

BIODIVERSIDAD DE ECOTIPOS DE GALLINAS LOCALES DEL CHACO CENTRAL Y HUMEDALES DEL ÑEEMBUCÚ, PARAGUAY

Castro L.^{1,2*}, Núñez L.^{1,2,4}, Ramírez L.¹, Rodríguez I.^{1,2},
Florentín A.³, Álvarez R.^{1,2}, Martínez-López O.R.^{1,4}

¹RED CONBIAND Paraguay. *lizaurora@gmail.com.

²Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Asunción, U.N.A.

³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.N.A.

⁴Dirección General del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, U.N.A.

RESUMEN

Este trabajo de investigación representa el primer estudio realizado a nivel molecular en poblaciones de gallinas locales o criollas de Paraguay. El objetivo del presente estudio fue evaluar la diversidad genética utilizando un panel de 30 marcadores microsatélites. Fueron analizados 45 individuos pertenecientes a dos poblaciones avícolas, gallinas del Chaco Central (GCC) y gallinas del Ñeembucú (GCÑ), y 14 individuos que correspondieron a siete razas o poblaciones de referencias, de manera a determinar la distancia genética existente entre las poblaciones. Los valores del número promedio de alelos, heterocigosis esperada y heterocigosis observada en GCC y GCÑ fueron 5,87, 0,697 y 0,570, y 6,00, 0,661 y 0,518, respectivamente. Fueron identificados en ambas poblaciones un total de siete alelos privativos con una frecuencia mayor 10%. El valor medio del Contenido de Información Polimórfica fue de 0,614 en GCC y 0,598 en GCÑ. Todos los marcadores resultaron polimórficos. Los valores de FIS en las poblaciones GCC y GCÑ fueron de 0,139 y 0,222 respectivamente, demostrando niveles significativos de endogamia. La distancia genética de Nei demostró un alto grado de relacionamiento entre las poblaciones GCC y GCÑ con un valor igual 0,091. Sin embargo, los valores de distancia en relación con las poblaciones de referencias fueron superiores con rangos de 0,292 a 0,495. Los resultados obtenidos demuestran que el panel de marcadores microsatélites utilizado en este estudio demostró ser de gran utilidad en poblaciones locales y que estos grupos genéticos constituyen importantes reservorios de diversidad genética, siendo necesaria la implementación de estrategias de conservación.

Palabras clave: Genética animal; Microsatélites; Polimorfismo; Recursos genéticos.

BIODIVERSITY OF ECOTYPES OF LOCAL POULTRY IN THE CHACO CENTRAL AND ÑEEMBUCÚ WETLANDS, PARAGUAY

ABSTRACT

This research is the first study at the molecular level in populations of local native hens of Paraguay. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity using a panel of 30 microsatellite markers. Forty five individuals from two poultry populations were analyzed hens of Central Chaco (GCC) and hens of Ñeembucú (GCÑ). and 14 individuals belonging to seven races or populations of reference in order to determine the genetic distance among populations. Values of average of alleles, expected heterozygosity and observed heterozygosity in GCC population were 5,87, 0,697 y 0,570; and these values for the GCÑ population were 6,00, 0,661 y 0,518. In both populations a total of seven private alleles with a frequency greater than 10% were found. The average value of Polymorphic Information Content was 0,614 in GCC and 0,598 in GCÑ. All the markers were polymorphic. Values of FIS in the GCC and GCÑ were 0,139 and 0,222 respectively, showing significant levels of inbreeding in the Paraguayan poultry population. Nei genetic distance showed a high level of affinity among populations between population GCC and GCÑ, with a value of 0,091. However, the values of distance in relation to the reference population were higher with degrees of 0,292 to 0,495. The results show that the panel of microsatellite markers used in this study proved useful in local communities and that these genetic groups are important reservoirs of genetic diversity and that the implementation of conservation strategies are still required.

