



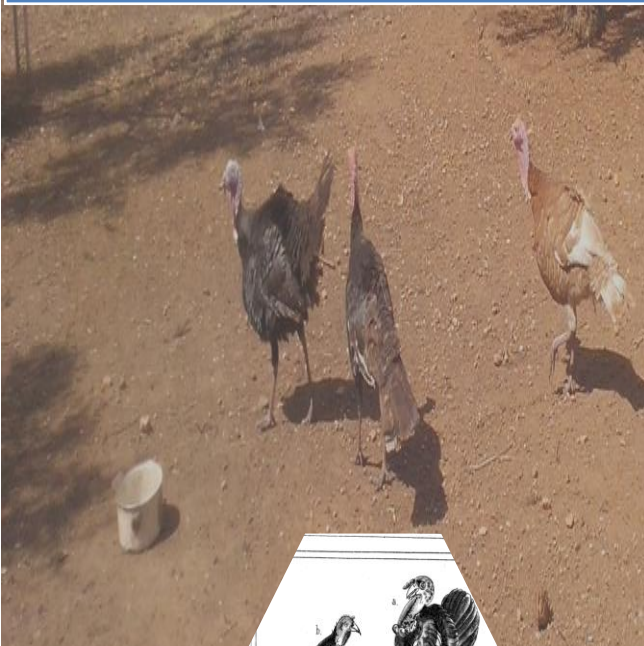
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE

TESIS DOCTORAL

Autor: Amado Manuel
Canales Vergara

CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES DE PAVO COMÚN
(CHARACTERIZATION OF DIFFERENT COMMON TURKEY POPULATIONS)

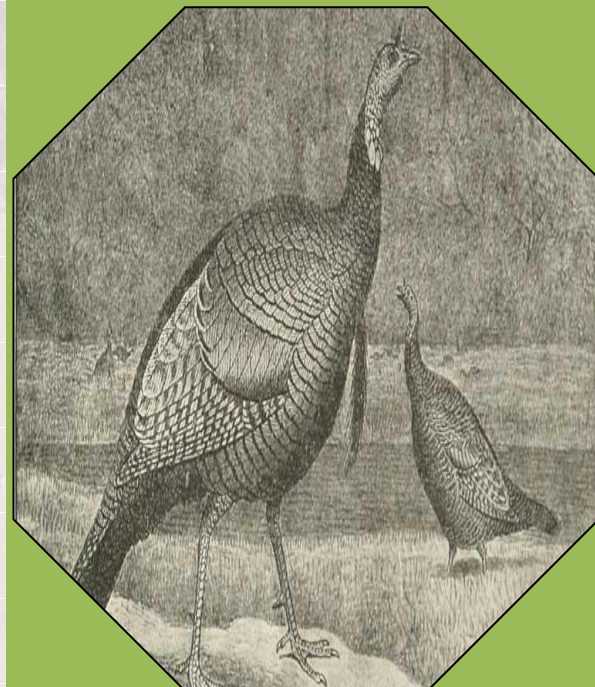


DIRECTORES:

MARIA ESPERANZA CAMACHO VALLEJO.

VINCENZO LANDI

2019



TITULO: *CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES DE PAVO
COMUN*

AUTOR: *Amado Manuel Canales Vergara*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (ESPAÑA)

PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS NATURALES Y GESTIÓN SOSTENIBLE

***CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES
DE PAVO COMÚN***

“CHARACTERIZATION OF DIFFERENT COMMON TURKEY POPULATIONS”

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por:
Amado Manuel Canales Vergara

Bajo la dirección de:

Maria Esperanza Camacho Vallejo

Vincenzo Landi

08 de noviembre de 2019



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización de distintas poblaciones de pavo común

DOCTORANDO/A: Amado Manuel Canales Vergara

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El doctorando Don Amado Manuel Canales Vergara comenzó a desarrollar su labor de investigación sobre el trabajo de tesis que presenta en el año 2014. La tesis se desarrolló dentro del Programa de Doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible de la Universidad de Córdoba. Dicha tesis se ha llevado a cabo sobre cuatro aspectos fundamentales que dieron lugar a 5 publicaciones, 3 publicados, uno en evaluación y uno en preparación; además numerosas aportaciones a congresos nacionales e internacionales en forma de comunicaciones y presentaciones orales.

