



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Caracterización genética de gallos de pelea (*Gallus gallus*) del cantón Cuenca mediante mtDNA D-Loop.”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

Autores:

Christian Santiago Hernández Encalada

CI: 0106522709

David Iván Jara Solano

CI: 0104863741

Director:

Guillermo Emilio Guevara Viera PhD

CI: 0151455342

Cuenca-Ecuador

22-octubre-2019



Resumen:

El objetivo de esta investigación fue caracterizar genéticamente mediante mtDNA D-loop, los gallos de pelea en los diferentes criaderos del cantón Cuenca, provincia del Azuay, Ecuador. Se realizó una muestra piloto en 10 criaderos del cantón para determinar la existencia de los ecotipos de gallos de pelea y cuantificar sus efectivos respectivos. Para el criterio de ecotipos se tuvo en cuenta la información del criador, morfología externa de las aves, el trabajo de comparación de fotos con las referencias bibliográficas y el criterio de un experto. Posteriormente se seleccionaron 15 aves de los tres ecotipos más abundantes y más distribuidos en los criaderos visitados; en los que destacan: ecuatorianos, chilenos y portorriqueños de los cuales se tomaron plumas de cada animal. Además, se incluyó ADN de gallos cubanos, (out). Se determinaron el F_{st} , el N_{st} y el AMOVA. Los ecotipos de gallos ecuatorianos, chilenos, portorriqueños y cubanos mostraron poca variabilidad entre ellos, 5%. La mayor variabilidad se encontró dentro de cada ecotipo. En los 19 haplotipos solo en uno se encuentran representados los 4 ecotipos, la mayoría de ellos están representados por un solo individuo. En los parámetros genéticos como: sitios de segregación, número de haplotipos, diversidad de haplotipos y promedio de las diferencias del número de nucleótidos, el ecotipo cubano, presentó valores superiores a los ecotipos restantes.

Palabras claves: Mitocondrial. Secuenciación. Haplotipos. Aves



Abstract:

The objective of this research was to genetically characterize by means of mtDNA D-loop, the fighting roosters in the different hatcheries of the Cuenca canton, province of Azuay, Ecuador. A pilot sample was carried out in 10 farms in the canton to determine the existence of ecotypes of fighting cocks and quantify their respective troops. For the ecotype criteria, the breeder's information, external bird morphology, the work of comparing photos with bibliographic references and the criteria of an expert were taken into account. Subsequently, 15 birds were selected from the three most abundant and most distributed ecotypes in the hatcheries visited; in which they stand out: Ecuadorians, Chileans and Puerto Ricans from which feathers of each animal were taken. In addition, DNA from Cuban roosters was included, (out). *F*_{st}, *N*_{st} and AMOVA were determined. The ecotypes of Ecuadorian, Chilean, Puerto Rican and Cuban roosters showed little variability among them, 5%. The greatest variability was found within each ecotype. In the 19 haplotypes in only one, the 4 ecotypes are represented, most of them are represented by a single individual. In the genetic parameters such as: segregation sites, number of haplotypes, diversity of haplotypes and average differences in the number of nucleotides, the Cuban ecotype presented values higher than the remaining ecotypes.

Keywords: Mitochondrial. Sequencing. Haplotypes. Birds



ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Objetivos	20
1.1.1 General	20
1.1.2 Específicos	20
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Gallos de pelea	21
2.1.1 Reseña histórica	21
2.1.2 Orígenes	23
2.2 Marcadores Moleculares	27
2.3 Estudios de marcadores genéticos realizados en gallos de combate.	28
2.4 ADN mitocondrial	30
2.5 Estudios con mtDNA D-Loop	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Materiales	33
3.1.1 Materiales Biológicos	33
3.1.2 Materiales Químicos	33
3.1.3 Equipos y otros materiales	34
3.1.4 Materiales de campo	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 El área de estudio	35
3.2.2 Ubicación política-geográfica	35
3.3 Unidad Experimental	36
3.4 Metodología de la Investigación experimental	36
3.4.1 Método de obtención del material genético	36
3.4.2 Método para el procesamiento de las muestras colectadas, extracción y purificación	37
3.4.3 Métodos para la amplificación del ADN mediante PCR	38
3.4.4 Secuenciación	40



3.5 Análisis estadístico.....	40
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.4 Selección de ecotipos.....	43
4.2 Parámetros genéticos mtDNA D-Lopp.....	45
4.3 Diferenciación genética maternal	51
6 BIBLIOGRAFÍA	54
7 ANEXOS	59
7.4 Fotografías de la investigación	59
Lugar: Racar -2.8706632, -79.0245516.....	86



Índice de Figuras

Figura 1. Gallo inglés de pelea.....	21
Figura 2. Gallus Bankiva	22
Figura 3. Malayo Persa	23
Figura 4. Gallo español de pelea	24
Figura 5. Gallo de raza sweater	24
Figura 6. Gallo azul de brujas	25
Figura 7. Shamo de Bélgica	26
Figura 8. Gallo jerezano español	27
Figura 9. Gallo de pelea chileno.....	30
Figura 10. Cuenca - Ecuador	35
Figura 11. Determinación de la relación entre los ecotipos y la secuencia de coordenadas (sec cor) utilizando el método de árbol circular reducido mediante parsimonia.....	50
Figura 12. Gallo de pelea puertorriqueño.....	59
Figura 13. Gallo de pelea puertorriqueño.....	59
Figura 14. Gallo de pelea español.	60
Figura 15. Gallo de pelea tailandés.....	60
Figura 16. Gallo de pelea rojo y blanco chileno.	61
Figura 17. Gallos de pelea ecuatorianos.....	61
Figura 18. Gallo de pelea dominicano.....	62
Figura 19. Gallo de pelea dominicano.....	62



Índice de Tablas

Tabla 1. Reactivos para amplificación de ADN.....	39
Tabla 2. Perfil de temperatura de amplificación.....	40
Tabla 3. Distribución de las subpoblaciones en 10 criaderos pertenecientes a Cuenca – Ecuador...	44
Tabla 4. Características morfológicas en los ecotipos seleccionados.	45
Tabla 5. Haplotipos determinados.	47
Tabla 6. Parámetros genéticos de mtDNA D-loop de los cuatro ecotipos estudiados: Ecuatorianos, Chilenos, Puertorriqueños y Cubanos.	48
Tabla 7. Estimaciones de divergencia evolutiva sobre pares de secuencias entre grupos.	49
Tabla 8. Análisis de varianza multilocus, AMOVA.	51



Índice de Anexos

Anexo 1: Gallos puertorriqueños de diferentes criaderos en Cuenca-Ecuador.....	59
Anexo 2: Gallo español.....	60
Anexo 3: Gallo de Tailandia.....	60
Anexo 4: Gallos chilenos en diferentes criaderos pertenecientes a Cuenca-Ecuador.....	61
Anexo 5: Gallos ecuatorianos en diferentes criaderos pertenecientes a Cuenca-Ecuador.....	61
Anexo 6: Gallos dominicanos en diferentes criaderos Cuenca – Ecuador.....	62
Anexo 7: Medición de metatarsos en ecotipos presentes en los criaderos.....	63
Anexo 8: Toma de muestras de plumas en diferentes ecotipos.....	63
Anexo 9: Transporte de muestras de plumas.....	64
Anexo 10: Tubo eppendorf con fragmentos de folículos de plumas en ecotipo puertorriqueños.....	64
Anexo 11: Aislamiento, purificación y amplificación del material genético presente en cada uno de los ecotipos seleccionados.....	65
Anexo 12: Fichas técnicas que proporcionan información para la selección de ecotipos.....	66
Anexo 13: Haplotipos determinados de cada uno de los ecotipos en estudio.....	68
Anexo 14: Dendograma rectangular de los ecotipos estudiados.....	81
Anexo 15: Recolección de datos mediante fichas técnicas.....	82



Cláusula de Propiedad Intelectual

Christian Santiago Hernández Encalada, autor del trabajo de titulación "Caracterización genética de gallos de pelea (*Gallus gallus*) del cantón Cuenca mediante mtDNA D-loop.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de octubre de 2019

Christian Santiago Hernández Encalada

C.I: 0106522709



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Christian Santiago Hernández Encalada en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE GALLOS DE PELEA (Gallus Gallus) DEL CANTÓN CUENCA MEDIANTE mtDNA D-Loop.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de octubre de 2019

Christian Santiago Hernández Encalada

C.I: 0106522709



Cláusula de Propiedad Intelectual

David Iván Jara Solano, autor/a del trabajo de titulación "CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE GALLOS DE PELEA (GALLUS GALLUS) DEL CANTÓN CUENCA MEDIANTE mtDNA D-Loop.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22 de octubre del 2019

David Iván Jara Solano

C.I: 0104863741



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

David Iván Jara Solano en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación ““CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE GALLOS DE PELEA (Gallus Gallus) DEL CANTÓN CUENCA MEDIANTE mtDNA D-Loop.”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de octubre del 2019

David Iván Jara Solano

C.I: 0104863741



Agradecimiento

Durante el tiempo empleado en realizar esta tesis, han sido muchas las personas con las que he coincidido, haciendo que esta sea una de las experiencias más enriquecedoras que he tenido. Así que todas estas palabras van para todas aquellas personas que de una u otra forma aportaron en esta tesis.

Comienzo agradeciendo a Dios por darme la fuerza de seguir en este camino difícil pero lleno de emociones, a mi director de tesis Dr. Guillermo Guevara por ser el eje fundamental y brindar ese apoyo sustancial en cada paso que se realizó para esta investigación, de la misma manera al Dr. Antonio Vallecillo, quien con dedicación y firmeza nos enriqueció de conocimientos durante el transcurso de la tesis.

A mi pequeña familia de cinco integrantes por darme la mano cuando más lo necesitaba y darme ese apoyo emocional, pero sobre todo a mi madre Janneth por aconsejarme y guiarme en el camino de la vida, a mi hermana Andrea por ser mi apoyo, a Jack por enseñarme el amor que solo los animales pueden darnos, y a toda mi familia por el amor que solo pude encontrar en ellos.

A mi compañero de tesis David Jara, quien supo cómo sobrellevar y apoyar esta investigación de manera eficaz, y permitirme trabajar en el mismo equipo investigativo, logrando así un aporte mutuo de conocimientos.

A mis amigos y conocidos gracias por estar presentes en todo este proceso, y esto va por ustedes.



Dedicatoria

Esta investigación de tesis va dedicada para todas las personas quienes me brindaron con sus conocimientos y tiempo durante toda mi vida, y también a quienes me han apoyado de muchas maneras en el transcurso de esta etapa de formación académica

Con mucho respeto y admiración para ustedes.

Christian Santiago Hernández Encalada



Agradecimiento

Quiero agradecer principalmente a mi padre que gracias a su filial apoyo ha sido posible culminar esta etapa de vida, a mi director de tesis Dr. Guillermo Guevara el cual fue una pieza clave en el desarrollo de esta investigación, al Dr. Antonio Vallecillo por la gran ayuda desinteresada, paciencia y conocimientos compartidos.

