

Origen genético del ovino criollo mexicano (*Ovis aries*) por el análisis del gen del Citocromo C Oxidasa subunidad I

Determining the genetic origin of Mexican creole sheep (*Ovis aries*) by cytochrome C oxidase subunit I gene analysis

Raúl Ulloa-Arvizu^a, Amanda Gayosso-Vázquez^a, Rogelio Alejandro Alonso Morales^a

RESUMEN

Con el propósito de conocer los orígenes genéticos mitocondriales de las poblaciones de ovino criollo mexicano, se colectaron 106 muestras de sangre de ovinos criollos mexicanos de los estados de Chiapas, Puebla, Morelos, Hidalgo y Veracruz de México; también se obtuvieron muestras de borregos criollos encastados con Suffolk (n=23) y de la raza Pelibuey (n=15) y BlackBelly (n=6). El gen de Citocromo C Oxidasa subunidad I (COX I) se localiza en la mitocondria. Este fragmento tiene un sitio polimórfico para la enzima *HinfI* en la posición 5562-5566 que permite diferenciar los genotipos de *Ovis aries* de origen asiático y europeo. Se llevó a cabo un análisis del polimorfismo del largo del fragmento de restricción (PCR-RFLP). Se amplificó un fragmento de 1053 pares de bases del gen COX I y después una digestión con *HinfI*, se reveló que todas las muestras de ovejas criollas y sus cruza presentan el patrón del genotipo B del COX 1. Sin embargo, un individuo BlackBelly presentó genotipo A. En consecuencia, las ovejas locales mexicanas (criollas, borrego Chiapas y Pelibuey) presentan genotipo B, que los ubica con un linaje europeo. Hay evidencia de que ovinos descendientes de animales del oeste de Africa tienen mitocondrias de origen asiático.

PALABRAS CLAVE: Ovino criollo, Pelibuey, ADN mitocondrial, *Ovis aries*, Citocromo C Oxidasa, PCR-RFLP, COX 1.

ABSTRACT

In order to learn about the mitochondrial genetic origin of Mexican creole sheep populations, blood samples from 106 of these animals were collected in the Mexican States of Chiapas, Puebla, Morelos, Hidalgo and Veracruz. Samples were collected from creole-Suffolk admixed (n=23), Pelibuey (n=15) and Black Belly (n=6) sheep. Cytochrome C oxidase subunit I gene (COXI) is located in the mitochondrion. This fragment has a polymorphic site for the *HinfI* enzyme in the 5562-5566 position that allows for differentiating between Asian and European genotypes of *Ovis aries*. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used. A 1053 base pair (bp) fragment of the COX 1 gene was amplified then digested with the *HinfI* restriction enzyme. All samples from creole sheep and creole crosses revealed the genotype B of the COX 1 gene. Nevertheless, only one Black Belly animal had genotype A. Therefore, local Mexican sheep (creole, Chiapas and Pelibuey breeds) belong to the European lineage. Evidence exists that animals descending from Western Africa sheep possess Asiatic mitochondria.

KEY WORDS: Creole sheep, Pelibuey, Mitochondrial DNA, *Ovis aries*, Cytochrome C Oxidase, PCR-RFLP, COX 1.

Los ovinos en México fueron introducidos por los españoles durante la colonia a partir de los años 1525 a 1526⁽¹⁾. Estos fueron transportados de los puertos de Sevilla, Cádiz y de las islas Canarias a las islas del Caribe y posteriormente al continente Americano. Se piensa que las razas introducidas

Sheep were introduced to Mexico by the Spaniards during colonization (1525 - 1526)⁽¹⁾. These animals were embarked at the Spanish ports of Sevilla, Cadiz, and the Canary Islands, sent to the Caribbean islands and then to the American Continent. It is believed that the breeds originally introduced were

Recibido el 29 de mayo de 2008. Aceptado para su publicación el 20 de abril de 2009.

^a Departamento de Genética y Bioestadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. México D.F. 04510. Teléfono (52) 56225894 ; Fax: (52) 56225956. ulloar@servidor.unam.mx. Correspondencia al primer autor.

