197	197			110	110	148	148
86	197	197			110	110	160	144
87	197	197			110	110	160	148
88	197	197	201	213	110	110	146	146
89	197	197	205	213	110	110	158	152
90	197	197	219	219	110	110	158	148
91	197	197			110	110		
92	197	197	213	213	110	110	146	146

93	197	197	201	213	110	110	160	160
94	197	197	201	213	110	110	160	148
95	197	197	219	219	110	110	160	160
96	197	197			110	110	144	144
97	197	209	217	217	110	110	158	158
98	197	197			110	110		
99	197	197	201	215	110	110	156	144
100	197	197	215	217	110	110	158	146

ANEXO A-2

Matriz de datos para su análisis en el programa Cervus 2.0 elaborada con los tamaños alélicos obtenidos de la genotipificación en el programa SAGA^{GT}, correspondiente a los *loci* de los microsatélites de ovino. En la columna de la izquierda se muestran números consecutivos que corresponden a: 1-25 individuos de la población Blackbelly, 26-50 individuos de la población Dorper, 51-75 individuos de la población Hampshire/Suffolk y 76-100 individuos de la población Pelibuey. Las formas alélicas para cada *locus* se denotan como A y B los valores numéricos representan a los tamaños alélicos en pb.

	BM143A	BM143B	BM6444A	BM6444B	MAF36A	MAF36B	MAF70A	MAF70B	OarFCB11A	OarFCB11B
1	103	111	138	144	108	108	133	147	128	128
2	101	105	138	144	104	108	147	147	138	138
3	105	113	130	138	104	108	135	135		
4	105	105	130	130	108	110	135	135	132	122
5	097	101	148	126	102	102	135	135	128	128
6	101	101	114	138	108	108	135	135	122	122
7	103	103	114	142	108	108	135	135	128	130
8	099	105	126	130	106	108	129	137		
9	097	111	126	144	106	108	133	133		
10	097	109	148	130	104	104	137	153	128	136
11	103	111	114	114	110	126	137	153	124	126
12	095	095	148	132	106	110	135	153		
13	105	111	126	130	100	104	133	133	128	124
14	095	103	148	138	108	108	135	135		
15	105	105	140	140	104	110	135	135	120	124
16			130	130	108	108	137	155	128	138
17	109	109	126	138	108	126	135	135		
18	105	105	126	138	102	108	135	135	124	124
19	105	105	114	114	106	128			124	124
20	103	111	114	142	108	128	135	135	126	126
21	097	101	148	138	110	126	135	147		
22	097	105	128	138	104	112	135	135		
23	105	113	130	132	104	108	135	135		

24	105	113	148	130	106	110	135	135	126	126
25	101	105	114	130	108	110	135	135		
26	097	103	116	116	104	120	143	157	112	124
27	103	103	132	132	120	120	137	145	134	134
28	105	115	116	116	120	120	137	147	134	134
29	097	115	116	116	120	126	135	145	138	138
30	103	103	134	134	120	120	139	151	126	138
31	103	115	116	116	112	120	143	143	138	138
32	097	105	134	134	120	120	135	143	138	138
33	103	103	116	116	120	120	137	137	138	138
34	097	105	162	162	120	120	137	137	126	126
35	105	113	134	164	120	120	137	143	136	124
36	101	107	116	116	110	118	135	145	136	126
37	105	105	116	134	120	120	131	149	126	126
38	103	115	132	132	112	120	137	145	136	126
39	105	115	134	134	112	120	137	149	134	122
40	105	105	116	116	112	122	135	135	124	124
41	103	103	118	118	112	120			136	136
42	105	105	118	134	112	124	137	145	136	142
43	105	105	150	152	112	120	135	149	136	136
44	097	097	118	118	100	120	135	135	136	136
45	101	115	116	116	118	118	135	151	126	126
46	103	105	116	116	120	120	135	157	136	124
47	105	105	132	132	120	120	137	137	136	140
48	105	105	116	134	120	120	137	137	124	126
49	105	115	118	134	120	120	137	145	136	124
52	103	103	162	162	120	120	135	149	134	136
51	105	105	128	128	100	110	133	157	128	140
52	105	111	128	136	102	120	133	133	136	136
53	097	105	122	122	102	104	133	155	126	140
54	105	111	126	126	104	114	137	151	128	124
55	105	111	134	150	104	122	137	137	128	124
56	109	113	148	152	104	104	145	151	124	138
57	105	105	126	134	106	106	135	139	124	138
58	097	105	126	126	096	098	137	157	124	138
59	105	105	128	128	104	106	135	157	126	138