A mis abuelos, mi madre y mis tíos quienes con su apoyo y amor incondicional han participado en el desarrollo de mi carrera.

A mi compañero de Tesis Christian Hernández quien me permitió formar parte de este equipo y con el día a día supimos enfrentar las adversidades de esta investigación juntos, gracias por formar parte de este equipo.

A mis amigos quienes como les he dicho siempre son una familia más y una parte esencial en mi vida.



Dedicatoria

Este trabajo de investigación va dedicado a mis abuelos: José y Lucía ya que con sus enseñanzas e infinito amor están presentes en cada paso que doy día a día.

David Iván Jara Solano



Abreviatura y simbología

QTL: Loci de rasgos cuantitativos

HO: Heterocigosidad observada

HE: Heterocigosidad esperada

Bp: Pares de base

Π : Diversidad de nucleótidos

K: Promedio de la diferencia de los nucleótidos

Hd: Diversidad de haplotipos

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

PCR: Reacción cadena polimerasa

dNTP's: Nucleósido trifosfato



1. INTRODUCCIÓN

Una de las dificultades más grandes que se presentan a nivel mundial es la extinción de diferentes especies y razas por diferentes razones, una de las más importantes es de carácter natural, ya que es ocasionado por la pérdida de resistencia a algunas enfermedades, así como la incapacidad para adaptarse a ciertos tipos de clima, los mismo que son resultados a la pérdida de recursos genéticos ocasionados por explotaciones intensivas de producción, selección genética, climas hostiles, especies ajenas introducidas a un nuevo hábitat, además que los costos tanto de crío preservación de material genético, así como de análisis genético son muy costosos, ocasionando la dificultad para preservar el material genético y realizar sus estudios respectivos; como lo menciona la FAO (2019).

Para obtener información suficiente en una base de datos genéticos se creó el GenBank, el cual se desarrolló gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, como lo es el descubrimiento de la PCR, el estudio y la medición de la variabilidad genética existente a nivel molecular entre y dentro de los individuos de una población, la cual se ha usado para la mejora y la conservación de esas poblaciones (Méndez, 2012); dichas técnicas nos permiten identificar individuos en una raza o especie, determinar filiación genética y parental entre individuos de alguna especie en particular, evaluar susceptibilidad a enfermedades genéticas, establecer características cualitativas como presencia de cuernos o color de pelaje entre otros (Ángel y col., 2013).

Las aves domésticas, productoras de huevo, carne, plumas, decorativas y de combate también se ven afectadas por estos elementos, se han reducido razas y disminuido la diversidad de genes, la presión de selección ha sido muy alta y unas pocas razas se disputan el mercado. Los trabajos actuales para estudiar sus características genéticas se enfocan hacia los análisis de mtDNA-D-Loop y microsatélites de las razas comerciales y las que tienen un valor local. (FAO, 2019; Méndez, 2012).

En Ecuador no se han realizado investigaciones de mt DNA-loop completos en las diferentes especies aviares, tampoco en el caso de las aves de combate se han realizado suficientes trabajos para conocer la estructura genética que tienen las razas que se crían para este tipo de evento social.



No conocer sus características genéticas implica enfrentar los riesgos de pérdidas de genes que pueden ser valiosos, ya que éstas tienen un impacto sociocultural y económico dentro del país, y se encuentran marcados individualmente y diseminados en diferentes criaderos; sin embargo, no existen estudios como el mencionado anteriormente en los cuáles se determine o caracterice genéticamente los gallos de combate propios del territorio ecuatoriano.

Se han realizado diferentes estudios genéticos sobre aves de combate en otros lugares tales como: Japón (Komiyama, y col, 2004; Tadano, y col, 2007), Europa (Hillel y col., 2003), China (Jia, y col, 2017; Guo, y col, 2017), Indonesia (Sulandari y col., 2008), Sur de Asia e India (Muchadeyi y col, 2008) y España (Méndez, 2012). En las investigaciones mencionadas anteriormente se trabajó con ADN mitocondrial ya que posee una cadena más corta de nucleótidos que el ADN nuclear, y es haploide; el cual brinda una mayor rapidez y eficacia con el fin de caracterizar la especie y conocer su origen.

Estos escritos de carácter científico nos han demostrado la importancia de iniciar los estudios para conocer en nuestros criadores nacionales acerca de las características genéticas de esta especie enfocándose sobre todo en los gallos de combate autóctonos, con el fin de preservarla; finalmente esta investigación es importante porque en nuestro país y en Sudamérica no existen suficientes estudios relacionados a la genética de estos animales.



1.1 Objetivos

1.1.1 General

Caracterizar genéticamente los gallos de pelea del cantón Cuenca mediante mtDNA D-loop.

1.1.2 Específicos

- Seleccionar tres ecotipos presentes en los criaderos de gallos de pelea del cantón Cuenca mediante una muestra piloto.
- Caracterizar cada uno de los ecotipos seleccionados en cuanto a los parámetros genéticos de los mtDNA D-loop.
- Analizar las diferencias genéticas inter e intra ecotipos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gallos de pelea

2.1.1 Reseña histórica

Dentro de un contexto histórico los gallos de pelea han tomado gran importancia socio cultural en varios países del mundo, denotando su origen común con gallos domesticados, los cuales mediante restos arqueológicos y su debido estudio demostró que son procedentes de los años 6000 AC y 2500 AC, los cuales fueron encontrados en China y Pakistán respectivamente, postulándose que la gallina fue domesticada en el año 5400 AC (Figura 1) (Murilo y Gutiérrez, 2012; Hans y Ballekom, 2014).

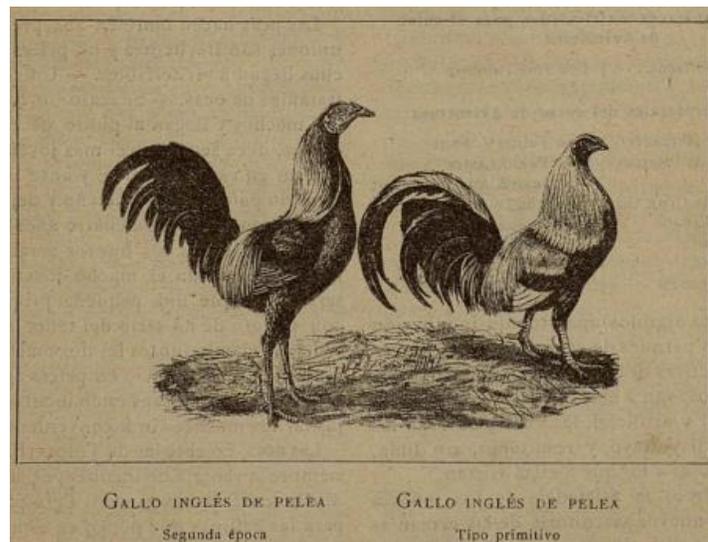


Figura 1. *Gallo inglés de pelea*

Fuente: Hans y Ballekom (2014)

El gallo de pelea pertenece a la especie *Gallus domesticus* y se cree que tuvo su origen en dos raíces principales: *Gallus bankiva* (Figura 2) y *Gallus sonerati*, ambas especies silvestres vivían en estado salvaje en Asia. (Sañudo, 2013)



Figura 2. Gallus Bankiva

Fuente: Sañudo (2013)

Pero quizás dentro de la historia misma de este tipo de aves sobresale el nombre de un norteamericano Harry Clarke, quien recorrió diferentes partes del mundo para recolectar a los mejores especímenes en esta rama de las aves ornamentales, importando gallos desde la India a la ciudad de Indianápolis en donde se puede encontrar más fácil la raza Assil que en su propio país de origen; además, Clarke fue quien inventó los espolones artificiales para los combates en USA, México y Francia (Calistri, 1985).

Los gallos de combate en América fueron introducidos por los conquistadores españoles, los cuales trajeron gallos del tipo bankivoyde, malayoide representado este último en la Figura 3, entre otros tantos (Murilo y Gutiérrez, 2012); la introducción de esta especie a América fue tras el segundo viaje de Cristobal Colón a América, junto a Cortés, quien posteriormente introdujo dicha especie a México (Méndez, 2013).

Dentro de la historia estadounidense los gallos de combate tuvieron un impacto tan grande que incluso se menciona que este tipo de aves perdieron por un voto en contra dentro del Congreso de los Estados

Unidos de América el privilegio de ser elegidos ave emblema de dicho país, además de la gran importancia que les daban los presidentes George Washington, Thomas Jefferson, Andrew Jackson y Abraham Lincoln, siendo este último apodado como “Honest Abe” por su calidad como árbitro de estos combates (Hans y Ballekom, 2014).

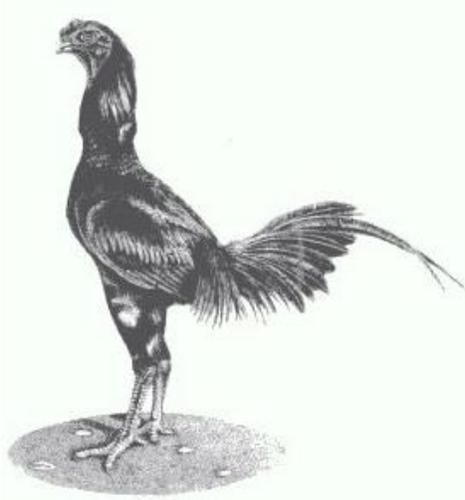


Figura 3. Malayoide

Fuente: Hans y Ballekom (2014)

2.1.2 Orígenes

Un árbol filogenético para aves de corral, incluido el pollo en el género *Gallus* y basado en el análisis del ciclo D mitocondrial mediante la secuencia de ADN mitocondrial y dos segmentos del genoma nuclear en razas como el jungla roja, jungla gris, jungla Ceylon y pollo, respalda el estudio desarrollado a partir de la morfología y la producción de progenie de que el jungla roja (RJF) es el antecesor directo del pollo (Nishibori y col., 2005). Storey y col. (2012) realizaron un estudio dentro del cual se estudiaron ADN mitocondriales antiguos obtenidos de estudios anteriores y en algunos casos de huesos obtenidos de Europa, Asia del Pacífico y América, representados por una parte dentro de la gran diversidad racial que se encuentran en cada uno de los continentes como lo presentan el gallo español de pelea, raza sweater, y el azul de brujas (Figura 4, Figura 5, Figura 6); dándoles como múltiples orígenes para las muestras de Europa y Pacífico que provienen del centro de Asia, lo que se puede

denotar como un ancestro también para las muestras obtenidas de América, ya que esta especie fue introducida por los polinesios y posteriormente por los europeos.