Esta investigación fue parcialmente apoyada por el proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM N° IN207502.

fueron principalmente la Manchega, Lacha y Churra; sin embargo, existe la posibilidad de que otras razas ovinas fueron traídas como son la Merino española, Castellana y Rasa Aragonesa^(1,2,3,4). A los individuos que descienden de los animales que trajeron los españoles durante los siglos XV al XVII se les define como animal “criollo”. Por otro lado, las razas ovinas de pelo existentes en México, como son la Pelibuey y la Black Belly, fueron traídas por los españoles durante la colonia del oeste del continente africano, pero no se les considera como criollos debido a que no provienen de la península ibérica. Posteriormente, a partir de los años treinta, con programas gubernamentales, se inicia la introducción de razas modernas de origen europeo principalmente inglesas (Suffolk y Hampshire) y Francesas (Rambouillet)⁽³⁾ y en los últimos años también se han introducido razas sintéticas como Dorper y Katadhin. La introducción de estas razas ha sido en la mayoría de los casos por medio de machos y sin seguir un sistema definido de cruza, quedando animales con una composición genética en diverso grado de absorción, y en otros casos la composición multirracial no está definida. En el centro de México se pueden encontrar rebaños encastados con Suffolk o Hampshire que originalmente estaban compuestos por animales “criollos”, y debido a que la mitocondria se hereda de forma materna, se espera que los individuos cruzados presenten el ADN mitocondrial de los ovinos criollos.

En los Altos de Chiapas se localizan animales que se parecen mucho a las razas españolas⁽⁴⁾; sin embargo, en los estados del centro del país como Hidalgo, Puebla, partes altas de Veracruz, entre otras, se pueden localizar algunos rebaños sin la aparente influencia de razas modernas europeas.

Los ovinos domésticos se clasifican como *Ovis aries*; estudios mitocondriales realizados por Hiendleder *et al*⁽⁵⁾ encuentran dos linajes maternos: el asiático o grupo A, que incluye animales de Asia central (y algunos individuos de razas modernas ovinas, debido a que éstas se originaron por la cruce de poblaciones asiáticas y europeas) y el grupo B, donde se encuentra la mayoría de ovinos domésticos europeos. Una diferencia entre

mostly Manchega, Lacha, and Churra, but the possibility exists that other breeds were also included such as Spanish Merino, Castellana, and Rasa Aragonesa^(1,2,3,4). Sheep from the breeds originally introduced by the Spaniards during the 15th and 16th centuries are defined as creole; on the other hand, the hair type breeds that exist in Mexico (Pelibuey [i.e., ox-haired] and Black Belly) were brought by the Spaniards from Western Africa during colonization, but these animals are not considered as creole since they were not originated in the Iberian Peninsula. Later, starting in the 1930s, the Mexican government began to introduce modern European lineages, mostly British (Suffolk and Hampshire) and French (Rambouillet)⁽³⁾ breeds. In recent years, synthetic breeds have also been brought to Mexico including both Dorper and Katadhin. Most of these introductions have occurred by importing males, but a defined breeding program has not been followed, resulting in animals with different levels of absorption in their genetic composition. In many cases, multi-breed composition is not well defined. In central Mexico, herds that were originally creole but later admixed with Suffolk or Hampshire can be found. Nevertheless, due to the fact that mitochondria are inherited from the dam, finding crossbred individuals with mitochondrial DNA from creole sheep can be expected.

In the Chiapas highlands, animals closely resembling the Spanish breeds exist⁽⁴⁾. Nevertheless, in central Mexican States including Hidalgo, Puebla, Veracruz (highlands) and others, herds without the apparent influence from modern European breeds can be found.

Domestic sheep are classified as *Ovis aries*. Mitochondrial studies (Hiendleder *et al*)⁽⁵⁾ detected two maternal lineages: the Asian lineage or group A, which includes animals from central Asia (and some individuals of modern breeds, since they were originated by crossing Asian and European populations), and group B, which includes most of European domestic sheep. One difference between these two genotypes is the presence of one ancestral mutation at the 5562-5566 position of mitochondrial cytochrome C oxidase I gene, that can be easily

estos dos genotipos se debe a que se presenta una mutación ancestral en la posición 5562-5566 del gen de la Citocromo C Oxidasa I de la mitocondria, y que puede ser diferenciada fácilmente, ya que es un sitio de corte para la enzima de HinfI⁽⁶⁾.

Con el objeto determinar a qué genotipos pertenecen los ovinos criollos y Pelibuey que se encuentran en México, se obtuvieron muestras de sangre de 63 ovinos criollos mexicanos provenientes de Coajomulco en Morelos, Mixteca poblana; valle del Mezquital en Hidalgo y Sierra de Zongolica en Veracruz; y 43 borregos de la raza Chiapas, provenientes de los Altos de Chiapas. En este estudio también se incluyeron 23 animales encastados con Suffolk por considerar que poseen mitocondrias del grupo criollo mexicano, además 15 animales de la raza Pelibuey y 6 Black Belly. Se tuvo cuidado que los animales muestreados no estuvieran emparentados.