Keywords: Animal genetics; Microsatellite; Polymorphism; Genetic resource.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la gestión de la biodiversidad animal se ha convertido en un tema importante en la comunidad científica internacional, debido a cambios en los sistemas de producción a gran escala (FAO, 2007). En este sentido, existen sistemas tradicionales de explotación o de traspatio, que consisten en la crianza de animales, de interés productivo y comercial, en los patios de las casas o pequeñas fincas y sus alrededores, considerados reservorios importantes de biodiversidad genética. Estos sistemas se caracterizan por el uso de tecnología simple e instalaciones rudimentarias. Se maneja una variedad amplia de animales (vacuno, ovinos, caprinos, aves) producto principalmente de la cruce de varias razas, con bajos rendimientos comparados a los sistemas intensivos o industriales, pero

caracterizados por su rusticidad, generación de proteína de calidad y resistencia a diferentes enfermedades, contribuyendo de manera significativa a la economía, alimentación y a la participación productiva en familias a nivel rural. En el Paraguay las denominadas gallinas criollas o de genética local (con varias denominaciones populares, como ser *Ryguazú ajuraperô*, *paraguay*, *Ryguazu valle* ocupan un lugar muy importante en la producción familiar campesinas, por generar ingresos económicos y constituir una fuente de proteína de alto valor biológico (carne y huevos). La cría de este tipo de aves presenta ciertas ventajas con relación a las demás especies, como son: escasas prácticas de manejo, fácil reproducción, auto búsqueda de alimento y su producción no daña al medio ambiente. Es primordial mencionar que dichas poblaciones llegaron al continente americano con los españoles y han demostrado gran adaptabilidad a los ambientes más hostiles de nuestro territorio, el semiárido de la región chaqueña y los humedales del Ñeembucú. A pesar de los beneficios que representa la explotación de gallinas criollas o de traspatio, los estudios realizados han sido escasos o nulos, basándose prácticamente en estudios de prevalencia de algunas enfermedades como Bronquitis infecciosa aviar, Micoplasmosis aviar y Salmonelosis (Origlia *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Leotta *et al.*, 2010). Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas moleculares, es posible identificar variaciones o polimorfismos genéticos en secuencias de ADN mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites en poblaciones locales o criollas. Las estrategias de conservación de las poblaciones de gallinas deben basarse en la caracterización genética de las razas locales que sean necesarios para mantener la diversidad genética para la adaptación a las condiciones locales y las necesidades de mejoramiento imprevistos en el futuro, así como una fuente de material de investigación (Romanov *et al.*, 1996). Esto queda demostrado por los varios trabajos a nivel mundial que destacan la necesidad de la caracterización genética de poblaciones locales utilizando marcadores microsatélites (Muchadeyi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Zanetti *et al.*, 2009; Clementino *et al.*, 2010). Basado en lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad genética en dos poblaciones de gallinas locales de comunidades criadas en ambientes especiales y específicos como ser, el Chaco central y los humedales del Ñeembucú mediante marcadores microsatélites.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 45 animales procedentes de dos áreas geográficas bien diferenciadas fueron analizados en este estudio. Correspondieron 22 gallinas a la población de Gallinas Criollas del Chaco Central (GCC), localizadas en comunidades indígenas del Chaco Central (semiárido) y 23 Gallinas Criollas del Ñeembucú (GCÑ) de los