Figura 4. Gallo español de pelea

Fuente: Méndez (2012)



Figura 5. Gallo de raza sweater

Fuente: Méndez (2012)



Figura 6. Gallo azul de brujas

Fuente: Sañudo Astiz (2013)

2.1.2.1 Origen Japonés

Oka y col. (2007) analizaron la secuencia de ADN mitocondrial para encontrar el origen de los pollos nativos japoneses utilizando 14 tipos de restricciones de fragmento de longitud de polimorfismo con una población de estudio de 121 individuos de *G. gallus* (selva roja y aves domésticas) y *G. varius* (selva verde), distribuidos de la siguiente manera: 14 aves de jungla roja tailandesa, 5 aves de jungla roja de indonesia, 30 aves de jungla verde y 72 individuos representados por 26 razas domésticas asiáticas diferentes; la región de control mitocondrial amplificada por PCR contenía seis sitios polimórficos para cuatro enzimas de restricción. V, Vsp I; A, Alu I; Sra. Mse I; Mb, Mbo II; al final se obtuvieron resultados en los cuales se indica que los pollos nativos japoneses según su secuencia genética fueron obtenidos de China y Korea, de los cuales se derivaron del sudeste asiático. Después de la domesticación de la jungla roja, se desarrolló un pollo que no era de tipo caza y se extendió a China. Tanto los pollos que no son de caza como los que sí lo son formaron la base de los pollos nativos japoneses, que posteriormente fueron llevados a diferentes regiones de Asia oriental, en donde se nacionalizaron antecediendo a su nombre el racial “Shamo” cuyo nombre y origen étnico es japonés (Figura 7) (Fumihito y col., 1994).



Figura 7. Shamo de Bélgica

Fuente: Sañudo (2013)

2.1.2.2 Origen Español

El gallo de origen español tiene como base el gallus Bankiva primitivo, que fue introducido en España por fenicios, griegos y romanos (Calistri, 1985; Hans y Ballekom, 2014) y que luego por las invasiones bárbaras a España, se mezclaron con gallos orientales. Así, ya en el siglo XVI se hablaba de los famosos gallos de riña denominados “Jerezano” (Figura 8); estos animales tiene una tendencia a la cloquez, son fuertes, con coraje, tranquilos en ambientes de libertad, no pelean entre diferentes razas, aunque pelean entre ellos a edades tempranas, diciéndose que las heridas los estimulan, de igual manera poseen una gran resistencia física, denotándose en su gran desarrollo de pechugas, lo que ha llevado a que este tipo de aves de combate se puedan llevar a formar como razas de carne (Sañudo Astiz, 2013).



Figura 8. Gallo jerezano español

Fuente: Sañudo (2013)

2.1.2.3 Origen Inglés

Dentro de las razas de combate más importantes tenemos al combatiente inglés, el cual deriva del malayo, esta raza fue llevada al Reino Unido por legiones romanas, en donde se asentó como un ave de combate de dicho lugar; también existe otra raza conocida como combatiente de brujas, la cual es de Bélgica y es muy antigua; la raza shamo es de origen japonés, proveniente del malayo; la raza sumatra, la cual es originaria de Sumatra y Malasia, es quizás una de las razas más primitivas, y por último el malayo, el cual tuvo su origen en el Sudeste Asiático, y es muy usada esta raza para la formación de otras razas, por sus características fenotípicas (Sañudo, 2013).

2.2 Marcadores Moleculares

Un marcador molecular es un fragmento (secuencia) de ADN que por sí solo, o combinado en alineación con otros, puede ser físicamente localizado dentro del genoma de un organismo. Tales fragmentos pueden encontrarse cerca de un gen que codifica una característica de interés o en regiones que, sin ser codificantes, contienen características estructurales particulares (Hillel y col., 2003).



Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad: buena distribución a lo largo del genoma, alto grado de polimorfismo, la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, además debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios (Bejarano y col., 2012).

Un microsatélite es una secuencia corta de ADN que consiste en repeticiones di-tri o tetra-tándem, por ejemplo, secuencia de ADN TGTGTGTG GTGTGTGTGTG (TG 10) es un microsatélite (Crooijmans y col., 1996). Los microsatélites se han convertido en el tipo preferido de marcadores genéticos debido a su abundancia, la distribución aleatoria que crean en el genoma, la herencia codominante, la alta variabilidad, la posibilidad de detección automatizada y la capacidad de mostrar polimorfismos genéticos incluso en especies en las que los marcadores genéticos clásicos no han tenido éxito (Nishibori y col., 2005).

Estos marcadores proporcionan una herramienta poderosa para la investigación de QTL, y también se han utilizado con éxito para estudiar la relación genética entre y dentro de las poblaciones de pollos (Hillel y col., 2003).

2.3 Estudios de marcadores genéticos realizados en gallos de combate.

En un estudio realizado en Japón por Komiyama y col. (2004) utilizaron 83 muestras de 14 especies nativas de Japón dentro de las cuales estudiaron un total de 3 aves Totenko, 4 Koeyoshi, 1 ave ornamental Uzurachabo, 42 aves de pelea Shamo, 3 aves de pelea Satusumadori, entre otras razas, se demostró mediante mtDNA D-Loop que las tres variedades de gallos de canto largo Naganakidori provienen de los gallos de pelea Shamo los cuáles son de Okinawa; esto implica que los pollos japoneses de canto largo se trajeron por primera vez a Japón continental como gallos de pelea de las regiones circundantes del sur de China o Indochina y de Okinawa.

Tadano y col. (2007) evaluaron mediante microsatélites a 480 aves de 9 especies nativas de Japón (Koeyoshi, Kurokashiwa, Minohiki, Ohiki, Onagadori, Satsumadori, Shoukoku, Toumaru, y Toutenkou) y dos especies comerciales (White Leghorn y White Plymouth Rock), hallándose 272 alelos, la heterocigosidad media observada (HO) y la heterocigosidad media esperada (HE) oscilaron entre 0.273



(Koeyoshi) y 0.523 (Shoukoku) y desde 0.293 (Koeyoshi) hasta 0.545 (Satsumadori), respectivamente. En particular, Koeyoshi exhibió un grado menor de diversidad genética que todas las demás razas en las medidas de diversidad genética ($HO = 0.273$, $HE = 0.293$). Por el contrario, se observó un alto grado de diversidad en Satsumadori y Shoukoku. (Satsumadori: $HO = 0.496$, $HE = 0.545$; Shoukoku: $HO = 0.523$, $HE = 0.527$). En cuanto a la distancia genética varió desde 0.2411 (entre Onagadori y Toutenkou) hasta 0.5988 (entre Onagador y White Leghorn).

Sulandari y col. (2008) evaluaron los pollos indígenas de indonesia de las razas Cemani, Kapas, Pelung, Arab Golden, Merawang, Araba Silver, KEdu, Kedu Putih, Kate, Gaok, Sentul, Wareng, Tolaki, Kalosi, Nunukan, en las cuales obtuvieron obtuvieron 434 locus en una población total de 483 individuos estudiados, la distancia genética entre Arab Gold con el pollo Gaok es muy lejana con un valor de 0.88, seguido por la distancia genética entre Arab Gold y los pollos Kalosi que fue de 0.823. Por el contrario, la distancia genética más cercana (0.002) ocurre entre Sentul y Merawang y también entre Kedu y Kapas; entre Kedu y White Kedu hay una distancia genética cercana de 0.003.

Nishibori y col. (2005) usaron 728 muestras de 22 razas de gallos nativos de Japón como son: Chabo, Gifu-Jidori, Jitokko, Kinpa, Koeyoshi, Kurokashiwa, Shamo, Kawachi-Yakko, Minohiki, Jidori. En los cuales se encontraron 206 alelos en 20 loci, hubo 435 pares de poblaciones posibles de los cuales los valores de la distancia genética variaron desde 0.103 a 0.673. Las distancias más bajas (0.103) y más altas (0.73) se observaron entre OSM-H y OSM-K y entre las poblaciones KRK y KWA, respectivamente.

En tres razas de las Islas Baleares, Méndez (2012), quien estudió 141 aves mediante muestras sanguíneas para análisis de microsatélites: 48 aves de raza Menorca, 46 de raza Ibicenca y 47 de raza mallorquina. El mayor número de alelos para los locus fueron de la raza Ibicenca las que presentaron el valor numérico más alto de alelos, de 5 y la raza Menorca ha sido la que presentó un menor número, de 4. La heterocigosidad observada (H_o) y la heterocigosidad esperada (H_e) para los microsatélites promediaron en la raza mallorquina 0.52 y 0.53 respectivamente, en la raza Ibicenca fueron 0.51 y 0.58 y la raza Menorca ha obtenido un H_o de 0.42, algo inferior a la H_e , que ha sido de 0.48.



Rosales (2007) realizó un estudio en Chile sobre características morfológicas en gallos de pelea locales representados por un espécimen racial en la Figura 9, dentro de su investigación se utilizó 567 individuos procedentes de 10 criaderos en dos regiones diferentes de dicho país, concluyó que los gallos de pelea presentan gran variabilidad en las características establecidas en su trabajo, las cuales fueron: peso vivo, longitud del metatarso, longitud y ancho del pico.



Figura 9. Gallo de pelea chileno

Fuente: Rosales (2007)

2.4 ADN mitocondrial

Las mitocondrias son organelos intracelulares que se encuentran dentro del citoplasma cuya función principal es la fosforilación oxidativa. Contienen su propio sistema genético para la síntesis de ADN y ARN, es decir posee una doble hélice circular de ADN, la cual está conformada por 37 genes en aves (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia) y una región conocida como D-loop que controla la replicación y transcripción en la molécula (Anderson y col., 1982).



El genoma mitocondrial está constituido por 16500 pares de base (bp) mientras que la región D-loop contiene 1122 bp también llamada región control, es estudiada debido a su elevada tasa de mutación aproximadamente 10 veces mayor que las regiones codificantes y por su elevada variabilidad intrapoblacional (López y Montoya, 2012).

En los últimos años los científicos han usado marcadores genéticos con el fin de conocer la estructura genética. Las secuencias polimórficas del ADN mitocondrial en la región d-Loop han sido frecuentemente usadas para describir líneas maternas en animales, la mayoría en aves (Storey y col, 2012; Hasan y col, 2016). A comparación de los microsátélites, la herencia del ADN mitocondrial no se transmite de forma mendeliana sino exclusivamente por vía maternal, esto proporciona información para la construcción de un árbol filogenético además de su elevada tasa de mutación la cual nos ayuda a la identificación del origen y la distribución de la población (Revelo, 2015).

2.5 Estudios con mtDNA D-Loop

Los diversos estudios que han utilizado mtDNA D-loop, han realizado secuenciación, determinación de parámetros de diversidad, análisis multilocus de varianza AMOVA, distancias genéticas y gráficos de filogenética (Wani y col, 2014; Liao y col, 2016).

A continuación, se indica la forma en cómo se presentan los patrones de secuencia, siendo representados los 15 haplotipos con H1-H15, y los nucleótidos guanina, citosina, timina y adenina con G, C, T, A respectivamente (Wani y col., 2014).