60	105	113	128	128	104	106	137	145	126	140
61	109	113	150	150	102	120	135	155	124	138
62	097	099	130	130	104	116	135	135	128	124
63	109	113	150	150	108	124	137	137	128	124
64	103	107	150	150	100	104	135	155	124	138
65	109	113	126	126	104	120	135	155	128	124
66	097	105	124	124	102	104	135	135	124	124
67	109	113	126	150	106	124	133	155	124	124
68	105	111	126	126	102	116	135	135	136	124
69	105	113	122	128	108	124	135	155	128	128
70	097	099	128	128	116	124	133	133	128	124
71	111	111	128	128	106	106	133	151	124	138
72	105	113	152	152	108	120	133	133	124	138
73	111	113	152	152	104	124	135	155	136	124
74	105	113	152	152	110	120	135	135	138	138
75	105	113	128	128	104	104	135	145	140	140
76	105	105	148	148	110	128	137	137		
77	105	109	132	132	126	128	133	147	126	126
78	101	109	132	132	102	102	137	137	128	134
79	101	105	128	132	106	106	137	137		
80	109	109	148	148	108	108	131	133	132	132
81	097	097	132	132	104	104	137	153		
82	105	105	138	138	108	108	137	151	134	138
83	107	111	146	146	102	106	137	151	126	140
84	097	105	132	146	104	104	153	153	136	126
85	107	111	148	138	106	128	137	137	128	128
86	097	105	132	132	102	112	137	155	128	128
87	105	105	132	132	102	102	131	137	124	138
88	097	105	128	128	106	106	131	137	128	136
89	097	107	128	128	106	106	149	149	124	138
90	105	105	134	142	104	104	133	133	128	128
91	097	105	130	138	106	106	137	137		
92	105	111	148	148	102	126	133	133		
93	105	109	148	148	102	126	133	133	128	136
94	099	105	148	130	106	106	135	135	128	140
95	097	097	148	142	106	110	137	137	126	126

96	099	111	148	132	104	104	137	137	134	126
97	109	113	134	134	104	108	137	137	126	126
98	099	111	148	148	106	106	137	155	136	126
99	105	105	128	128	104	104	149	149	122	138
100			116	116	108	108	135	135	128	134

ANEXO B-1

Matriz de datos para su análisis en el programa Genetix 4.02 elaborada y editada a partir de la matriz para el análisis con el programa Cervus 2.0. Corresponde a los *loci* de los microsatélites de ovino. La columna de la izquierda contiene la identidad de cada individuo en formato alfanumérico B1-25 corresponde a la población Blackbelly, D26-50 a la población Dorper, H51-75 a la población Hampshire/Suffolk y P76-100 a la población Pelibuey. Genetix reconoce genotipos completos de cada individuo para cada *locus*, por lo que los tamaños alélicos por *locus* para cada individuo se agrupan en una sola celda con 6 dígitos, por ejemplo: el genotipo 144, 156 será 144156, mientras que 97, 109 será 097109. Cuando no existen datos del genotipo el valor se representa como 000000.

	BM143	BM6444	MAF36	MAF70	OarFCB11
B1	103111	138144	108108	133147	128128
B2	101105	138144	104108	147147	138138
B3	105113	130138	104108	135135	000000
B4	105105	130130	108110	135135	132122
B5	097101	148126	102102	135135	128128
B6	101101	114138	108108	135135	122122
B7	103103	114142	108108	135135	128130
B8	099105	126130	106108	129137	000000
B9	097111	126144	106108	133133	000000
B10	097109	148130	104104	137153	128136
B11	103111	114114	110126	137153	124126
B12	095095	148132	106110	135153	000000
B13	105111	126130	100104	133133	128124
B14	095103	148138	108108	135135	000000
B15	105105	140140	104110	135135	120124
B16	000000	130130	108108	137155	128138
B17	109109	126138	108126	135135	000000
B18	105105	126138	102108	135135	124124
B19	105105	114114	106128	000000	124124
B20	103111	114142	108128	135135	126126
B21	097101	148138	110126	135147	000000
B22	097105	128138	104112	135135	000000