En este tiempo, el doctorando ha demostrado su inquietud por la investigación lo que ha permitido difundir sus resultados, que han servido como aporte académico y científico para el desarrollo agropecuario de México y España, y de manera primordial a la Conservación de los Recursos genéticos Aviáres, el presente estudio sin duda, será el inicio para establecer núcleos genéticos y establecer programas de mejora genética, con enfoque a la seguridad, soberanía e inocuidad alimentaria.

Por ello, informamos que la tesis doctoral titulada “*CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS POBLACIONES DE PAVO COMÚN*”, de la que es autor Don AMADO MANUEL CANALES VERGARA, Médico Veterinario Zootecnista y Máster en Ciencia Animal, ha sido realizada bajo nuestra dirección y asesoramiento en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral, ante el tribunal correspondiente con el fin de obtener el Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 08 de noviembre de 2019

Firma de los directores

Fdo.: María Esperanza Camacho Vallejo.

Fdo.: Vincenzo Landi





INFORME DOCTORES INTERNACIONALES TESIS DOCTORAL

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF CÓRDOBA (SPAIN)
BY AMADO MANUEL CANALES VERGARA

TITLE OF THE THESIS: **CHARACTERIZATION OF COMMON TURKEY POPULATIONS**

REFEREE:

Prof./Dr.:	Patricia Cervantes Acosta		
Passport number:	G26709323		
Position:	PROFESOR INVESTIGADOR DE TIEMPO COMPLETO, TITULAR "C"		
Department:	FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECIA		
Institution:	UNIVERSIDAD VERACRUZANA		
Address:	AVE. MIGUEL A. DE QUEVEDO S/N, COL. UNIDAD VERACRUZANA, VERACRUZ, VER.		
Phone:	+522299344053	Fax	+522299342075
		E-mail:	pcervantes@uv.mx

for	This thesis meets the requirements	YES	NO
	presentation as an oral dissertation	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Rating	Originality	Scientific /technical merit	Planning /methodology
Outstanding	X	X	
Excellent			X
Very Good			
Good			
Sound			
Defficient			

COMMENTS (Please use additional sheets, if necessary):

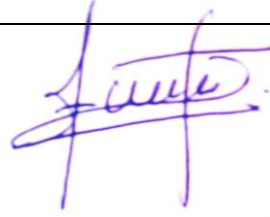
Se sabe, que desde hace casi dos mil años se inició la domesticación del pavo en las regiones de América que ahora conforman México y suroeste de los Estados Unidos, donde eran considerados como animales sagrados, aunque en algún momento, se cree que, por diversas razones como falta de proteínas en la dieta, los habitantes de Norte América inician su consumo. Su desarrollo en Europa se debió a que, durante la Conquista por los españoles, estos llevaron pavos, principalmente mexicanos a Europa, desde donde se diseminaron a otros lugares del mundo. De esta manera, en Europa se inició una selección para desarrollar aves más robustas que luego fueron de vuelta a América del Norte, donde a la fecha son consumidas principalmente en fiestas anuales o sagradas. Así que, la variedad de pavo silvestre *Meleagris Gallopavo*, la principal variedad domesticada se convirtió en un recurso genético que para su conservación como especie zoogenética local, enfrenta retos para mantenerse dentro de las especies nativas, debido a la presión causada al introducir razas mejoradas.

El pavo silvestre *Meleagris Gallopavo* es de las especies de aves locales criadas en sistemas de producción tradicional, o de avicultura familiar, tanto para la producción de carne como de huevo, es posible encontrar diferentes biotipos, aun así, es favorable fomentar su producción y reducir la introducción de razas exóticas. Debido al fomento de la conservación de los recursos genéticos locales, estos deben identificarse y cuantificarse, en los sistemas naturales

donde se mantienen, tratando de superar los problemas que implican catalogar esa biodiversidad, para con esos datos determinar el nivel de riesgo de una raza. En este estudio de diversidad genética es posible identificar poblaciones de pavos domésticos es posible suponer que hoy en día las poblaciones estudiadas presentan una independencia genética muy cercana, señalado por la distancia entre poblaciones. La información obtenida en esta investigación será útil para fines de conservación y manejo de los sistemas tradicionales de producción de pavos.