H1GC.....CC.CT...CTC...A

H2GCG...CC.CT...CTC....

H3 .C.GC.....CC.CT...CTC....

H4 G..GC.....CC.CT...CTC....

H5GC.....CC.CT.AACTC...



H6GC.....CC.CT...CTC.....

H7GC.....CC.CT...CTC.T...

H8 T...GC.....CC.CT...CTC.T..

H9GC....ACC.CT...CTC.....

H10GC....ACC.CT...CTC..G.

H11GC....CCC.CT...CTC....

H12C.....CC.CT...CTC.....

H13GC.....CC.CT...C.C.....

H14 ...C..TG..C.CCCCTG..CT.

H15 C... .C..TG..T....C.....C.C..

También se estudia la distribución y diversidad genética de haplotipos, la distancia y los árboles filogenéticos como han reportado Liao y col., (2016); Guo y col., (2017).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales Biológicos

- Penno plumas dorsales y plumas coberteras ventrales de gallos de pelea

3.1.2 Materiales Químicos

- Agua destilada estéril.
- Solución de lisis 2X (100 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM de EDTA, pH 8.0, 200 mM de NaCl, 50 mM de Sucrosa y 2 % de SDS) (Sigma, Cat. no.: T4661, EDS, S3014, S0389, 71725).
- Solución de proteinasa K (10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM de EDTA, pH 8.0, 50 % de Glicerol y 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, G5516, P2308).
- Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. no.: 77619).
- Etanol absoluto (Sigma, Cat. no.: E7148) y/o Isopropano (Sigma, Cat. no.: 278475).
- Etanol al 70 % (Sigma, Cat. no.: E7148 y W4502).
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).
- Agarosa (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).
- Solución buffer TAE 1X (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH 8.0 y 1 mM EDTA).
- Bromuro de Etidio (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).
- Buffer de carga para ADN 6X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol.
- Marcador de peso molecular para ADN (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).



3.1.3 Equipos y otros materiales

- Material de cristalería.
- Micropipetas (10, 100 y 1000 μ l).
- Puntas de diferentes tamaños para las micropipetas.
- Microtubos Eppendorf de diferentes volúmenes.
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Baño María
- Platina de agitación.
- Balanzas.
- Potenciómetro
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (-80 °)

3.1.4 Materiales de campo

- Termo de transporte
- Bolsas de plástico con cierre
- Overol, botas, guantes de inspección

3.2 Métodos

3.2.1 El área de estudio

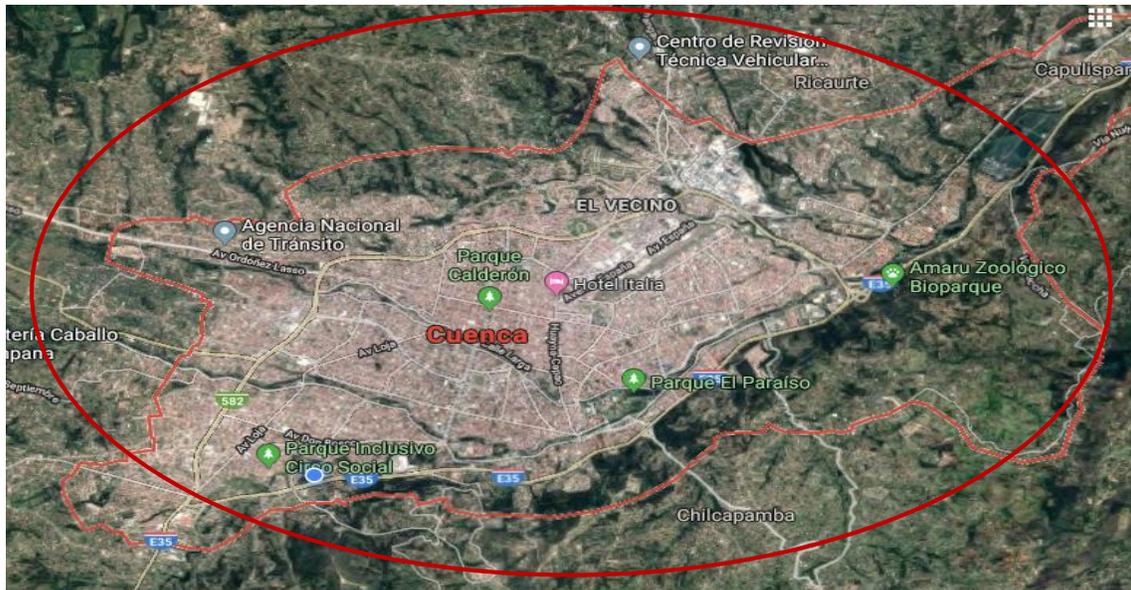


Figura 10. Cuenca - Ecuador

Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps, 2019.

3.2.2 Ubicación política-geográfica

El trabajo se realizó en criaderos de gallos de pelea en el cantón Cuenca, provincia del Azuay, República del Ecuador localizada en Latitud -2.897333 y Longitud -79.004430 .

Se realizó una muestra piloto en 10 criaderos del cantón Cuenca (tabla 3) para determinar la existencia de ecotipos de gallos de pelea, en donde se cuantificó a sus efectivos respectivos. Para seleccionar a los ecotipos en estudio se tomó en cuenta tres aspectos:

1) Ficha de toma de datos “Información del criador” (anexo 12), en donde se incluyó fotos por cada uno de los gallos existentes en el criadero (anexo 1, anexo 2, anexo 3, anexo 4, anexo 5, anexo 6)



2) Trabajo de mesa en el cuál con las fotos se recopiló información sobre las características de las aves (Tabla 4, Anexo 12) y se realizó la comparación con los patrones de las diferentes líneas genéticas descritas en la literatura.

3) Con dicha información seleccionamos tres de esos ecotipos para el trabajo según el criterio de los más abundantes (Tabla 3), conjunto con la consulta y razonamiento de un experto el cuál fue el PhD. Guillermo Guevara.

3.3 Unidad Experimental

Se tomaron en total 45 muestras de plumas, distribuidos en 15 individuos para estudio por cada uno de los ecotipos determinados: ecuatorianos, chilenos y puertorriqueños de los criaderos seleccionados del cantón Cuenca. Los animales escogidos de cada ecotipo en cada criadero fueron elegidos al azar. Las 15 muestras (plumas) de gallos cubanos fueron suministradas por el especialista Dr. Ángel Vázquez de la Universidad de Camagüey-Cuba y constituyeron la muestra de afuera o también conocida como “out”, como ha sido utilizada en los trabajos de Wani y col, (2014); Liao y col, (2016).

3.4 Metodología de la Investigación experimental

3.4.1 Método de obtención del material genético

Las muestras tomadas de las plumas fueron recogidas una vez determinados los ecotipos para su estudio en los 10 criaderos, en donde se extrajo 2 penno plumas dorsales, y 2 coberteras ventrales de

los gallos de pelea, estas fueron almacenadas en bolsas de plástico con cierre en un termo de transporte según lo indica Tauros (2019), luego fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en donde se realizó el aislamiento y amplificación mediante PCR.



3.4.2 Método para el procesamiento de las muestras colectadas, extracción y purificación.

Para el procesamiento, extracción y purificación se siguió la metodología molecular de Vallecillo (2019).

PASO 1. Fragmentar los folículos de las plumas con una tijera limpia y colocarlos en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

PASO 2. Adicionar 500 μ l de la Solución de Etanol al 70%, e incubar a temperatura ambiente (\pm 23 °C) por 30 min.

PASO 3. Centrifugar los tubos a 12,000 x g por 5 min a temperatura ambiente.

PASO 4. Retirar la Solución de Etanol al 70% cuidadosamente con una micropitepa.

PASO 5. Adicionar 500 μ l de agua destilada estéril, volver a centrifugar y retirar el agua.

PASO 6. Adicionar 500 μ l de agua destilada estéril, incubar por 30 min a temperatura ambiente volver a centrifugar y retirar el agua.

PASO 7. Adicionar 400 μ l de la Solución de lisis (12.5 mM de Tris-HCl, pH 7.5, NN mM de EDTA, NN mM de NaCl y 1 % de SDS).

PASO 8. Adicionar 50 μ l de la Solución de Proteinasa K (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308) en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol).

PASO 9. Adicionar 50 μ l de la Solución de DTT (Solución con 100 mM de DTT recién preparada), e incubar las muestras durante 14 - 16 h a 55 °C. Agitar las muestras ocasionalmente.

PASO 10. Una vez concluido el período de incubación de las muestras, adicionarles 500 μ l de la Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. No: 77619), mezclar en el Vortex por 10 -15 s

PASO 11. Centrifugar las muestras a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente.



PASO 12. Colectar el sobrenadante, colocarlo en un tubo nuevo y adicionarle 2.5 volúmenes de Etanol absoluto (Sigma, Cat. No: E7023) frío (± 4 °C), mezclar por inversión (4 -6 veces) y centrifuga en las condiciones arriba descritas (Paso 11).

PASO 13. Retirar el sobrenadante por decantación y adicionar 500 μ l de una Solución de Etanol al 70%, mezclar por inversión y volver a centrifugar a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente.

PASO 14. Retirar la Solución de Etanol al 70% por decantación, secar a temperatura ambiente, y una vez secas las pastillas resuspenderlas en 30 a 40 μ l de agua grado biología molecular.

PASO 15. Cuantificar con ayuda del espectrofotómetro.

3.4.3 Métodos para la amplificación del ADN mediante PCR.

Para la amplificación del ADN se aplicó la metodología indicada por Vallecillo (2019)

PASO 1: En un tubo Eppendorf de tamaño (1.5 o 2.0 ml) adecuado de acuerdo con el número de muestras que se van a ensayar se colocará los siguientes reactivos como lo indica la tabla 1, para tener por cada muestra un volumen final de reacción de 25 μ l.



Tabla 1. Reactivos para amplificación de ADN

Reactivo:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	12.9 µl	No aplica.
Buffer de amplificación 10X.			
Solucion de enhancer 10X.	10 X	2.5 µl	1X
dNTP´s	10 X	2.25 µl	1X
MgSO ₄			
Oligo L 16750-For	10 mM c/u	0.5 µl	0.2 mM c/u
Oligo CR16-Rev	50 mM	1 µl	2 mM
Enzima <i>Pfx</i> ADN polimerasa	100 µM	0.2 µl	0.8 µM
Muestra de ADN total.	100 µM	0.2 µl	0.8 µM
	2.5 U/µl	0.2 µl	0.04 U/µl
	10 ng/µl	5µl	2 ng/µl
Volumen final	-----	25 µl	-----

Fuente: Eguiarte y col., (2007)

Nota: El volumen de cada uno de los reactivos que se adicionan a la premezcla corresponde al producto de multiplicar el número de muestras por el volumen correspondiente al necesario por cada reacción.