B23	105113	130132	104108	135135	000000
B24	105113	148130	106110	135135	126126
B25	101105	114130	108110	135135	000000
D1	097103	116116	104120	143157	112124
D2	103103	132132	120120	137145	134134
D3	105115	116116	120120	137147	134134
D4	097115	116116	120126	135145	138138
D5	103103	134134	120120	139151	126138
D6	103115	116116	112120	143143	138138
D7	097105	134134	120120	135143	138138
D8	103103	116116	120120	137137	138138
D9	097105	162162	120120	137137	126126
D10	105113	134164	120120	137143	136124
D11	101107	116116	110118	135145	136126
D12	105105	116134	120120	131149	126126
D13	103115	132132	112120	137145	136126
D14	105115	134134	112120	137149	134122
D15	105105	116116	112122	135135	124124
D16	103103	118118	112120	000000	136136
D17	105105	118134	112124	137145	136142
D18	105105	150152	112120	135149	136136
D19	097097	118118	100120	135135	136136
D20	101115	116116	118118	135151	126126
D21	103105	116116	120120	135157	136124
D22	105105	132132	120120	137137	136140
D23	105105	116134	120120	137137	124126
D24	105115	118134	120120	137145	136124
D25	103103	162162	120120	135149	134136
H1	105105	128128	100110	133157	128140
H2	105111	128136	102120	133133	136136
H3	097105	122122	102104	133155	126140
H4	105111	126126	104114	137151	128124
H5	105111	134150	104122	137137	128124
H6	109113	148152	104104	145151	124138
H7	105105	126134	106106	135139	124138
H8	097105	126126	096098	137157	124138

H9	105105	128128	104106	135157	126138
H10	105113	128128	104106	137145	126140
H11	109113	150150	102120	135155	124138
H12	097099	130130	104116	135135	128124
H13	109113	150150	108124	137137	128124
H14	103107	150150	100104	135155	124138
H15	109113	126126	104120	135155	128124
H16	097105	124124	102104	135135	124124
H17	109113	126150	106124	133155	124124
H18	105111	126126	102116	135135	136124
H19	105113	122128	108124	135155	128128
H20	097099	128128	116124	133133	128124
H21	111111	128128	106106	133151	124138
H22	105113	152152	108120	133133	124138
H23	111113	152152	104124	135155	136124
H24	105113	152152	110120	135135	138138
H25	105113	128128	104104	135145	140140
P1	105105	148148	110128	137137	000000
P2	105109	132132	126128	133147	126126
P3	101109	132132	102102	137137	128134
P4	101105	128132	106106	137137	000000
P5	109109	148148	108108	131133	132132
P6	097097	132132	104104	137153	000000
P7	105105	138138	108108	137151	134138
P8	107111	146146	102106	137151	126140
P9	097105	132146	104104	153153	136126
P10	107111	148138	106128	137137	128128
P11	097105	132132	102112	137155	128128
P12	105105	132132	102102	131137	124138
P13	097105	128128	106106	131137	128136
P14	097107	128128	106106	149149	124138
P15	105105	134142	104104	133133	128128
P16	097105	130138	106106	137137	000000
P17	105111	148148	102126	133133	000000
P18	105109	148148	102126	133133	128136
P19	099105	148130	106106	135135	128140

P20	097097	148142	106110	137137	126126
P21	099111	148132	104104	137137	134126
P22	109113	134134	104108	137137	126126
P23	099111	148148	106106	137155	136126
P24	105105	128128	104104	149149	122138
P25	000000	116116	108108	135135	128134

ANEXO B-2

Matriz de datos para su análisis en el programa Genetix 4.02 elaborada y editada a partir de la matriz para el análisis con el programa Cervus 2.0. Corresponde a los *loci* de los microsatélites de bovino. La columna de la izquierda contiene la identidad de cada individuo en formato alfanumérico B1-25 corresponde a la población Blackbelly, D26-50 a la población Dorper, H51-75 a la población Hampshire/Suffolk y P76-100 a la población Pelibuey.