DATE: 03/11/19

SIGNATURE:

A handwritten signature in purple ink, appearing to be 'J. C. ...', written over a horizontal line.



INFORME DOCTORES INTERNACIONALES TESIS DOCTORAL

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF CORDOBA (SPAIN)
BY AMADO MANUEL CANALES VERGARA

TITLE OF THE THESIS: CHARACTERIZATION OF COMMON TURKEY POPULATIONS

REFEREE:

Prof./Dr.:	Simone Ceccobelli		
Passport number:	YA4837866		
Position:	Research assistant		
Department:	Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences		
Institution:	University of Perugia		
Address:	Borgo XX giugno, 74, Perugia – Italy		
Phone:	+39075585710 9	Fax +3907558571 22	E-mail: simone.ceccobelli84@gmail.com

	YES	NO
for This thesis meets the requirements presentation as an oral dissertation	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Rating	Originality	Scientific /technical merit	Planning /methodology
Outstanding	Outstanding	Very good	Excellent
Excellent			
Very Good			
Good			
Sound			
Defficient			

COMMENTS (Please use additional sheets, if necessary):

The research is well done and the work presented in a very logical easy to read format. The thesis directs the reader immediately into the subyet matter and the results are presented in the form of scientific papers. The experimental design is adeguate; all the lab techniques were utilized with methodological rigor. The data analysis is complete and appropriate. There are only few points to improve:

- it could be useful for the readers to insert a list of all the acronyms used;
- it is important to insert a final paragraph with a "general conclusion".

DATE: 03/11/19

SIGNATURE:

Simone Ceccobelli



TESIS DOCTORAL COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1. Artículos en revistas científicas

- **Amado Manuel Canales**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado, Amparo Martínez, Patricia Cervantes, Agueda Pons, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein, María Esperanza Camacho. Tracing worldwide turkey biodiversity using D-loop sequence mitochondrial DNA analysis. *Animals* 2019, Volume 9, Issue 11, 897.
- **Canales, A.M.**; Landi, V.; Martínez, A.M.; Macri, M.; Delgado J. V.; Cervantes, P.; Hernández, A.; Camacho, E. "Caracterización genética del pavo domestico de traspatio mexicano". *Archivos de zootecnia*, vol. 68, núm. 264, p. 487
- **Canales, A.**, Martínez, A. M., Landi, V., Cervantes, P., Delgado, J. V., & Camacho, M. E. (2016). P4042 Design of a polymorphic microsatellite set for domestic turkey () genetic characterization. *Journal of Animal Science*. 2016.94(supplement), 99-99. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/94/supplement4/97a?search-result=1>

2. Artículos científicos derivados de la tesis doctoral que están en preparación:

- **Amado Manuel Canales Vergara**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo. Multiplex microsatellite panel for the genetic characterization and diversity assessment of domestic turkey (*Meleagris gallopavo gallopavo*) *Italian Journal of Animal Science* (EN REVISIÓN).
- **Amado Manuel Canales Vergara**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo. The biodiversity and genetic structure of different populations of native turkey (EN PREPARACION).

3. Trabajos a congresos:

- Análisis preliminar de la región D-LOOP del ADN mitocondrial en razas de pavos doméstico autóctonos de diversos países. **Canales A.**, Landi V., Camacho M.E., Martínez A., Cervantes P., Sponenberg P., Durosaro S., Starcevic K., Daniele B., Delgado J. V. X Congreso Iberico sobre recursos genético animales. Castelo Branco (Portugal), 15-17 septiembre 2016.
- Diseño de un panel de marcadores microsatélites para estudios de biodiversidad en el pavo doméstico (*Meleagris gallopavo*). **Canales A.**, Landi V., Camacho M.E., Martínez A., Cervantes P., Sponenberg P., Durosaro S., Starcevic K., Daniele B., Delgado J. V. XVII Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos. Corrientes (Argentina), 9-11 noviembre 2016.
- Pavo andaluz (*Meleagris gallopavo*): Análisis del ADN mitocondrial en razas locales de pavos de Andalucía. **A.M. Canales**; V. Landi; A. Martínez; M. Gómez; D. Bigi; P. Sponenberg; J.V. Delgado; M. Helal; H. Banabazi; A. Pons; P. Cervantes; A. Hernández; E. Camacho. XI Congreso Ibérico sobre recursos genéticos animales. Murcia (España), 27-28 septiembre 2018.
- Preliminary study of the genetic diversity of four regional turkey populations. **A.M. Canales**; V. Landi; A. Martínez; P. Cervantes; A. Hernández; E. Camacho. 6th Mediterranean Poultry Summit. Torino (Italia) 18-20 junio 2018.