PASO 2: De premezcla se tomarán 25 µl y se colocarán en un tubo de PCR (250 µl) y se le adicionará 5 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

PASO 3: Las reacciones de PCR preparadas se colocarán en el termociclador para iniciar el proceso de amplificación de acuerdo al siguiente perfil de temperatura programado. (Tabla 2)



Tabla 2. Perfil de temperatura de amplificación

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 35			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo (min´, seg´´)	5´	45´´	25´´	45´´	5´	
Temperatura (°C)	94.0°C	94.0°C		68.0°C	68.0°C	4.0°C

3.4.4 Secuenciación

La secuenciación se realizó por la empresa coreana MacroGen Inc., (MacroGen, 2019) a la cual se le envió los ejemplares como transporte de muestras clase 6.2 categoría B, con un triple embalaje por la empresa de mensajería FedEx. Se utilizaron los mismos iniciadores en la polimerización en cadena y 10 – 20 ng ADN usando el kit BigDye Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems). La secuenciación se elaboró mediante el analizador de ADN ABI3730XL (Applied Biosystems).

De las 60 muestras enviadas solo se lograron secuenciar con precisión las siguientes muestras: 10 ecuatorianas, 12 chilenas, 12 portorriqueñas y 8 cubanas. Las muestras fueron filtradas y repetidas cuatro veces; dos veces en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y dos veces por el laboratorio de MacroGen. Esto ocurre comúnmente por la naturaleza de algunas muestras según Vallecillo, 2019. Pero el número obtenido es suficientemente aceptable para los análisis y resultados de este tipo de estudio. Trabajos clásicos como el de Komiyama y col., (2006) han analizado desde una hasta dos muestras nada más, pues el carácter individual de una sola secuencia ya constituye un resultado.

3.5 Análisis estadístico.

Se realizaron los análisis estadísticos específicos para la genética del ADN mitocondrial. La secuencia del mtDNA de los primeros nucleótidos (840 pares de base, bp) de la región D-loop se utilizó para el



análisis después de editar las secuencias de fragmentos amplificados de la D-loop. Se realizaron múltiples alineamientos de las secuencias usando el programa ClustalX 1.83. Se realizó la construcción de un árbol filogenético circular con parsimonia, mediante el software MEGA ver.7.

El análisis de red implementado por Network 4.1.0.8. no se realizó porque al determinar los parámetros genéticos y analizarlos, se encontró que el número de haplotipos, diversidad de nucleótidos, Fst y AMOVA, mostraban gran similitud y cercanía génica para todos los ecotipos, por lo tanto, solo formarían un único Haplogrupo y hubiera sido necesario al menos dos para conformar una red. Se determinaron los índices de diversidad de secuencias de ADN D-loop para aclarar el polimorfismo de secuencia y el contenido de la variabilidad genética en las líneas de gallos. Los índices de poblaciones incluyen número de sitios de segregación (S), número de haplotipos (H), diversidad de haplotipos (Hd) y la diversidad de nucleótidos (π) según lo explicado por Nei. El análisis se realizó utilizando DnaSP versión 6.0. Se obtuvieron los siguientes parámetros: el número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre dos secuencias conocidas como diversidad del nucleótido (π) y que se define como:

$$\pi = n / (n - 1) \sum_{i < j} x_i x_j \pi_{ij} \quad \text{o} \quad \pi = \sum \pi_{ij} / nc$$

Donde:

n es el número de secuencias de ADN examinados, x_i y x_j son las frecuencias de lo i th y j th tipo de DNA secuencias, respectivamente, en la muestra, π_{ij} que es la proporción de nucleótidos en los respectivos tipos de secuencias de ADN y nc que es el número total de comparaciones de la secuencia.

Se obtuvo el promedio de heterocigotos o diversidad de haplotipo, h , que se define según la fórmula de Nei:

$$h = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

Donde:

x_i es la frecuencia del haplotipo y n es el tamaño de la muestra.



El grado de diferenciación genética entre la población se estimó usando las frecuencias del haplotipo. La estructura genética poblacional fue determinada por la prueba de significación de F_{st} y N_{st} con Peakal y Smouse., (2006).

La diferenciación genética maternal se analizó usando análisis jerárquico de varianza molecular, AMOVA, mediante Peakal y Smouse., (2006).



3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4 Selección de ecotipos

Al realizar el muestreo en las visitas a los 10 criadores se encontraron 11 ecotipos: ecuatorianos, chilenos, puertorriqueños, españoles, dominicanos, peruanos, colombianos, brasileños, venezolanos, un solo gallo tailandés y un gallo cubano, su distribución puede observarse en la tabla 3. En el estudio se pudo observar que dentro de los criaderos existen muchos individuos cruzados o mestizos, muy pocos animales presentan *pedigree*.

Los ecotipos seleccionados se basaron en la tabla 3 y 4. Los gallos ecuatorianos cumplían la condición desde el punto de vista que tenía el criador y según las fotos el experto consideró que efectivamente pertenecen a los ecuatorianos. Los chilenos también se encontraban bien distribuidos y cumplieron con las características morfológicas de acuerdo al trabajo de Rosales Montecinos, (2007). Se decidió seleccionar a los puertorriqueños por sobre los peruanos y dominicanos debido a su mejor distribución entre los criaderos.

Aunque se encontraron gallos españoles en las visitas realizadas, estos no fueron seleccionados por su pobre distribución, puesto que estaban mayoritariamente concentrados en un solo criadero y el dueño del mismo no permitió acceder a la toma de muestras y realizar un número suficiente de fotos.



Tabla 3. Distribución de las subpoblaciones en 10 criaderos pertenecientes a Cuenca – Ecuador.

Criaderos	Ubicación	Población	Desde cuando los tienen	E C	C H	P E	C O	V E	B R	P R	R D	C U	E S	T A
C1	-2.9122, -78.968	60	2011							4				
C2	-2.894, -79.073	80	1994	50									1	
C3	-2.890, -78.978	40	2004	40										
C4	-2.945, -79.045	150	1998		3						2		1	1
C5	-2.867, -78.985	150	2006			1	8	4	2	8	7			
C6	-2.866, -78.984	1000	2002		30			4	2	30	30		25	
C7	-2.865, -78.985	250	2010				250							
C8	-2.903, -79.020	60	1996	35										
C9	-2.915, -79.068	12	2008	1	7						2			
C10	-2.870, -79.024	300	2015			1				12	4	1		
TOTAL		1882		126	40	2	258	8	4	54	45	1	27	1

En la tabla 3 las columnas EC, CH, PE, CO, VE, BR, PR, RD, CU, ES y TA, son abreviaturas de los países en donde fueron originarios los gallos de pelea de los 10 criaderos en estudio; siendo Ecuador, Chile, Perú, Colombia, Venezuela, Brasil, Puerto Rico, República Dominicana, Cuba, España y Tailandia los respectivos países a cada una de las mismas.

De acuerdo a las diferencias morfológicas observadas en la tabla 4, el pico de los puertorriqueños resultó más largo en relación a los otros ecotipos, también tenían mayor tamaño, cola más erguida, plumas dorsales más largas y una característica distintiva fue que estas plumas abrazaban el vientre. Los gallos ecuatorianos presentaban diferentes tipos de crestas a diferencia de los chilenos y



puertorriqueños que tenían la cresta en forma de nuez, además poseían la cola más corta y un color del tarso oscuro, esto nos permitió clasificar y seleccionar este ecotipo como muestra local.

Tabla 4. Características morfológicas en los ecotipos seleccionados.

	CHILENO	ECUATORIANO	PUERTORRIQUEÑO	OBSERVACIÓN
PLUMAS	roja/azul/ negra/ parda	negro/barrado/ pardo/rojizo	rojo/negro/blanco/	
TARSO	6 - 7 cm	5,9 - 7,3 cm	6,3 - 7,1 cm	Oscuro en el ecuatoriano
CRESTA	Nuez	Guisante, roseta, sencilla, nuez	Nuez	Morfología variada en el ecuatoriano
PICO	Medianamente largo en relación a los otros ecotipos	Medianamente largo en relación a los otros ecotipos	Más largo en relación a los demás	
COLA	Largo	Corta	Larga, erguida (plomas, blancas, negra)	La cola del puertorriqueño es erguida
TAMAÑO	menor	menor	mayor	
PLUMAS DORSO			Más largas y abrazan al vientre	

Los gallos dominicanos no fueron seleccionados por provenir del Caribe, la misma zona geográfica y a muy corta distancia geográfica de Puerto Rico. Estos últimos existen en una mayor cantidad y están similarmente distribuidos, con mayor número de animales en los criaderos y están más consolidados dentro de los mismos. Existen 2 lugares geográficos tomados para este estudio de donde se tomaron las muestras, en los cuales solo aparecen 2 gallos dominicanos.

Es necesario acotar que en estudios anteriores realizados en aves con mtDNA D-loop, los autores tomaron las muestras directamente a partir de las localidades donde se encontraban los ecotipos sin realizar un análisis o clasificación morfológica. Esto se aprecia en los trabajos realizados por Komiyama y col. (2004) en las islas de Japón en el cual evaluaron ochenta y cinco aves: 34 ornamentales, 42 gallos de pelea. Wani y col. (2014) estudiaron en Sudán 81 aves distribuidas en 5 poblaciones lo mismo sucedió con Englund y col. (2014) que analizaron 40 aves de 9 razas suecas.

4.2 Parámetros genéticos mtDNA D-Lopp



Se obtuvieron 4 ecotipos y 42 secuencias: 10 ecuatorianas (23.8%), 12 chilenas (28.58%), 8 cubanas (19.04%) y 12 puertorriqueñas (28.58%), todas con una longitud de secuencia de 842 bp, de las cuales se observaron un total de 18 haplotipos: 6 ecuatorianos (EC), 6 chilenos (CH), 5 puertorriqueños (PR) y 7 cubanos (CU), determinados desde el H1 hasta el H18, además se identificaron 38 sitios de mutaciones transicionales (Tabla 5 y Anexo 13). En los trabajos realizados por Meydan y col. (2016) y Jia y col. (2017) se observan 19 haplotipos y una media de 26 sitios transicionales, a pesar de que el tamaño de sus muestras constituían el doble en relación al tamaño muestral del presente estudio. El mayor porcentaje de haplotipos se presentó en H2 el cual superó con aproximadamente 21% a H9.

El número calculado de sitios polimórficos y la diversidad de haplotipos de los 4 genotipos se observan en la Tabla 6. El promedio total de la diversidad de nucleótidos (π) es superado aproximadamente con el doble por la muestra del outside; no así con el resto de ecotipos obtenidos en el cantón Cuenca, los cuales presentaron alrededor de la mitad de ese valor, esto nos indica una mayor diversidad de nucleótidos en la muestra outside.



Tabla 5. Haplotipos determinados.