	ETH10	INRA23	INRA37	TGLA53
B1	197197	213213	110110	156144
B2	197197	207215	110110	144146
B3	197197	203209	110110	144150
B4	197197	199211	110110	160146
B5	197197	199213	110110	160144
B6	197197	199211	110110	148148
B7	197197	199211	110110	154146
B8	197197	215215	110110	148152
B9	197197	201215	110110	160146
B10	197197	201213	110110	144144
B11	197197	201201	110110	144148
B12	197197	213213	110110	144148
B13	197197	199217	110110	160148
B14	197197	215215	110110	144146
B15	197197	217217	110110	148152
B16	197197	000000	110110	154162
B17	197197	207213	110110	160146
B18	203203	201213	110110	000000
B19	197197	199211	110110	154160
B20	197197	211211	110110	144148
B21	197197	201211	110110	144152
B22	197197	199209	110110	160150
B23	197197	201201	110110	160160
B24	197197	201215	110110	000000
B25	197197	211211	110110	158148
D1	199199	199199	110110	144144
D2	199199	203215	110110	154144

D3	199199	205215	110110	154144
D4	199199	199199	110110	144144
D5	199199	199213	110110	154154
D6	199199	213213	110110	144144
D7	199199	199199	110110	144144
D8	199199	203213	110110	144144
D9	199199	199207	110110	144144
D10	199199	199213	110110	144144
D11	199199	199199	110110	144144
D12	199199	207213	110110	144152
D13	199199	199213	110110	144144
D14	199199	199213	110110	136144
D15	199199	199215	110110	144144
D16	201201	203213	110110	144144
D17	199199	199215	110110	144144
D18	199199	203213	110110	144144
D19	199199	199199	110110	154144
D20	199213	205215	110110	144144
D21	199199	195199	110110	144144
D22	199199	199199	110110	144144
D23	199193	199213	110110	144144
D24	199199	199215	110110	144144
D25	199199	199199	110110	144144
H1	197197	201215	110110	156148
H2	197197	207207	110110	158148
H3	197197	207213	110110	158152
H4	197197	203209	110110	140144
H5	197197	209213	110110	140144
H6	197197	207219	110110	158140
H7	197197	207215	110110	158148
H8	197197	201219	110110	154142
H9	197197	201219	110110	156144
H10	197197	207207	110110	156140
H11	197197	207207	110110	158140
H12	197197	000000	110110	174144
H13	197197	205217	110110	174144
H14	197197	201207	110110	156144
H15	197197	207207	110110	156148

H16	197197	207217	110110	144144
H17	197197	209209	110110	156156
H18	197197	000000	110110	156142
H19	197197	209217	110110	142142
H20	197197	207207	110110	144144
H21	197197	201211	110110	156144
H22	197197	000000	110110	142142
H23	197197	205217	110110	142142
H24	197197	000000	110110	156144
H25	197197	207217	110110	156144
P1	197197	000000	110110	160148
P2	197197	207215	110110	154160
P3	197197	209213	110110	160146
P4	197197	201213	110110	160144
P5	197197	217217	110110	146146
P6	197197	201213	110110	158158
P7	197197	211215	110110	160144
P8	197197	000000	110110	160148
P9	197197	000000	110110	160160
P10	197197	000000	110110	148148
P11	197197	000000	110110	160144
P12	197197	000000	110110	160148
P13	197197	201213	110110	146146
P14	197197	205213	110110	158152
P15	197197	219219	110110	158148
P16	197197	000000	110110	000000
P17	197197	213213	110110	146146
P18	197197	201213	110110	160160
P19	197197	201213	110110	160148
P20	197197	219219	110110	160160
P21	197197	000000	110110	144144
P22	197209	217217	110110	158158
P23	197197	000000	110110	000000
P24	197197	201215	110110	156144
P25	197197	215217	110110	158146

13. GLOSARIO

Alelo: Forma alternativa de un gen situado en un *locus* particular en un par de cromosomas homólogos. Se segrega durante la meiosis y el hijo recibe solo uno de cada par de alelos de cada progenitor.

Amplificación inter-especies: La aplicación de marcadores genéticos generados a partir del genoma en una especie en particular, para amplificar en el genoma de otra especie con la que guarda algún tipo de relación filogenética.