ÍNDICE DE CALIDAD

Trabajo 1º

Título: *Tracing worldwide turkey biodiversity using D-loop sequence mitochondrial DNA analysis.*

-Autores: **Amado Manuel Canales**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado, Amparo Martínez, Patricia Cervantes, Agueda Pons, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein, María Esperanza Camacho

-Revista (vol.,pág.,año): *Animals* 2019, 9, (11), 897.

-Base de datos internacional o nacional (caso de CC.JJ., CC.SS. Y Humanidades) en las que está indexada: JCR (2018).

-Área temática en la base de datos de referencia: AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE.

-Índice de impacto de la revista en el año de publicación del artículo: 1.832.

- Lugar que ocupa/Nº de revistas del área temática: 11/61 (Q1).

Trabajo 2º

Título: *Multiplex microsatellite panel for the genetic characterization and diversity assessment of domestic turkey (Meleagris gallopavo gallopavo).*

-Autores: **Amado Manuel Canales Vergara**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo.

-Revista (vol.,pág.,año): *Italian Journal of Animal Science* (EN REVISIÓN).

-Base de datos internacional o nacional en las que está indexada: JCR (2018).

-Área temática en la base de datos de referencia: AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE.

-Índice de impacto de la revista en el año de publicación del artículo: 1.265.

- Lugar que ocupa/Nº de revistas del área temática: 27/61 (Q2).

Trabajo 3º

- Título: "*Caracterización genética del pavo doméstico de traspatio mexicano*".
- Autores: **Canales, A.M.**; Landi, V.; Martínez, A.M.; Macri. M.; Delgado J. V.; Cervantes, P.; Hernández, A.; Pizarro, G.; Camacho, E4.
- Revista (vol.,pág.,año): Archivos de zootecnia, vol. 68, núm. 264, p. 487.
- Base de datos internacional o nacional en las que está indexada: SJR (2018).
- Área temática en la base de datos de referencia: ANIMAL SCIENCE AND ZOOLOGY.
- Índice de impacto de la revista en el año de publicación del artículo: 0.270.
- Lugar que ocupa/Nº de revistas del área temática: 276/405 (Q3).

Trabajo 4º

- Título: *The biodiversity and genetic structure of different populations of native turkey.*
- Autores: **Amado Manuel Canales Vergara**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo.
- Revista (vol.,pág.,año): Animals (EN PREPARACION).
- Base de datos internacional o nacional en las que está indexada: JCR (2018).
- Área temática en la base de datos de referencia: AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE.
- Índice de impacto de la revista en el año de publicación del artículo: 1.832.
- Lugar que ocupa/Nº de revistas del área temática: 11/61 (Q1).

Trabajo 5°

-Título: *Design of a polymorphic microsatellite set for domestic turkey genetic characterization.*

-Autores: **Amado Manuel Canales Vergara**, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo.

-Revista (vol.,pág.,año): Journal of Animal Science..94. 97-98 2016.

-Base de datos internacional o nacional en las que está indexada: JCR (2018).

-Área temática en la base de datos de referencia: AGRICULTURE, DAIRY & ANIMAL SCIENCE.

-Índice de impacto de la revista en el año de publicación del artículo: 1.863.

- Lugar que ocupa/N° de revistas del área temática: 8/58 (Q1).

AGRADECIMIENTOS

Como todo lo que inicia tiene que teminar, pues esto llevo a su fin, una etapa mas donde finalizó un escalón de formación profesional. Un doctorado para algunos es un papel y un titulo, pero para mi significo mas que eso, sacrificio, cambiar de país, costumbres, amigos, comidas y podría seguir. Quiero agradecer a personas muy importantes que me ayudaron a finalizar este reto, ojala no se me quede ninguna persona fuera y pueda mencionarlos a todos, porque de alguna manera u otra me ayudaron con un poquito.