		Sitios de mutación																																										
		0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	6							
		7	7	7	8	0	0	1	2	6	0	0	1	2	2	3	4	4	5	5	0	0	2	3	5	8	9	9	1	1	2	4	4	5	4	5	7	8	3					
		4	7	9	4	1	3	5	4	4	7	8	4	2	6	8	0	4	3	8	3	7	7	4	1	8	0	6	2	4	5	3	4	8	8	9	9	2	2					
Sec cord		T	T	C	A	A	T	A	T	C	T	A	T	T	C	A	T	A	T	C	T	C	C	T	T	C	G	G	G	C	G	C	T	T	T	T	G	G	T					
H1	EC-12-17	.	.	G	A	T	C	.	C	C	.	C	C	C	T	.	T	A	.	.	T		
	EC-13-18	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	EC-15-20	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	EC-16-21	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	EC-21-26	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	EC-29-29	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	CH-04-34	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	CH-07-38	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
H2	CH-09-40	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	CH-10-42	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	CU-18-56	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	CU-19-57	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	PR-04-09	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	PR-07-12	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	PR-08-13	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
	PR-09-14	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T		
H3	EC-17-22	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	C	.	.	
H4	EC-18-23	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	C	
	EC-19-24	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	A	.	
	CH-05-36	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	A	.	
H5	CH-08-39	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	A	.	
	PR-24-02	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	A	.	
	PR-01-04	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	A	.	
H6	EC-28-28	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	A	.	.	T	C	.	A	.	
H7	CH-02-32	T	C	.	C	C	.	C	C	T	C	T	T	T	
	CH-03-33	T	C	.	C	C	.	C	C	T	C	T	T	T	
H8	CH-06-37	T	C	.	C	C	T	.	C	C	T	.	T	T	
	CH-11-43	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	
	CH-12-44	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	
H9	PR-02-06	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	
	PR-03-08	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	
	PR-05-10	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	
	PR-23-01	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	
H10	CH-13-45	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	A	.	.	T	A	.	
H11	CU-14-46	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	A	.	.	T	A	.	
H12	CU-16-54	A	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	.	.	.	C	.	.	A	.	T	C	.	A	.	.	.		
H13	CU-17-55	T	C	.	C	C	.	C	C	T	T	T	.	.	T	A	.	
H14	CU-20-58	G	G	.	.	.	C	.	A	T	C	G	C	C	.	C	C	C	T	.	T	.	A	.	.	.	T	.	.	T	C	.	C	.	A	.		
H15	CU-21-59	T	G	T	A	T	C	.	C	C	.	G	C	C	T	T		
H16	CU-22-60	A	T	C	.	C	C	.	C	C	C	T	.	T	.	.	C	.	.	T	.	.	T	A	.	
H17	PR-10-15	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	G	G	A	.	A	C	.		
H18	PR-25-03	T	C	.	C	C	.	C	C	T	.	T	T	A	.



Tabla 6. Parámetros genéticos de mtDNA D-loop de los cuatro ecotipos estudiados: Ecuatorianos, Chilenos, Puertorriqueños y Cubanos.

ECOTIPOS	NÚMERO DE SECUENCIA	SITIOS DE SEGREGACIÓN	π	NÚMERO DE HAPLOTIPOS	Hd	K	Tajimas D
PR	12	7	0.0486	5	0.803 ± 0.0060	1.84848	-0.7926
EC	10	7	0.0491	6	0.778 ± 0.0188	1.86667	-1.0403
CH	12	6	0.0462	6	0.804 ± 0.0051	1.75758	-0.4400
CU	8	17	0.1710	7	0.964 ± 0.0059	6.50000	-0.8190
TOTAL	42	34	0.0861	18	0.855 ± 0.0019	3.27500	-2.0051

PR = Puerto Rico, EC= Ecuador, CH= Chile, CU= Cuba, π = Diversidad de Nucleótidos, Hd= Diversidad de haplotipos, K= Promedio de las diferencias del número de nucleótidos.

De los 4 ecotipos, existió diversidad haplotípica (Hd) como se aprecia en la tabla 6. El ecotipo de Ecuador fue el que obtuvo el menor valor de diversidad de haplotipos en relación con el resto de ecotipos; no obstante, en el caso de Cuba, en donde se obtuvo el mayor valor de diversidad haplotípica.

Los haplotipos compartidos donde existe diversidad de ecotipos son el H2, H5, H9. El H2 se presentó en los 4 ecotipos, con mayor abundancia en las secuencias de Ecuador, Chile y Puerto Rico, los gallos cubanos presentan 6 haplotipos únicos, le siguen los chilenos y ecuatorianos que tienen 4 y el genotipo más pobre fue el de los puertorriqueños. Acorde con esta investigación se sugiere que la variabilidad de haplotipos cubanos puede ser a causa de que las muestras fueron recolectadas a lo largo del país mientras que en el resto de Ecotipos las muestras fueron recolectadas solo de una ciudad, en este caso Cuenca, otra variante es debido a que Cuba mantiene una completa restricción a la exportación de animales, es por eso que existe poca diversidad de gallos cubanos alrededor de Sudamérica. Estudios anteriores Storey y col., 2012 han explicado la semejanza de gallos chilenos y del lugar donde



antes era conformada la Gran Colombia, es por eso que existió poca diferencia entre los ecotipos de Ecuador y Chile.

En la figura 10 se destaca un arco relativamente alejado de todos los demás en el cuál se encuentran presentes 4 secuencias cubanas, una de ellas representada por la secuencia CU20-58 alejada de las demás y una ecuatoriana, todas ellas individuales. Otro arco alejado de este agrupa a la secuencia base de coordenadas en el cual se encuentran 4 secuencias puertorriqueñas y 2 chilenas. Existen 4 secuencias ecuatorianas que se encuentran dentro de una misma agrupación, el resto se encuentran agrupadas con secuencias individuales de los otros tres ecotipos.

Al observar la Tabla 7 se aprecia que no existe diferencia de la divergencia evolutiva entre los 4 ecotipos, esto pudiera estar determinado por el origen español de los animales que fueron traídos a este continente en los últimos 500 años, que en la evolución representa un periodo muy corto. No obstante, por la propia cercanía geográfica existe una mínima diferencia entre los ecotipos del Caribe con los ecotipos de Sudamérica.

Tabla 7. Estimaciones de divergencia evolutiva sobre pares de secuencias entre grupos.

EC	EC	CH	CU
CH	0,003		
CU	0,008	0,008	
PR	0,003	0,003	0,009

EC=ecotipos ecuatorianos, CH=ecotipos chilenos, CU=ecotipos cubanos, PR=ecotipos puertorriqueños

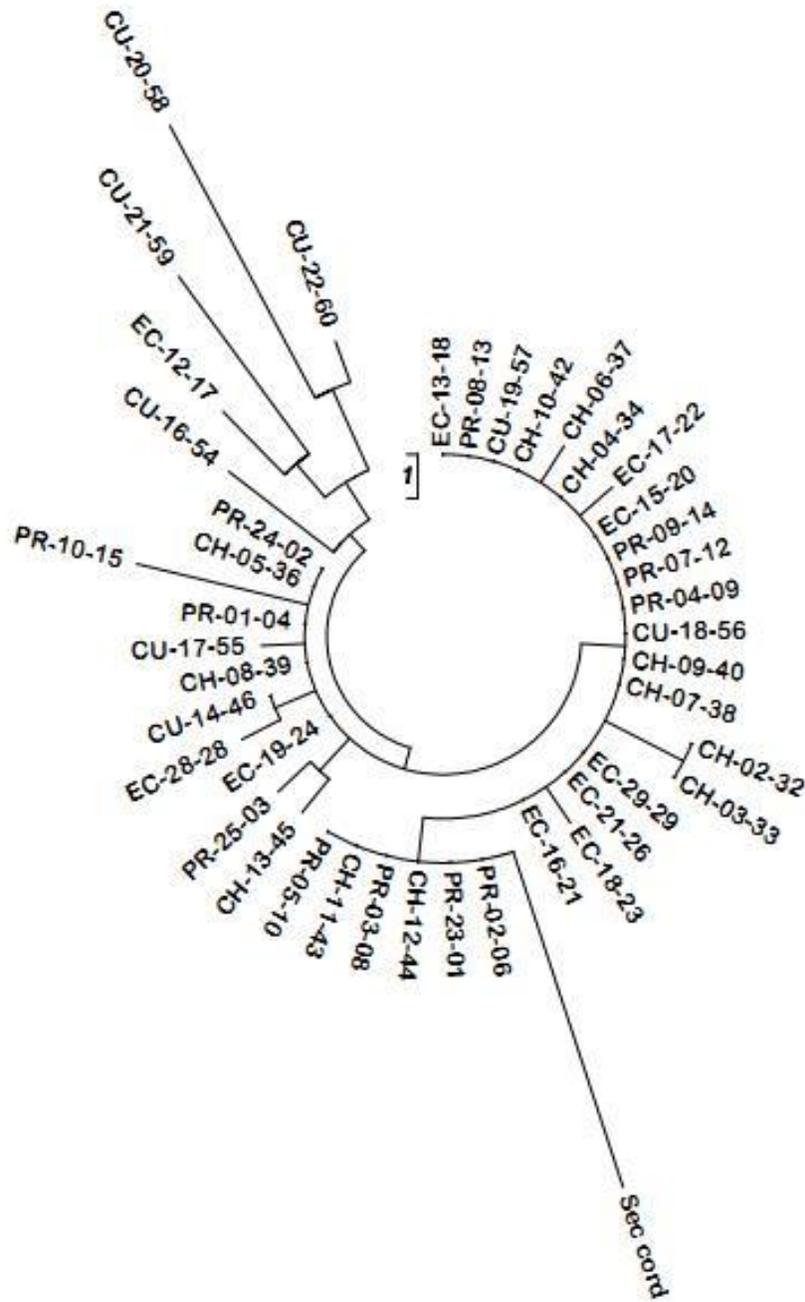


Figura 11. Determinación de la relación entre los ecotipos y la secuencia de coordenadas (sec cor) utilizando el método de árbol circular reducido mediante parsimonia.



4.3 Diferenciación genética maternal

La variabilidad entre poblaciones es relativamente baja con respecto a la variabilidad intra poblaciones como se aprecia en la tabla 8, esto indica una mayor heterogeneidad dentro de cada ecotipo. En el trabajo realizado por Wani y col, (2014) analizaron 5 razas sudanesas de aves obtuvieron un resultado semejante, con una superioridad en la varianza dentro de razas, (88.6%), en relación a la varianza del presente trabajo (11.4%).

Tabla 8. Análisis de varianza multilocus, AMOVA.

Fuente de variación	GI	SC	CM	Varianza estimada	%	Significación
Entre poblaciones	3	7,101	2,367	0,077	5%	
Intra poblaciones	38	59,542	1,567	1,567	95%	*
Total	41	66,643		1,644	100%	

Se determinó el estadígrafo $\Phi_{iPT}=0,047$ con el software de Peakal y Smouse 2006.