humedales del Ñeembucú y zonas de influencias. Ambos territorios presentan características especiales y específicas, relacionadas a la accesibilidad, tipo de suelo, vegetación y clima. La singularidad de los animales criollos, está dada por la heterogeneidad de los rasgos morfológicos (coloración variable de las plumas, diferente tamaño y conformación, crestas de formas diversas, pigmentación de los tarsos), además de ser animales no seleccionados para producción de carne y huevo. Fueron además empleados 14 animales que correspondieron a siete poblaciones de razas o líneas más utilizadas en el país como ser: Rustipollos (RUS), White Plymouth Rock (WHI), Sussex (SUS), Australorp (AUS), Araucana (ARA), Barred Plymouth Rock (BAR) y el Hissex Brown (HIS), empleadas como poblaciones de referencias que permitieron determinar las distancias genéticas. Se seleccionaron dos ejemplares, macho y hembra, de cada población de referencia por constituir éstas poblaciones genéticamente definidas, representando la cantidad utilizada suficiente para la estimación de la distancia genética. Las muestras de sangre 0,5 ml se obtuvieron de vena del ala de cada uno de los individuos, para posteriormente depositar 5 a 6 gotas en papel filtro tipo *whatman* que fueron almacenadas en sobres de papel a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada de la Universidad de Córdoba, España. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el método de resina Chelex[®] (Bio-Rad). Fue utilizado un panel de 30 marcadores microsatélites diseñados en siete múltiples, 29 de ellos están incluidos en la lista de marcadores recomendados por la FAO-ISAG para estudios de biodiversidad en gallinas (FAO, 2011), en tanto que el marcador el *MCW080*, fue seleccionado de un trabajo de investigación realizado en pavos reales de Tailandia (Thawonwan *et al.*, 2009). La amplificación se realizó por PCR, en un volumen final de 23 μ l conteniendo 50 ng de ADN genómico, 200 μ M de dNTPs, 10 mM Tris HCl, 1,5 mM MgCl₂, 1U Taq enzima polimerasa y 5 pmoles de cada marcador. Las condiciones de ciclado fueron 10 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 25-30 seg a 95°C, 45 seg a 55°C y 1 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. La secuenciación de los productos de PCR se realizó en un secuenciador automático ABI Prism 377 Stretch (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Fueron empleados el software de análisis de fragmentos GENESCAN (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division). La tipificación se realizó en base a estándares de alelos de poblaciones de referencias, utilizando el software GENOTYPER (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division). Los parámetros de diversidad genética, número de alelos por población, heterocigosis observada (H_o) y esperada (H_e) y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) fueron estimadas usando el programa Microsatellite-Toolkit de Excel (Park, 2001). El coeficiente de endogamia (F_{IS} , Weir & Cockerham, 1984), las desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg y

la distancia genética de Nei (Nei *et al.*, 1983) fueron calculadas utilizando el paquete de GenALEx (Peakall & Smouse, 2006)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores promedio del número de alelos, heterocigosis esperada (He), heterocigosis observada (Ho), Contenido de Información Polimórfica (PIC), coeficiente de endogamia (F_{IS}) y desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg por población paraguaya estudiada se presentan en la tabla I.

Tabla I. Cantidad de muestras por población, número promedio de alelos, valores de heterocigosis esperada, heterocigosis observada, Contenido de Información Polimórfica, Coeficiente de endogamia y número de locus con desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg (*Number of samples per population, average number of alleles, heterozygosity expected, observed heterozygosity, polymorphic information content, inbreeding coefficient values and number of loci deviating from Hardy Weinberg equilibrium*)

Población	Nº muestras	Nº medio de alelos±DE	He±DE	Ho±DE	PIC	F _{IS}	dHWE
GCC	22	5,87±3,07	0,679±0,137	0,570±0,160	0,614	0,139	10
GCÑ	23	6,00±3,11	0,661±0,135	0,518±0,205	0,598	0,222	10

GCC: Gallinas criollas del Chaco Central; GCÑ: Gallinas criollas del Ñeembucú; He: Heterocigosis Esperada; Ho: Heterocigosis Observada; PIC: Contenido de Información Polimórfica; F_{IS}: Coeficiente de endogamia; dHWE: número de locus con desviaciones en el equilibrio de Hardy Weinberg (p < 0,05)

El valor medio del número de alelos en la población GCÑ fue de 6,00, ligeramente superior a la descrita en la población de GCC, con valor igual a 5,87, demostrando resultados altamente superiores en relación a los hallados en razas de gallinas domesticadas pero no seleccionadas (Hillel *et al.*, 2003), en la raza española *Prat Leonada* (Álvarez *et al.*, 2008), en la raza local italiana *Polverara Nera* (Zanetti *et al.*, 2009) y en gallinas españolas baleares *Ibicenca*, *Mallorquina* y *Menorquina* (Méndez *et al.*, 2011). Sin embargo, fue inferior al obtenido en una población de pollos indígenas de China, el *Wannan Three-yellow* (Chen *et al.*, 2008). El promedio de alelos indica en cierta manera la variabilidad genética de las poblaciones (Martínez Martínez, 2001). Teniendo en cuenta este parámetro, la población GCÑ presentó mayor variabilidad en relación a la población GCC. El alto número de alelos encontrados puede indicar dos posibles situaciones: gran variación genética en las poblaciones ancestrales que dieron origen a estas poblaciones, o migración de otras razas acontecidas en épocas recientes (Quiroz, 2007). En ese sentido, las poblaciones GCC y GCÑ fueron introducidas al