A mi familia, empezando con mi madre, que jamas a dudado en apoyarme en todos los contextos, ya que siempre confía en que alcance y termine todos los retos, metas y proyectos que me propongo en la vida, y este no fue la excepción. Muchas gracias Viki por siempre confiar en mi y nunca dudar de tu hijo. A mi padre porque es un pilar muy importante en mi familia, desde como tratar a la gente hasta cuando hay que ser frio y mostrar carácter profesional, te agradezco de todo corazón tu apoyo, ya que había algunos días que no llegaba a fin de mes y pues había que jalar de la sabana para acompletar el mes y poder comer, gracias por no decir que no cuando te necesitaba, por darme el impulso desde la otra parte del mundo para seguir hasta donde he llegado ahora. A mi hermana, por darme esos consejos de como mandar a veces a CHTM a la gente, por siempre que iba a Mexico tratarme como lo que soy un hermano, porque después de tanto tiempo de estar fuera de Mexico contarme las cosas y dejarme entrar a su familia con mis sobrinas como si nunca me hubiera ido del país. A mis dos sobrinas, a la mayor por tratarme como un tio y cada vez que iba a Mexico darme esos enojos o risas que una niña puede provocar, y claro a la pequeña que siempre que hablo con ella abraza el teléfono.

Personas importantes se quedaron en el camino de mi Tesis, personas que no pude despedirme de ellos por estar aquí realizando y terminando este reto, a mis abuelas que no pude decir el ultimo adiós y a tios que también se fueron mientras estoy aquí.

A mis amigos de Mexico, muchas gracias por tratarme y seguir tratándome como si yo estuviera ahí con ustedes, que me sigan contando todo y jamas perder el contacto con ustedes, ya que de alguna forma u otra hacen a que no pierda mi estilo mexicano.

A la doctora Paty y al doctor Antonio, ya que con la ayuda de ellos pude obtener unos de los puntos fuertes para obtar la beca con la que realicé estos estudios. Muchas gracias por los consejos y por la formación que me dieron en la Universidad y Master, una pieza vital para poder encajar en este doctorado.

Agradecer a los amigos del departamento, Javi, Gaby, Martina, muchas gracias por los consejos que me daban cuando tenia mis inseguridades, javi que me has ayudado en todo lo que pudiste y en lo que no, es porque creo que no sabias que hacer, eres un crack. Gaby por los consejos frios que a veces necesita uno que le digan o que le hagan ver la realidad de la situación. Y Martina, gracias por las comidas, por los consejos, salidas de fiesta, cafes, platicas de risa y otras serias y sobre todo que al final del camino te sumaste a terminar este proyecto al igual que Gaby y Javi.

Al grandísimo y chiquito vasco, que te puedo agradecer a ti mi hermano, eres creo que lo mejor que me pude topar como amigo, hermano y lo que pueda existir, eres increíblemente lo mas humano y noble que pueda existir, ojalá en un futuro pueda agradecerte con mas cosas y no con palabras. Gracias por las fiestas, cenas, cine, ayudas existenciales, mudanzas, no terminaría de escribir en lo que me has ayudado, sin olvidar esta tesis. Muchas gracias mi hermano ojalá llegues lejos y te vaya muy bien en tu vida y en lo que pueda ayudar creeme que lo hare.

A mis compañeros de laboratorio, uno es mi jefe y director de tesis, al señor padre Vincenzo Landi, gracias por enseñarme todo lo que se, a veces enojado y otras veces a risas, pero lo mejor es que terminamos esta etapa del doctorado, me diste una formación excelente, estoy muy contento y espero que te toquen estudiantes como yo en un futuro para que te acuerdes de mi. A Mayra por ayudarme con mis muestras y compartir a u hermosa niña, Miguelito, gracias por ayudarme en el laboratorio cuando tenia que entregar cosas, porque cuando llegue igual al laboratorio pues aprendi algunas cosas de ti y como funcionaba esta empresa, solo que ya deja de fumar para que aguantes minimo unos 5 años mas.