Este resultado, con menos del 10% de la componente de varianza entre poblaciones, refleja la importancia de que los criadores de gallos pongan más atención en su propia población y en las diferencias que muestran sus animales como un criterio más trascendental que adquirir nuevas razas o líneas de gallos extranjeros. Para esto tendrían que aplicar 2 estrategias: 1) marcar y llevar registro de los animales en cuánto a sus diferentes caracteres de interés zootécnico. 2) podría efectuar las técnicas utilizadas en este trabajo.

El coeficiente F_{st} encontrado, que explica la variación entre poblaciones, fue bajo de 0.10083 y el coeficiente N_{st} fue de 0.11026. Estos resultados son muy cercanos en valor, considerando el último más preciso cuando se trata de secuencias, ambos son más altos que el valor de la varianza entre poblaciones del AMOVA, que es menos sesgado que los anteriores según Excoffier y col., (2005).



Liao y col. (2016) hallaron un F_{st} igual a 0.0899 (9%), similar a este trabajo. Menores distancias entre poblaciones fueron encontradas en razas egipcias, de tan solo 0.26% en la varianza entre por Eltanany y col., (2016). Esta tendencia fue totalmente diferente en razas indonesias, que alcanzaron un 32,15% según publicaron Sulandary y col., (2008).

El parámetro de evolución neutral, D de Tajima fue negativo e indica que no hay neutralidad y que los ecotipos estudiados presentan selección negativa o tamaños de poblaciones reducidos, como explican Perfectti y col., (2009), a diferencia de lo encontrado por Liao y col., (2016) en China, que reportaron valores de D entre -1,12 y 0,84 lo que indica la existencia de mutaciones nuevas y selección en esas aves y una evolución equilibradora alrededor de cero.

La obtención de las secuencias de gallos ecuatorianos cumple los requisitos en número de pares de bases nitrogenadas, más de 500 como lo usado en el trabajo de Wani y col, (2014), así como en los métodos utilizados, softwares empleados los cuales pueden ser diferenciadas y comparadas con otras en esta especie. Se han establecidos diferentes haplotipos y se han calculado sus parámetros génicos, esta información puede permitir la solicitud para su inclusión en bases internacionales de genes, lo que sería de utilidad para realizar comparaciones posteriores y como guía en posteriores estudios locales, nacionales e internacionales.



4 CONCLUSIONES

En este estudio se da a conocer la primera caracterización genética a nivel de ADNmt de gallos ecuatorianos criados en el cantón Cuenca. Los ecotipos de gallos ecuatorianos, chilenos, puertorriqueños y cubanos mostraron poca variabilidad entre ellos, la mayor variabilidad se encontró dentro de cada uno. En los 19 haplotipos solo en uno se encuentran representados los 4 ecotipos, la mayoría de ellos están representados por un solo individuo.

El ecotipo cubano (outside) presentó valores superiores de parámetros genéticos como: sitios de segregación, número de haplotipos, diversidad de haplotipos y promedio de las diferencias del número de nucleótidos, todo esto en relación a los ecotipos restantes.

Es importante indicar que los 3 ecotipos más frecuentes en los criaderos fueron: puertorriqueños, ecuatorianos y dominicanos.

5 RECOMENDACIONES

Se recomienda impartir capacitaciones entre y para los criadores, con el fin que conozcan los elementos principales de este tema, y así puedan solicitar ayuda para aplicarlos en la mejora de sus animales.

También se sugiere ampliar la muestra de animales y ecotipos, así como desarrollar comparaciones con ecotipos más alejados en sus propósitos zootécnicos y en su posicionamiento geográfico.

Solicitar la inclusión de las secuencias obtenidas de los gallos ecuatorianos estudiados en un banco de información genética.



6 BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, S.; Bruijin, M.H.L.; Coulson, A.R.; Eperon, I.C.; Sanger, F.; Young, I.G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: 683-717.
- Ángel, P. A., Cardona, H., Y Ceròn, M. F. (2013). GENÓMICA EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(2), 497-518.
- Bejarano, D., Pedraza , A., Rocha, J. F., Y Martinez, R. (Enero-Junio de 2012). Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana. (Redalyc, Ed.) *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agorpecuaria*, 13(1), 97-107. Recuperado el 03 de Diciembre de 2018 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945032011>
- Calistri, M. (1985). Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado el 28 de Noviembre de 2018, de https://ddd.uab.cat/pub/selavi/selavi_a1986m12v28n12/selavi_a1986m12v28n12p399.pdf
- Crooijmans, R., Groen, A. F., Van Kampen, A. J., Van Der Beek, S., Van Der Poel, J. J., Y Groenen, M. A. (Agosto de 1996). Microsatellite Polymorphism in Commercial Broiler and Layer Lines Estimated. *Poultry Science*, 75, 904-909. Obtenido de Microsatellite Polymorphism in Commercial Broiler and Layer Lines Estimated.
- Eltanany M.A., Hemeda Sh. (2016). Deeper insight into maternal genetic assessments and demographic history for Egypti an indigenous chicken populations using mtDNA analysis. *Journal of Advanced Research*. 7, 615–623.
- Excoffier, L., G. Laval y J.A. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for popula-tion genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*1 : 47-50.
- Eguiarte, L., Souza, V., Y Aguirre, X., (2007). *Ecología molecular*.
- Englund, T., Stromsdet, L., Y Johansson, A. M. (2014). Relatedness and diversity of nine Swedish local chicken breeds as indicated by the mtDNA D-loop. *Hereditas*, 151, 229–233. doi:



10.1111/hrd2.00064

FAO. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 12 de Diciembre de 2019, de <http://www.fao.org/home/en/>

Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S., Y Kondo, N. (20 de Diciembre de 1994). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Recuperado el 28 de Noviembre de 2018, de <https://www.pnas.org/content/91/26/12505.short>

Guo, H. W., Li, C., Wang, X. N., Li, Z. J., Sun, G. R., Li, G. X., . . . Han, R. L. (2017). Genetic diversity of mtDNA D-Loop sequences in four native Chinese chicken breeds. *British Poultry Science*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2018, de <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2017.1332403>

Hans, L., Y Ballekom, W. (2014). *Aviculture-Europe*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2018, de <http://www.aviculture-europe.nl/nummers/14e01a05.pdf>

Hasan, M., Pish Jang, C., Yilduz Ali, M., Y Weigend, S. (2016). Maternal Origin of Turkish and Iranian Nnative Chickens Inferred from Mitochondrial DNA D-Loop Sequences. *Journal of Animal Science*, 29, 1547-1554.

Hillel, J., A.M. Groenen, M., Tixier Boichard, M., B. Korol, A., David, L., M. Kirzhner, V., . . . P.M.A., R. (2003). Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet. Sel. Evol.*, 35, 533-557.

Jia, X. X., Lu, J., Tang, X. J., Fan, Y. F., Huang, S. H., Ge , Q. L., Y Gao, Y. S. (2017). Genetic diversity of Jiangsu native chicken breeds assessed with the mitochondrial DNA D-loop region. *Brithish Poultry Science*. Recuperado el 17 de Diciembre de 2018, de <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2017.1395391>

Komiyama, T., Ikeo, K., Y Gojobori, T. (2004). The evolutionary origin of long-crowing chicken: its evolutionary relationship with fighting cocks disclosed by the mtDNA sequence analysis. *GENE*, 333, 91-99.



- Liao, Y., Mo, G., Sun, J., Wei, F., Y Liao, D. J. (2016). Genetic diversity of Guangxi chicken breeds assessed with microsatellites and the mitochondrial DNA D-loop region. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 415-425.
- López Pérez, M. J., Y Montoya, J. (2012). Sistema genético mitocondrial humano. En R. A. Farmacia, *Sistema mitocondrial: Un reto en la Medicina Humana* (pág. 34). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Macrogen Inc. (2019). Macrogen. Recuperado el 20 de Diciembre de 2018, de Macrogen: https://dna.macrogen.com/esp/support/ces/guide/ces_sample_submission.jsp
- Méndez, R. M. (2013). DIALNET. Recuperado el 10 de Diciembre de 2018, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5294482.pdf>
- Méndez, Y. (2012). Caracterización comparada de las gallinas baleares. Còrdova, España: Universidad de Còrdova . Recuperado el 15 de Diciembre de 2018, de www.uco.es/publicaciones/publicaciones
- Meydan, H., Pish Jang, C., Yildiz Ali, M., Y Weigend, S. (Noviembre de 2016). Maternal Origin of Turkish and Iranian Native Chickens Inferred from Mitochondrial DNA D-Loop Sequences. *Journal of Animal Science*, 123(11), 1547-1554. Recuperado el 20 de Junio de 2019, de <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.1060>
- Muchadeyi, F., Eding, H., Simianer, H., Wollny, C., Groeneveld, E., Y Weigend, S. (2008). Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Animal Genetics*, 39, 615–622.
- Murilo, L. O., Y Gutiérrez Flores, J. (28 de Julio de 2012). Manual de crianza, raza, entrenamiento y reglamento del gallo de combate. Universidad Nacional Agraria. Recuperado el 26 de Noviembre de 2018, de <http://repositorio.una.edu.ni/1463/1/tnl01m977.pdf>
- Nishibori, M., Shimogiri, T., Hayashi, T., Y Yasue, H. (25 de Julio de 2005). Molecular evidence for



hybridization of species in the genus Gallus except for Gallus varius. Wiley online library. Recuperado el 5 de Enero de 2019, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2052.2005.01318.x>

Oka , T., Ino, Y., Nomura, K., Kawashima, S., Kuwayama, T., Hanada, H., . . . Akishinomiya, F. (29 de Mayo de 2007). Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. Wiley Online Library. Recuperado el 28 de Noviembre de 2018, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2052.2007.01604.x>

Peakall, R., Y Smouse. , P. E. (2006). Population genetic software for teaching and research. GENAIEx 6: Genetic Analysis in Excel., 288-295.

Perfectti F., F.X. Picó, J.M. Gómez. 2009. La huella genética de la selección natural. Ecosistemas 18 (1): 10-16. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=591>

Revelo Cuaspud , H. A. (2015). Diversidad genética de gallinas criollas del Suroccidente Colombiano mediante ADN mitocondrial. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, 21. Recuperado el 12 de mayo de 2019, de http://bdigital.unal.edu.co/47490/1/2018-01-Herman_Alberto_Revelo_Cuaspud.pdf

Rosales Montecinos, C. (2007). Estudio de algunas características fenotípicas en gallos de pelea en criaderos de la IX y X región de Chile. Universidad Austral de Chile. Recuperado el 28 de Diciembre de 2018, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fvr788e/doc/fvr788e.pdf>

Sañudo Astiz, C. (2013). Atlas mundial de razas en avicultura. En Atlas mundial de razas en avicultura (1era ed.). Zaragoza, España: Servet.