continente americano varios siglos atrás con los españoles, producto del cruzamiento de varias razas y/o líneas estimándose que la variación genética presente en estas poblaciones avícolas locales podría atribuirse a mezcla de diferentes razas que le dieron origen. En ambas poblaciones fueron detectados siete alelos con una frecuencia mayor al 10%. El número de alelos privativos o específicos son aquellos alelos que se detectan solamente en una población. El valor de alelos privativos encontrado en gallinas criollas de Paraguay fue mayor a los encontrados en razas locales italianas (Zanetti *et al.*, 2009), en la raza española *Prat Leonada* (Álvarez *et al.*, 2008) y en la población de gallinas domesticadas pero no seleccionadas (Hillel *et al.*, 2003). Los valores de H_e y H_o fueron ligeramente superiores en la población GCC en relación a la población GCÑ, con valores de $0,697 \pm 0,137$ y $0,570 \pm 0,160$, y $0,661 \pm 0,135$ y $0,518 \pm 0,205$ respectivamente. Los valores de heterocigosis mayores a 0,5 son considerados altos (Armstrong, 2004). Teniendo en cuenta esto, ambas poblaciones presentaron valores superiores a 0,5 indicando buena variabilidad genética en las dos poblaciones aviares. Los resultados fueron similares e incluso superiores a los observados en gallinas nativas comerciales taiwanesas (Pham *et al.*, 2013), líneas de pollos japoneses derivadas de la raza Plymouth Rock (Tadano *et al.*, 2013), en la gallina española de *Sobrarbe* (Monteagudo *et al.*, 2011), razas de gallinas indígenas (Chen *et al.*, 2008) y en ecotipos de Zimbabwe (Muchadeyi *et al.*, 2007). Los valores del Contenido de Información Polimórfica (PIC) fueron de 0,614 en GCC y 0,598 en GCÑ. Estos valores fueron superiores a los reportados en gallinas comerciales taiwanesas con 22 marcadores (Pham *et al.*, 2013), en gallinas nativas iraníes con 10 marcadores (Effat *et al.*, 2012), en gallinas locales italianas con 20 marcadores (Zanetti *et al.*, 2009) y en gallinas españolas empleando 30 marcadores (Grimal & Gómez, 2006). Todos los marcadores resultaron polimórficos en ambas poblaciones, representando el marcador *LEIO234* el más polimórfico con 17 alelos detectados y el menos polimórfico el *MCWI03* con dos alelos. Los valores de PIC mayores a 0,50 indican marcadores altamente informativos, de 0,50 a 0,25 marcadores medianamente informativos y menores a 0,25 ligeramente informativos (Bostein *et al.*, 1980). En este trabajo fueron descritos 21 marcadores altamente informativos y nueve medianamente informativos, considerándose este panel altamente informativo para estudios de variabilidad en poblaciones de gallinas criollas. El coeficiente de endogamia (F_{IS}) en las poblaciones avícolas GCC y GCÑ fueron de 0,139 y 0,222 respectivamente. El F_{IS} mide la reducción de la heterocigosis debida a los apareamientos no aleatorios en la población por lo cual indica el nivel de endogamia de los individuos de la población (Martínez, 2008). La magnitud del F_{IS} , viene dada por el valor absoluto del índice, siendo bajo si el valor está entre 0 y 0,05, medio si se