El ADN total fue purificado a partir de sangre con un método estándar⁽⁷⁾. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue amplificado un fragmento de 1053 pares de base (pb) que contiene el gen de la Citocromo C Oxidasa 1 (COX1). La PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µL, conteniendo 80 ng de ADN, 0.5 pmol de cada uno de los iniciadores previamente reportados⁽⁶⁾ (el iniciador hacia adelante 5' AGCTGACGTGAA GTAAGC 3'; y el reverso 5' GCAGAGTTTGAA GCTGCT 3'), 0.2 mM dNTPs, 0.15 mg/ml de BSA, 0.1% Triton X100, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10 µg/ml gelatina, 1.5 mM MgCl₂ y 2.5 unidades de TaqDNA Polimerasa (Biogénica, México, D.F.). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 94 °C (3 min); 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 56 °C (30 seg) y 72 °C (1 min); y un ciclo final de 72 °C (3 min). La digestión se realizó en un volumen de 20 µL, conteniendo 5 µL del producto de PCR, amortiguador de digestión comercial 1X (Buffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol pH 7.9, NE BioLabs), espermidina 1 mM (Sigma-Aldrich) y 2 unidades (por reacción) de enzima HinfI (NE BioLabs); La incubación fue a 37 °C durante 12 a 16 h. Los productos de digestión se evaluaron por

differentiated, since this is the cleavage site for the HinfI restriction enzyme⁽⁶⁾.

In order to determine the genotypes of both Mexican creole and Pelibuey sheep, blood samples were collected from 63 creole sheep in Coajomulco, State of Morelos; Mixteca, State of Puebla; Mezquital Valley, State of Hidalgo; and Sierra de Zongolica, State of Veracruz; as well as from 43 Chiapas breed sheeps from the State of Chiapas highlands. In this study, 23 Suffolk cross-bred sheep were also included, since we thought they could possibly have Mexican creole mitochondria. Fifteen (15) Pelibuey and 6 Black Belly sheep were also analyzed. We made sure that all animals sampled had no family relationships among themselves.

Total DNA was purified from blood samples following the standard method⁽⁷⁾. Using a polymerase chain reaction (PCR) technique, a 1053 base pair (bp) fragment containing the cytochrome C oxidase 1 (COX1) gene was amplified. PCR was performed using a 20 µL volume containing 80 ng DNA, 0.5 pmol of each of the previously-reported primers⁽⁶⁾ (the 5' AGCTGACGTGAA GTAAGC 3' forward primer, and the 5' GCAGAGTTTGAA GCTGCT 3' backward primer), 0.2 mM dNTPs, 0.15 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.1% triton X100, 10 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10 µg/mL gelatin, 1.5 mM MgCl₂, and 2.5 units TaqDNA Polymerase (Biogénica, Mexico City). Amplification conditions included: one 94 °C (3 min) cycle; thirty 94 °C (30 sec) cycles; 56 °C (30 sec); and 72 °C (1 min); and one final 72 °C (3 min) cycle. Digestion was performed in a 20 µL volume containing 5 µL of the PCR product, 1X commercially available digestion buffer (Buffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol pH 7.9; NE BioLabs), 1 mM spermidine (Sigma-Aldrich), and 2 units (per reaction) HinfI enzyme (NE BioLabs). Incubation was performed at 37 °C for 12 to 16 h. Digestion products were evaluated by 3 % gel electrophoresis then stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Results showed only one Black Belly animal with genotype A, 836, 144, and 73 bp fragments (lane

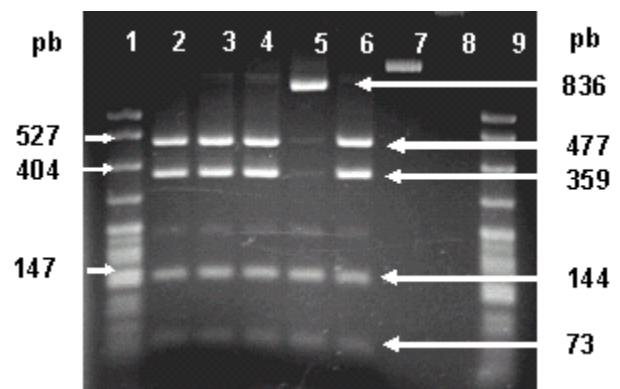
electroforesis en geles de agarosa al 3 %, teñidos con bromuro de etidium y visualizados con luz ultravioleta.