Al departamento de genética, muchas gracias Amparo por esta ayuda al final del camino, por la formación que pudiste darme y que valoro mucho, por ayudarme con los análisis de los animales de este proyecto y la supervisión. Al jefe de jefes, al mismísimo Jaunvi, por darme la oportunidad de realizar el proyecto de esta tesis en el grupo de investigación, ya que fue una de las cosas con la que inicio todo, con tu SI adelante puedes venir, gracias por los jalones de orejas que a veces uno necesita y por el sentido del humor. Antonio y Sergio, gracias por la amistad que me han dado en estos años, ya que aguantarme cuesta, a si los desayunos de tostada y café. A mi directora de Tesis Esperanza, muchas gracias, de verdad porque me aconsejaste y cuando lo necesitaba siempre estuviste para aclararme las dudas y sobre todo porque me diste tu confianza para llevar esta investigación, gracias por confiar en el mexicano.

Agradecimientos

A mis amigos del crossfit, que sepan que con ese ejercicio pude sacar mucho estrés y por eso juanvi luego se enojaba que no me veía estresado, gracias coaches, geno, moyi, por los buenos ratos de entreno y consejos, porque se abrieron para recibirme como un gran amigo.

Puri, Chelo, Pepi y Cristina, me hicieron la vida alegre en esas tardes noches largas en el laboratorio, muchas gracias por su amistad, que hasta el día de hoy la sigo valorando mucho, por los cafes de las tardes y risas que me contagiaban.

Espero que no se me haya olvidado nadie, porque todos son muy importantes en esta etapa de mi vida, muchas gracias a todos y si alguien se me olvido, pues ya le doy las gracias personalmente.

ÍNDICE

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
<i>OBJETIVOS</i>	7
<i>RESULTADOS</i>	11
<i>CAPÍTULO 1</i>	65
<i>CAPÍTULO 2</i>	83
<i>CAPÍTULO 3</i>	97
<i>CAPÍTULO 4</i>	111
<i>CONCLUSIONES</i>	127
<i>CONCLUSIONS</i>	131
<i>RESUMEN</i>	135
<i>SUMMARY</i>	139
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	143

INTRODUCCIÓN

Los ancestros del pavo actual evolucionaron de un ancestro que cruzó el estrecho de Bering cuando Alaska estaba conectada con Eurasia (Steadman 1980). El fósil más antiguo de un protopavo es el designado Rhegni- normis calbates del Mioceno Temprano de Florida, el cual presentaba ciertas características de faisanes, parecidos a pavos y de pavos emergentes en el Nuevo Mundo. En el Mioceno tardío es cuando los verdaderos pavos evolucionaron (proagriocharis kimballensis y el género Meleagris). Para la edad del Pleistoceno, el género *Meleagris* estaba bien establecido y poseía al menos cuatro especies: *M. gallopavo* (pavo silvestre actual), *M. ocellata*, *M. californica* y *M. Crassipes*; estas dos últimas ya extintas.

Los principales descubrimientos fósiles de antecesores de los pavos domésticos se han hallado en el sur de los Estados Unidos y en el norte de México, correspondiendo los más antiguos a la época del Pleistoceno y al extinto pavo de California, *Meleagris californica* (Miller, 1940; Cracraft, 1968;). Dicho pavo estuvo aislado en California durante el Mioceno y posee un alto grado de similitud con *Meleagris gallopavo*, lo que sugiere que ambas especies tuvieron una presión de selección semejante. El *Meleagris californica* era de tamaño intermedio entre el pequeño melegris crassipes y *Meleagris gallopavo* (Roberson, 2001).

Se ha descrito que durante el Pleistoceno el género *Meleagris gallopavo* fue importado al suroeste de Estados Unidos desde Mesoamérica, siguiendo la misma ruta de dispersión de los cultivos, siendo posteriormente diseminado por todo México. Se ha documentado que su domesticación empezó en México entre los años 200 y 700 A.C., por culturas prehispánicas (Olmecas, Chichimecas, Totonacas, Zapotecas, Teotihuacanos, Toltecas), pero fueron los mayas los primeros en domesticar al *Meleagris gallopavo gallopavo*, la especie salvaje de México. Sin embargo, fue con la civilización Azteca cuando cobro mayor importancia la cría de esta especie y no sólo la utilizaban para sus comidas, sino que era objeto de sus celebraciones. Estos se han difundido por América Central y del Sur y subsisten como pavos domésticos "indígenas". Su plumaje es mayormente negro. De esta manera, los pavos indígenas de América latina derivan únicamente del *Meleagris gallopavo gallopavo*, en tanto que todos los otros pavos domésticos derivan de un cruzamiento entre *Meleagris gallopavo gallopavo* con *Meleagris gallopavo sylvestris* (Crawford, 1992).