encuentra entre 0,06 y 0,15, alto si se encuentra entre 0,16 y 0,25 y muy alto si es mayor a 0,25 (Hartl, 1988). Por lo expuesto la población GCC presentó nivel medio de endogamia y la población GCÑ una alta endogamia, reflejada por la mayor diferencia en los valores de H_o y H_e en la población GCÑ que repercute de forma directa sobre el valor observado del F_{IS} . El número de marcadores con desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg se presentan en la tabla I. De todos los marcadores polimórficos el 33% presentaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg en ambas poblaciones, con un nivel de significancia del 5%. Las desviaciones observadas pueden ser causadas por varios factores como: apareamientos dirigidos, subdivisiones dentro de las poblaciones, ancestros comunes, la selección natural o artificial, la migración o el flujo de genes de una población externa, además de la presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente (Menezes, 2005). Este valor fue superior a los descritos en razas de gallinas españolas del programa de conservación del INIA donde encontraron de uno a seis marcadores con desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg en todas las poblaciones, lo que sugiere que las razas de gallinas han sido seleccionadas durante años para características morfológicas, aunque no descartaron que los resultados encontrados puedan deberse a la presencia de alelos nulos o error de genotipado (Dávila *et al.*, 2011). En genética de poblaciones los errores de genotipado pueden generarse en cada paso del proceso (muestreo, extracción de ADN, análisis moleculares, calificación y análisis de los datos) y por varios factores (casualidad, causas humanas, equipo, técnica de laboratorio), representando el motivo principal la interpretación errónea de las bandas de microsatélites generando falsos alelos que posteriormente alteran los resultados (Quiroz, 2007). Sin embargo, los valores encontrados en las poblaciones avícolas paraguayas fueron similares a los reportados en razas polacas, *la gallina con cresta de Hucisko* y en la población de gallinas nativas taiwanesas *Red feather*, con 30% y 31% de marcadores moleculares desequilibrados respectivamente (Antos *et al.*, 2013; Pham *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta los valores de F_{IS} y las desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg, se comprueba que las dos poblaciones avícolas paraguayas reportan niveles de endogamia, pudiendo ser consecuencia del sistema de crianza utilizado (al aire libre) con bajo número de reproductores y apareamientos entre individuos emparentados de la población (efecto Wahlund). Resaltando además que la cría de aves no representa la actividad pecuaria principal de las familias campesinas, desarrollándose en paralelo a otras producciones de mayor interés económico como ser la ganadería bovina, siendo mínima la presión de selección y el flujo genético en dichas poblaciones derivando en gran cantidad de individuos consanguíneos. Los valores obtenidos por la matriz de distancia genética de D_A

(Nei *et al.*, 1983) entre las poblaciones se presentan en la tabla II. En la matriz de distancia genética se incluyen la totalidad de los individuos tipificados, representando las poblaciones de RUS, WHI, SUS, AUS, ARA, BAR y HIS los grupos de referencia, de manera a determinar la magnitud de las distancias entre las mismas y las poblaciones avícolas paraguayas, GCC y GCÑ. Analizando los valores de distancia genética y considerando solamente a las dos poblaciones avícolas paraguayas, la menor distancia reportada fue de 0,091 entre GCC y GCÑ y la mayor de 0,495 y 0,488 entre la población SUS y las poblaciones paraguayas, GCC y GCÑ respectivamente. En base a los valores obtenidos se demuestra que la distancia genética es mínima entre ambas poblaciones paraguayas, indicando que las mismas se encuentran estrechamente relacionadas. Por el contrario los valores descritos entre las poblaciones paraguayas en relación a las poblaciones de referencias fueron muy superiores (tabla II). La decisión de clasificar una determinada población como recurso genético se debe extraer de su carácter distintivo dentro de una especie, particularmente expresada por la distancia genética (Wimmers *et al.*, 2000).