Storey, A., Athens, S., Bryant, D., Carson, M., Emery, K., deFrance, S., Y Highman, C. (25 de July de 2012). Investigating the Global Dispersal of Chickens in Prehistory Using Ancient Mitochondrial DNA Signatures. PLOS. Recuperado el 15 de Diciembre de 2018, de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039171>



- Sulandari, S., Arifin Zein, M. S., Y Tike Sartika. (Diciembre de 2008). Molecular Characterization of Indonesian Indigenous Chickens based on Mitochondrial DNA Displacement (D)-loop Sequences. HAYATI, 15(4).
- Tadano, R., Sekino, M., Nishibori, M., Y Tsudzuki, M. (2007). Microsatellite Marker Analysis for the Genetic Relationships Among Japanese Long-Tailed Chicken Breeds. Poultry Science, 86, 460-469.
- Tauros. (2019). Tauros Diagnostik GbR Niederwall. Recuperado el 20 de Enero de 2019, de Su laboratorio para el reconocimineto del ADN.: www.tauros-diagnostik.de
- Vallecillo, A. (2019). Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.
- Wani, C. E., Yousif , I. A., Ibrahim , M. E., Y Hassan , H. (2014). Molecular Characterization of Sudanese and Southern Sudanese Chicken Breeds Using mtDNA D-Loop. . Genetics Research International, 8. doi: 928420

7 ANEXOS

7.4 Fotografías de la investigación

Anexo 1: Gallos puertorriqueños de diferentes criaderos en Cuenca-Ecuador.



Figura 12. Gallo de pelea puertorriqueño.



Figura 13. Gallo de pelea puertorriqueño.

Anexo 2: Gallo español.



Figura 14. Gallo de pelea español.

Anexo 3: Gallo de Tailandia.



Figura 15. Gallo de pelea tailandés.

Anexo 4: Gallos chilenos en diferentes criaderos pertenecientes a Cuenca-Ecuador



Figura 16. Gallo de pelea rojo y blanco chileno.

Anexo 5: Gallos ecuatorianos en diferentes criaderos pertenecientes a Cuenca-Ecuador.



Figura 17. Gallos de pelea ecuatorianos.

Anexo 6: Gallos dominicanos en diferentes criaderos Cuenca – Ecuador.



Figura 18. Gallo de pelea dominicano.



Figura 19. Gallo de pelea dominicano.

Anexo 7: Medición de metatarsos en ecotipos presentes en los criaderos.



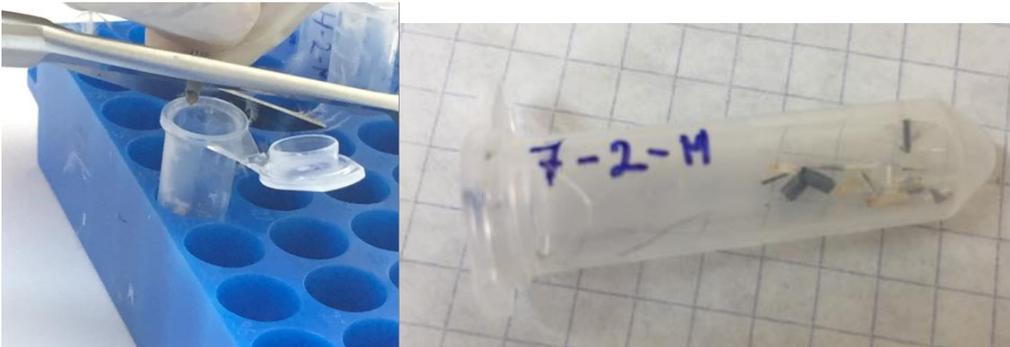
Anexo 8: Toma de muestras de plumas en diferentes ecotipos



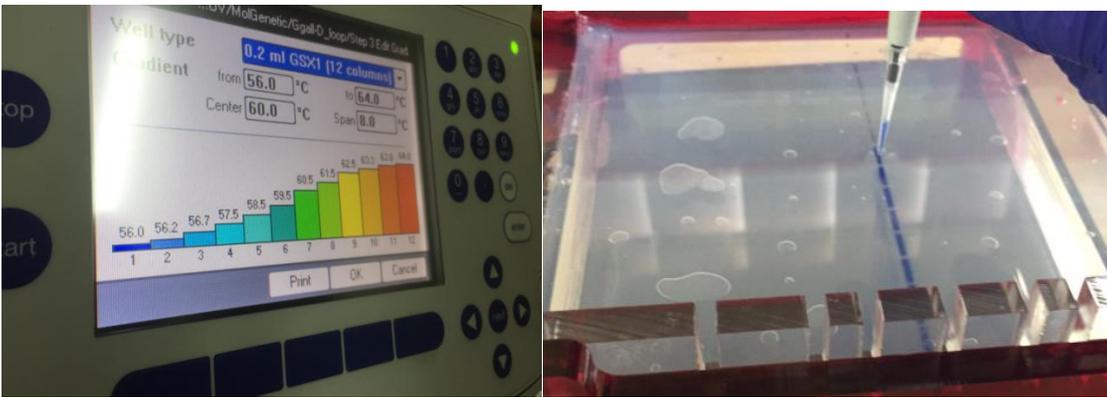
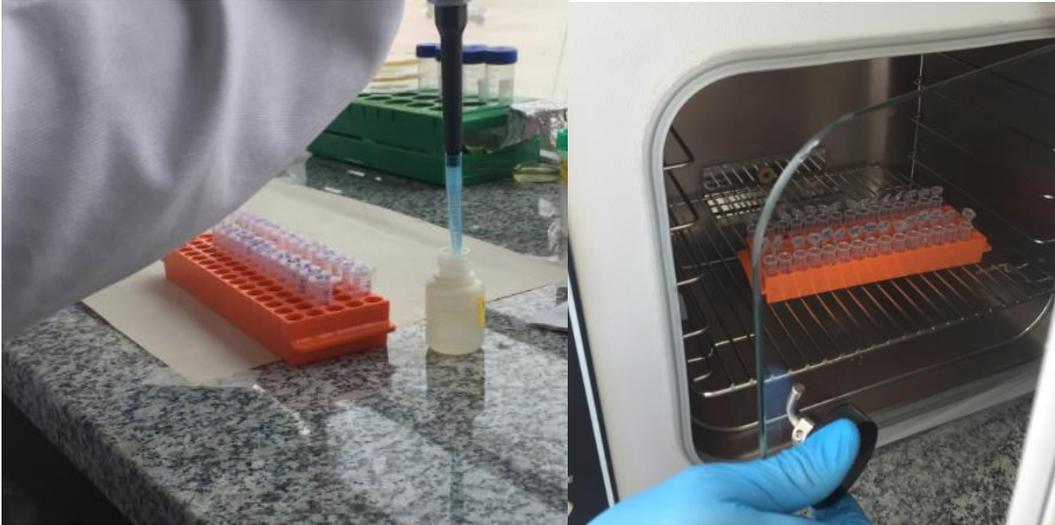
Anexo 9: Transporte de muestras de plumas.



Anexo 10: Tubo eppendorf con fragmentos de folículos de plumas en ecotipo puertorriqueños.



Anexo 11: Aislamiento, purificación y amplificación del material genético presente en cada uno de los ecotipos seleccionados



(Todas las imágenes son fuente de los autores)



Anexo 12: Fichas técnicas que proporcionan información para la selección de ecotipos.

INFORMACION DEL CRIADOR

Ficha de registro	
No.	Fecha:
Lugar:	
Nombre del criadero:	
¿Cuántos gallos finos tiene?	
¿Desde cuándo tiene los animales?	
¿Sabe de dónde provienen?	



CARACTERÍSTICAS DEL AVE

Criadero	
Número de muestra	
Ecotipo	

Tamaño del animal	Grande	Pequeño
Color de plumas		
Longitud del metatarso		
Forma Cresta		
Pico		
Cola		

Anexo 13: Haplotipos determinados de cada uno de los ecotipos en estudio.



H1 (EC-12-17).



H1 (EC-13-18).



H1 (EC-15-20).



H1 (EC-16-21).



H1 (EC-21-26).



H1 (EC-29-29).



H3 (EC-17-22).



H4 (EC-18-23).



H4 (EC-19-24).



H6 (EC-28-28).



H2 (PR-04-09).



H2 (PR-07-12).



H2 (PR-08-13).



H2 (PR-09-14).



H5 (PR-24-02).



H5 (PR-01-04).



H9 (PR-02-06).



H9 (PR-03-08).



H9 (PR-05-10).



H9 (PR-23-01).



H17 (PR-10-15).





H18 (PR-25-03).



H1 (CH-04-34).



H1 (CH-07-38).



H2 (CH-09-40).



H2 (CH-10-42).



H4 (CH-05-36).



H5 (CH-08-39).



H7 (CH-02-32).



H7 (CH-03-33).



H8 (CH-06-37).



H8 (CH-11-43).



H8 (CH-12-44).



H10 (CH-13-45).



Anexo 14: Dendograma rectangular de los ecotipos estudiados.





Anexo 15: *Recolección de datos mediante fichas técnicas*

Ficha de registro	
No. 1	Fecha: 25 de Marzo de 2019
Lugar: Mayancela -2.8667618, -78.9843731	
Nombre del criadero: Orobio	
¿Cuántos gallos finos tiene? 1000 gallos	
¿Desde cuándo tiene los animales? 2002	
¿Sabe de dónde provienen? Si	



Características del ave

Criadero	Orobio
Número de muestra	2
Ecotipo	Puerto rico

Tamaño del animal	Grande	Pequeño
		x
Color de plumas	Rojo pardo, blanco	
Longitud del metatarso	6.5 cm - 7.2 cm	
Forma Cresta	Nuez y sencilla	
Pico	Grueso y corto	
Cola	Alargada	



Ficha de registro

No. 2

Fecha: 09 de abril de 2019

Lugar: Sector colegio Eugenio Espejo -2.9039216, -79.0209135

Nombre del criadero: La Gloria

¿Cuántos gallos finos tiene?

60

¿Desde cuándo tiene los animales?

1996

¿Sabe de dónde provienen?

Si



Características del ave

Criadero	La Gloria
Número de muestra	2
Ecotipo	Ecuatoriano

Tamaño del animal	Grande	Pequeño
	x	x
Color de plumas	Negra, parda, rojizo.	
Longitud del metatarso	6.2 cm – 6.8 cm	
Forma Cresta	roseta	
Pico	Largo y fino	
Cola	Corta y en punta	



Ficha de registro	
No. 3	Fecha: 11 de abril de 2019
Lugar: Racar -2.8706632, -79.0245516	
Nombre del criadero: Mora	
¿Cuántos gallos finos tiene? 300	
¿Desde cuándo tiene los animales? 2015	
¿Sabe de dónde provienen? Si	



Características del ave

Criadero	Mora
Número de muestra	10
Ecotipo	Puerto riqueño

Tamaño del animal	Grande	Pequeño
	x	
Color de plumas	Rojo, blanco y pardo	
Longitud del metatarso	6.5 cm -7 cm	
Forma Cresta	Nuez y corta	
Pico	Prominente	
Cola	Alargada y erguida	