Biotipo productivo: Conjunto de individuos de una especie que comparten un mismo fenotipo de características productivas.

Clonación: Separación y propagación de una unidad biológica individual (por ejemplo una célula bacteriana) a partir de una población de unidades ligeramente diferentes.

Codominante: Un marcador genético en el que se puede distinguir entre un individuo homocigoto y uno heterocigoto.

Cromosoma Acrocéntrico: Cromosoma cuyo centrómero se encuentra muy próximo a uno de los extremos.

Cromosoma Metacéntrico: Cromosoma cuyo centrómero se encuentra a la mitad del mismo.

Cromosoma Telocéntrico: Cromosoma cuyo centrómero se encuentra en uno de los extremos.

De novo: La obtención de secuencias y marcadores genéticos, por primera vez a partir del genoma de una especie.

Distancia Genética: Un estimador del tiempo de separación de las especies que está basado en diferencias genéticas medibles dentro y entre poblaciones.

Diversidad Genética: Las diferentes versiones de los genes existentes en los individuos de una especie.

Electroforesis: Migración de partículas sometidas a un campo eléctrico.

Endogamia: Apareamiento entre individuos de un mismo linaje.

Equilibrio de Hardy-Weinberg: Estado en el cual las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación en una población grande con apareamientos aleatorios, sin mutación, selección, migración o deriva genética.

Eucariote: Célula u organismo (uni o multicelular) con un núcleo rodeado por una doble membrana, presenta el material genético arreglado en cromosomas, además de otros organelos limitados por membranas dobles.

Fenotipo: Naturaleza física bioquímica y fisiológica de un individuo, determinada, tanto por su genotipo como por el ambiente en el cual se desarrolla.

Gen: Unidad funcional de la herencia que codifica para un cierto producto funcional (proteína).

Genoma: La información genética total, almacenada en los cromosomas de una célula viva o en un virus.

Genotipo: Constitución genética específica de un *locus* o juego de *loci* de un organismo.

Heterocigoto: Individuo que tiene dos alelos diferentes en un determinado *locus* de un par de cromosomas homólogos.

Heterocigocidad: Estado de un individuo que tiene dos alelos diferentes de un gen.

Homocigoto: Individuo que posee los dos alelos idénticos en un determinado *locus* de un par de cromosomas homólogos.

Iniciador: Secuencia corta de nucleótidos con un 3'-OH reactivo que puede iniciar la síntesis de ADN a lo largo de un molde o plantilla.

Locus (plural loci): Localización exacta del gen de un cromosoma. Las diferentes formas de un gen (alelos) ocupan siempre la misma posición o *locus* en el cromosoma.

Marcador microsatélite: Un tipo de secuencia simple de longitud polimórfica de unidades di, tri o tetranucleótidos repetidas en tándem. También llamadas repeticiones cortas en tándem (STR por sus siglas en inglés).

Merino: Tipo de ganado ovino de lana fina, corta y rizada.

Morueco: Carnero padre

Mutación: Cambio en el ADN que modifica su información génica. Puede darse por inserción, sustitución o pérdida de nucleótidos. Comúnmente se emplea también para designar un cambio en el número o en la disposición de los cromosomas.

Nucleótido: Monómero de ácidos nucleicos, cada uno con tres partes: un azúcar (ribosa o desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada; el fosfato está unido al azúcar y al carbono 5' y a la base del carbono 1'.

Permutación: Serie de posibles combinaciones en dirección biyectiva entre dos grupos que provocan un cambio en el plano opuesto.

Polimorfismo: Presencia de dos o más genotipos alternativos en una población, determinados por factores genéticos y que presentan frecuencias demasiado elevadas para que puedan ser mantenidos en la población.

Selección direccional: En genética de poblaciones ocurre cuando la selección natural favorece a un solo alelo y entonces las frecuencias alélicas continuamente se mueven en una dirección.

Tamaño Alélico: Indica el tamaño de un fragmento de PCR que tiene un *locus* microsatélite cuando el número de repeticiones correspondiente no es conocido.

Taq ADN polimerasa: Enzima termoestable derivada de la bacteria *Thermus aquaticus* que cataliza la síntesis de ADN *in vitro*.