Tabla II. Matriz de distancia genética D_A entre las poblaciones avícolas paraguayas y las poblaciones de referencias (D_A genetic distance matrix between the paraguayian poultry populations and populations of references)

	GCC	GCÑ	RUS	WHI	SUS	AUS	ARA	BAR	HIS
GCC	-----								
GCÑ	0,091	-----							
RUS	0,379	0,431	-----						
WHI	0,292	0,353	0,584	-----					
SUS	0,495	0,488	0,754	0,725	-----				
AUS	0,413	0,421	0,592	0,647	0,758	-----			
ARA	0,443	0,432	0,897	0,742	0,960	0,518	-----		
BAR	0,392	0,377	0,624	0,671	1,011	0,769	0,699	-----	
HIS	0,401	0,467	0,602	0,716	0,677	0,809	0,871	0,863	-----

GCC: Gallinas criollas del Chaco Central; GCÑ: Gallinas criollas del Ñeembucú; RUS: Rustipollos; WHI: White Plymouth Rock; SUS: Sussex; AUS: Australorp; ARA: Araucana; BAR: Barred Plymouth Rock; HIS: Hissex Brown.

CONCLUSIONES

El panel de marcadores microsatélites utilizado demostró ser de gran utilidad en estudios de biodiversidad en las poblaciones avícolas paraguayas. Los valores del número de alelos por población, heterocigosis observada y esperada, en conjunto con la detección de alelos únicos indicaron que estos grupos genéticos constituyen

una fuente importante de variabilidad genética. Los valores de F_{IS} indican niveles significativos de endogamia en las poblaciones paraguayas, siendo necesaria la implementación de programas adecuados de manejo para evitar la depresión por endogamia. La distancia genética de Nei demuestra que las dos poblaciones avícolas paraguayas no se encuentran diferenciadas, pero sí distantes a las demás poblaciones de referencias, representando un recurso genético valioso. Este trabajo constituye el primer estudio científico que explora la diversidad genética en gallinas criollas o locales paraguayas, y la información generada en el mismo constituye una herramienta válida para conocer el nivel de diversidad genética existente en estas poblaciones aviares, como también, proporcionar bases técnicas y científicas para impulsar la implementación de estrategias de conservación de dichas poblaciones, considerando que las mismas contribuyen de manera significativa a la seguridad alimentaria de las familias paraguayas rurales, menos favorecidas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo gracias al apoyo y buena predisposición, del señor Christopher Hawskbee y de las comunidades indígenas el Estribo, Rio Verde, Sombrero Piri, Saría y Nepoxen, que colaboraron para el muestreo, y a la contribución de los miembros de la RED CONBIAND Paraguay, ITAIPÚ Binacional dentro del marco Becas Itaipú de Postgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologías (CONACYT).

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, L., Francesh, A., Eding, H. & Weigend, S. 2008. Estudio de marcadores moleculares para la trazabilidad en la IGP pollo de Prat. URL <http://www.upcommons.upc.edu/e-prints/bitstream/2117/2506/1/pollo.pdf>
- Antos, P., Andres, K. & Kapkowska, E. 2013. Preliminar studies on genetic diversity of selected Polish chicken varieties. *Journal of Central European Agriculture* 14, 11-12.
- Botstein, D., White, R.L., Skolmick, M. & Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-322.
- Chen, G., Bao, W., Shu, J., Ji C., Wang, M., Eding, H., Muchadeyi, F. & Weigend, S. 2007. Assessment of population structure and genetic diversity of 15 chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Asian-Australian Journal Animals Science* 21, 331-339.
- Clementino, C.S., Barbosa, F.J.V., Carvalho, A.M.F. & Costa-Filho R.A.R. 2010. Microsatellite DNA loci for population studies in brazilian chicken ecotypes. *International Journal of Poultry Science* 9, 1100-1106.
- FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