Se encontró que un solo animal de la raza Black Belly presentó genotipo A con los fragmentos 836, 144, y 73 pb (carril 5, Figura 1) y en todos los demás casos se revelaron fragmentos 477 pb, 359 pb, 144 pb y 73 pb, que corresponden al genotipo europeo B. Por lo anterior, los ovinos criollos mexicanos se ubican como descendientes de un ancestro común al muflón como lo plantean Hiendleder *et al*⁽⁸⁾. En cuanto a los animales encastados con Suffolk, son producto del cruzamiento de machos Suffolk con hembras Criollas, por lo que los animales híbridos tienen ADN mitocondrial de ovinos criollos. Esto contrasta con el estudio de Hiendleder *et al*⁽⁵⁾, donde estudiaron 80 animales de la raza Merino Alemán encontraron un solo genotipo A. Mientras que Wood y Phua⁽⁹⁾ compararon las secuencias de nucleótidos de la región de control de la mitocondria (D-loop) de ovinos de las razas Merino, Romney, Coopworth, y Perendale, e identificaron dos tipos de ADN mitocondrial, que resultaron ser los genotipos A y B; la frecuencia de grupo A, en todas las razas, fue 50 %, mientras que en la raza Merino que desciende del merino español, la frecuencia del genotipo A fue de 28 %. Sin embargo, los grupos A encontrados en las razas neozelandesas, se deben a que ovinos originarios de la India (cola gorda)⁽⁸⁾ fueron los primeros usados en australasia en cruzamientos absorbentes con los machos de origen europeo⁽¹⁰⁾. En estudios con secuenciación del D-loop mitocondrial, se reportan genotipos asiáticos, los cuales se presentan en baja frecuencia en razas portuguesas⁽¹¹⁾ y españolas⁽¹²⁾. A diferencia del caso neozelandés, en los ovinos criollos mexicanos no se encontró evidencia de la existencia de genotipos asiáticos. Una posible explicación es que dado que los genotipos A están en baja frecuencia en las razas ibéricas^(11,12), son muy susceptibles a desaparecer en las poblaciones ovinas en México, debido a cuellos de botella sufridos desde su proceso de introducción al continente Americano como ha sido la reducción de los inventarios ovinos reportados durante los últimos 200 años en México⁽¹³⁾.

5, Figure 1), while all other animals showed 477, 359, 144, and 73 bp fragments, corresponding to the European genotype B. Therefore, Mexican creole sheep were found to descend from a common Mouflon ancestor, in agreement with Hiendleder *et al*⁽⁸⁾ Regarding Suffolk-crossed sheep these animals are the result of Suffolk male x creole female crossbreeding, therefore hybrid animals have mitochondrial DNA from creole animals. This is in contrast with Hiendleder *et al*⁽⁵⁾ who detected only one genotype A among the 80 German Merino sheep analyzed. On the other hand, Wood and Phua⁽⁹⁾ compared the mitochondria control region (D-loop) nucleotide sequences from Merino, Romney, Coopworth, and Perendale sheep, identifying two mitochondrial DNA types which resulted to be of the genotypes A and B. Group A frequency among all breeds was 50 %, while in the Merino breed, which descends from the Spanish Merino, genotype A frequency was only 28 %. Nevertheless, group A animals found among the New Zealand breeds are due to the fact that Indian origin (fat tailed) sheep⁽⁸⁾ were first used in Australasia for absorbing crossbreeding with

Figura 1. Productos de PCR gen COXI digeridos con la endonucleasa HinfI

Figure 1. COXI gene PCR products after digestion with the HinfI restriction enzyme



Lanes 1 and 9 show the DNA pBR322/MspI molecular weight marker. Lane 8 shows Lambda/BstEII DNA. Lanes 2, 3, 4, and 6 show the HinfI fragment pattern of the European genotype. Lane 5 corresponds to the Asian genotype. Lane 7 shows the undigested COXI (1053 bp) gene.

En cuanto a las razas de pelo (Pelibuey y Black Belly) que son originarias de África occidental; en este estudio se presenta evidencia que en razas africanas está presente el genotipo europeo y además el tipo asiático (presente sólo en la Black Belly). Este último hallazgo es difícil interpretarlo, ya que en las razas ovinas de África no hay muchos estudios. En el único reporte encontrado que incluye razas africanas, sólo incluye un ovino de Camerún que resultó ser de tipo europeo⁽⁵⁾; aunque es un solo animal, coincide con lo encontrado en este estudio en la raza Pelibuey, que es una variedad mexicana que se formó con animales que provinieron del oeste del continente africano.