El pavo ya domesticado por los Aztecas, fue llevado a Europa a principios del siglo XVI. De hecho, Bernal Díaz del Castillo, soldado de Hernán Cortés y el más conocido de los cronistas de la conquista, menciona que cuando llegaron a Tenochtitlan, el gran Moctezuma preparaba banquetes con más de trescientos platos (Llamas J. M 2005). Guisaban gallinas, gallos de papada, faisanes, perdices de la tierra, patos mansos y bravos, pero en realidad lo que vieron

ese día los españoles, eran guajolotas (pavas) y guajolotes (pavos), que para esos años ya estaban domesticados por los Aztecas en América (Sepulveda et. Al. 2016) . Hernán Cortes menciona que millares de estas aves eran criadas en los corrales de los palacios de Moctezuma, de donde posteriormnte fueron llevadas a diversas partes de América como Perú, Chile o las Antillas. Fue así como comenzó su movilización y comercio por toda Europa a partir del siglo XVI (Toulet A. 2011).

Con la movilización del comercio de los ingleses hacia América del Norte en los siglos XVIII y XIX, comienza la diseminación de la población de M.g. gallopavo. No obstante, es ahí donde se realiza el cruzamiento entre M. g. gallopavo con M. g. sylvestris (Crawford, 1992) para dar lugar al pavo bronce, precursor de todos los pavos comerciales de los países desarrollados. En países como Italia, España e Inglaterra ya conocían a esta ave, ya que diversas referencias bibliográficas mencionan que fue de Estados Unidos de donde se expandió para Europa. Sin embargo, cabe destacar que el nombre o palabra “Turkey” que le asignan los ingleses al guajolote o pavo es debido a que los pavos que se enviaban a Europa pasaban por Turquía.

En la actualidad, los pavos domésticos o de traspatio (refiriéndose a pavo de traspatio como a todo aquel que no ha sido cruzado con animales de líneas comerciales para la producción industrializada) se encuentran localizados en pueblos y zonas suburbanas; que se caracterizan por tener un bajo sistema de producción y por dietas desbalanceadas.

En diversos países, como España, México o Estados Unidos, tiene dos usos: comercial, siendo su carne consumida por su alto contenido de proteína, y el uso de traspatio, donde la gente los cría junto con gallinas, están libres y son criados para autoconsumo, utilizado principalmente para fiestas o eventos especiales que celebran como la Navidad, el año nuevo, cumpleaños o como platos típicos de cada región.

Cabe destacar la importancia de la caracterización del pavo *Meleagris gallopavo* y ciertas líneas domésticas primitivas, ya que actualmente son poco abundantes y su población y distribución han sido fuertemente reducidas. La necesidad de conservar la variabilidad genética de estas especies es imperativa y los pavos salvajes o domésticos no mejorados deberían ser estudiados antes que sea demasiado tarde.

Este trabajo nace con la intención diseñar un panel de microsatélites para el estudio de la biodiversidad del *Meleagris gallopavo* y de caracterizar genéticamente a 5 poblaciones de pavo doméstico autóctono procedentes de México, España, Italia, Egipto, Brasil y Estados Unidos. Para ello, se plantea estudiar la diversidad genética, la estructura genética, la relación existente

entre ellas y otras poblaciones de pavo doméstico mediante el uso de microsátélites y del ADN mitocondrial. La información obtenida y las conclusiones extraídas facilitarán el desarrollo de programas de conservación y proporcionarán una idea de cómo están conformadas estas poblaciones de pavos domésticos autóctonos de los países participantes.

OBJETIVOS

Este objetivo general se divide en objetivos específicos que concuerdan con los capítulos de la tesis doctoral:

Objetivo 1. Determinar un panel de microsátélites específico, para los estudios de biodiversidad de los pavos, panel que deberá cumplir los requerimientos técnicos internacionales.

Objetivo 2. Caracterizar genéticamente poblaciones de pavos autóctonos para definir las relaciones filogenéticas de las poblaciones de México, España, Brasil, Egipto, Italia y Estados Unidos.

Objetivo 3. Rastrear la biodiversidad mundial de pavos mediante el análisis de ADN mitocondrial de la secuencia D-loop.