- FAO. 2011. Molecular genetics characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. N° 9. Rome.
- Grimal, A. & Gómez, E. 2007. Descripción y caracterización de una población de la comunidad Valenciana: La Gallina de Chulilla. *Archivos de Zootecnia* 56, 523-528.
- Hartl, D.L. 1988. A primer of population genetics. Segunda edición. Editado por Sinauer Associates Inc. Sunderland Mass.
- Hillel, J., Groenen, M., Tixier-Boichard, M., Korol, A., David, L., Kirzhner, V., Burke, T., Barre-Dirie, A., Crooijmans, R., Elo, K., Feldman, M., Freidlin, P., Maki-Tanila, A., Oortwijn, M., Thomson, P., Vignal, A., Wimmers, K. & Weigend, S. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution* 35, 533-557.
- Leotta, G., Suzuki, K., Álvarez, F.L., Núñez, L., Silva, M.G., Castro, L., Faccioli, M.L., Zárate, N., Weiler, N., Álvarez, M. & Copes, J. 2010. Prevalence of *Salmonella* spp in backyard chickens in Paraguay. *International Journal of Poultry Science* 9, 533-536.
- Martínez Martínez, A. 2001. Caracterización Genética del cerdo Ibérico mediante microsatélites. Tesis (PhD). Córdoba, ES. Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. 174 p.
- Martínez, R. 2008. Caracterización genética y morfológica del bovino criollo argentino de origen patagónico. Tesis (PhD). Valencia, ES. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. 244 p.
- Méndez, Y., Pons, A. & Francesh, A. 2011. La Gallina Ibicenca. Informe para su reconocimiento oficial como raza. URL http://www.razas-autoctonas.com/images/reconocimiento_web.pdf
- Menezes M.P.C. 2005. Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas y canárias. Tesis (PhD). Paraíba, BR. Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará. 111 p.
- Monteagudo, L.V., Avellanet, R., Tejedor, M.T. & Azón, R. 2011. Estudios genéticos en la gallina de Sobrarbe mediante marcadores microsatélites. URL http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA%202011/Monteagudo_et_al_AIDA2011_2_pdf
- Mudacheyi, F.C., Eding, H., Wollny, C.B.A., Groeneveld, E., Makuza, S.M., Shamseldin, R., Simianer, H. & Weigend, S. 2007. Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis. *Animal Genetics* 38, 332-339.
- Nei, M., Tajima, F. & Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153-170.
- Origlia, J., Suzuki, K., Castro, L., Faccioli, L., Silva, M., Caballero, J., Valiente, O. & Álvarez, F. 2009. Bayesian mapping for infectious bronchitis virus risk in backyard chickens in Paraguay. *International Journal of Poultry Science* 8, 740-745.
- Park, S. 2001. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis (PhD). Dublin, IR: Universidad de Dublin.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2001. GenAlEx V 5: Genetic Analysis in Excel. Population genetics for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia.

- Pham, M., Chang, W., Berthouly-Salazar, C., Lin, D., Yungrahang, S., Wang, C., Lee, Y., Tixier-Boichard, M. & Chen, C. 2013. Genetic characterization of Taiwan commercial Native chickens ascertained by microsatellite markers. *Journal of Poultry Science* 50, 290-299.
- Quiroz, J. 2007. Caracterización Genética de Bovinos Criollos Mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas. Tesis (PhD). Córdoba, ESP: Universidad de Córdoba. 155p.
- Romanov, M.N., Wezyk, S., Cywa-Benko, K. & Sakhatsky, N.I. 1996. Poultry genetic resources in the countries of eastern Europe-history and current state. *Poultry and Avian Biology Reviews* 7, 1-29.
- Suzuki, K., Origlia, J., Álvarez, F., Faccioli, M., Silva, M., Caballero, J., Nuñez, L. & Castro, L. 2009. Relative risk estimation for mycoplasma synoviae in backyard chickens in Paraguay. *International Journal of Poultry Science* 8, 842-847.
- Tadano, R., Nagasaka, N., Goto, N., Rikimura, K. & Tsudzuki, M. 2013. Genetic characterization and conservation priorities of chicken lines. *Poultry Science* 92, 2860-2865.
- Thawonwan, P., Meckvichai, W. & Pinyopich, P. 2009. Genetic variation of green peafowls *Pavomuticuslinnaeus*, 1766 in northern and western Thailand based on microsatellite DNA. *Journal of Wildlife in Thailand* 16, 72-82.
- Wimmers, K., Ponsuksili, S., Hardge, T., Valle-Zarate, A., Mathur, P.K. & Horst, P. (2000). Genetic distinctness of African, Asian and South America chickens. *Animal Genetics* 31, 159-165.
- Zanetti, E., De Marchi, M., Dalvit, C. & Cassandro M. 2009. Genetic characterization of local Italian breeds of chickens undergoing in situ conservation. *Poultry Science* 89, 420-427.