En conclusión, este trabajo muestra que las ovejas locales mexicanas (criollas, borrego Chiapas y Pelibuey) presentan genotipo B, que los ubica con un origen europeo. Aunque el procedimiento de PCR-RFLP es rápido y barato, con la intención de conocer más detalles de los orígenes y niveles de diversidad, es conveniente realizar estudios utilizando secuenciación de nucleótidos del D-loop mitocondrial, así como empleando marcadores genéticos nucleares como microsatélites o polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNPs).

AGRADECIMIENTOS

A los MVZ's Raúl Perezgrovas, Antonio Hernández Ortiz y Alberto Ríos Torres y a los Doctores Maximino Méndez Mendoza y José Solís Ramírez; por su participación en la recolección de las muestras. A la M. en C. Dalila Rodríguez por su asistencia técnica.

LITERATURA CITADA

1. Matesanz J. Introducción de la ganadería en Nueva España, 1521-1535. Historia Mexicana No. 56. México: Colegio de México; 1965.
2. Martín EL. La ganadería mexicana. México: Banco de México, SA; 1960.
3. Saucedo MP. Historia de la ganadería en México. 1ra ed. México (DF): Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección General de Publicaciones; 1984.

European-origin males⁽¹⁰⁾. Mitochondrial D-loop sequencing studies report Asian genotypes which show a low frequency among Portuguese⁽¹¹⁾ and Spanish⁽¹²⁾ breeds. Unlike the New Zealand case, no evidence of Asian genotypes was found among Mexican creole sheep. One possible explanation is that given that genotypes A are found at a low frequency among the Iberian breeds^(11,12) genotypes A are prone to disappear from the Mexican sheep populations due to bottlenecks that have existed since their original introduction to the Americas, including reduced sheep inventories as reported throughout the last 200 years in Mexico⁽¹³⁾.

As far as the hair type breeds (Pelibuey and Black Belly) originated in Western Africa are concerned, our study shows evidence that African breeds include the European genotype together with the Asian genotype (found only in the Black Belly breed). This finding is hard to interpret due to the scarcity of studies regarding African breeds. Only one report regarding African breeds was found, which includes only one Cameroon individual which came out to be of the European type⁽⁵⁾. Even though this is only one single animal, it agrees with our findings regarding the Pelibuey breed, which is a Mexican variety that has resulted from animals originated in Western Africa.

In conclusion, this study shows that domestic Mexican sheep (creole, Chiapas, and Pelibuey breeds) are of the genotype B which testifies for their European origin. Even though the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) procedure is quick and inexpensive, mitochondrial D-loop nucleotide sequencing studies as well as studies using nuclear genetic markers as micro-satellites or single nucleotide polymorphisms (SNPs) should be undertaken in order to get a more detailed knowledge about the origins and diversity levels of Mexican sheep.

ACKNOWLEDGEMENTS

Gratitude is expressed to Raúl Perezgrovas, DVM; Antonio Hernández Ortiz, DVM; and Alberto Ríos

4. Perezgrovas GR. Los Carneros de San Juan. En: Perezgrovas GR editor. *Ovinocultura Indígena de los Altos de Chiapas*. México: Centro de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas; 1990.
5. Hiendleder S, Mainz K, Plante Y, Lewalski H. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources. No Evidence for Contributions from Urial and Argali Sheep. *J Heredity* 1998;89:113-120.
6. Hiendleder S, Phua HS, Hecht W. A diagnostic assay discriminating between two major *Ovis aries* mitochondrial DNA haplogroups. *Anim Genet* 1999;30:211-213.
7. Miller SA, Dykes D, Polesky HF. A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1989;16:1216.
8. Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R. Molecular análisis of wild and domestic sheep questions current nomenclatura and provides evidence for domestication from different subspecies. *Proceed R Soc Lond B* 2002;269:893-904.
9. Wood NJ, Phua SH. Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim Genet* 1996;27(1):25-33.
10. Bruford MW, Bradley DG, Luikart G. DNA makers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Rev Genet* 2003;4:900-910.

Torres, DVM, as well as to Dr. Maximino Méndez Mendoza and Dr. José Solís Ramírez for their sampling assistance. The technical support of Dalila Rodríguez, MSc is also acknowledged.

End of english version

11. Pereira F, Davis SJM, Pereira L, McEvoy, Bradley DG, Amorim A. Genetic signatures of a mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol Biol Evol* 2006;23(7):1420-1426.
12. Pedrosa S, Arranz JJ, Brito N, Molina A, San Primitivo F, Bayón Y. Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genet Sel Evol* 2007;39:91-103.
13. Saldaña Marcon R. Contribución al estudio de la historia económica de la ganadería ovina en México, de la Colonia al Porfiriato [tesis licenciatura]. México: Instituto Politécnico Nacional; 1978.