Objetivo 4. Caracterizar genéticamente la población de pavo autóctono mexicano.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Clasificación taxonómica del *Meleagris gallopavo* y terminología.

Linneo propuso el nombre científico *Meleagris gallopavo* en 1758, el nombre del género *Meleagris* significa "gallina de Guinea", de los antiguos greco-romanos, y la especie nombra gallopavos en latín para "pavo real", gallus para "gallina" y pavo como "pollo" (Figura 1).

Reino: *Animalia*

Filo: *Chordata*

Clase: *Aves*

Orden: *Galliformes*

Familia: *Phasianidae*

Género: *Meleagris*

Especie: *Meleagris gallopavo*



Figura 1.- Macho de pavo de doméstico en estado de cortejo.

2. Especies.

2.1 Pavo ocelado (*Meleagris ocellata*).

Es una especie diferente, que se encuentra en la península de Yucatán, en el sureste de México y posiblemente en países adyacentes. En color, está mucho más cerca del pavo real que de sus 5 primos del norte (Figura 2). Los machos tienen una iridiscencia verde abreviada, espuelas largas, pero sin barba. Las plumas de las alas primarias están ribeteadas en blanco. Las plumas de la cola gris tienen una punta de color azul-bronce, y hay manchas parecidas a un gallo en los coberteros de la cola que su nombre implica. Esta ave tiene la cabeza de color azul y con crecimientos distintos, aleatorios, redondos y rosados. En lugar de emitir los sonidos familiares de engullir y rechinar de las otras subespecies, el pavo ocelado emite un ruido espeluznante.



Figura 2.- Pavo ocelado en su hábitat natural.

2.2 *Meleagris gallopavo salvaje*.

El pavo salvaje, originario del continente de América del Norte, fue el ave de anidación terrestre más grande descrito por los primeros inmigrantes europeos. Sin embargo, el abundante número de pavos salvajes que se menciona en los primeros relatos históricos disminuyó con la colonización, hasta que su existencia continua era cuestionable. Las poblaciones de pavos salvajes se redujeron drásticamente a sus números más bajos entre fines del siglo XIX y la década de 1930, sobreviviendo solo en los hábitats más inaccesibles.

Tras la Segunda Guerra Mundial, los programas de restauración activa y los esfuerzos de investigaciones de las agencias estatales, eventualmente fueron repoblando a los hábitats de pavos salvajes, logrando recuperar su población.

Los europeos estaban familiarizados con las gallinas de Guinea y los pavos reales, pero los exploradores españoles encontraron un pájaro del Nuevo Mundo similar, pero no exactamente, a lo que estaban acostumbrados a ver. Esos primeros exploradores a menudo describían aves de tipo guinea y pavo real. Sin embargo, posteriormente se determinó que sus descripciones eran de un pájaro recientemente conocido como el pavo salvaje. Linneo en sus descripciones, parece basarse principalmente en el pavo doméstico importado a los Estados Unidos. Por los europeos también se describió una subespecie mexicana de un ejemplar capturado en Mirador, Veracruz, pero que probablemente hoy día está extinto.

2.3. Subespecies de pavo salvaje (*Meleagris gallopavo*).

Se han descrito seis subespecies en América, *M. g. gallopavo*, *M. g. mexicana*, *M. g. merriani*, *M. g. intermedia*, *M. g. silvestris* y *M. g. osceola* (Howard & Moore, 1984). Las seis subespecies han sido caracterizadas genéticamente y se han reconocido como poblaciones independientes, excepto *M. g. silvestris* y *M. g. osceola*, quienes al parecer pertenecen a la misma unidad poblacional (Mock et al., 2002).

2.3.1 Pavo salvaje oriental (*Meleagris gallopavo silvestris*).

Fue nombrado por L.J.P. Vieillot en 1817 usando la palabra *silvestris*, que significa pavo del “bosque”. En 1940 el pavo salvaje fue eliminado del 81% de su área natural debido a la caza excesiva, las enfermedades introducidas por las poblaciones domésticas y la destrucción de su hábitat (Bent, 1963; Davidson & Wenbt-Worth, 1992).

La cabeza no presenta plumaje y es desnuda, está cubierta por una tonalidad de piel azul o púrpura (Figura 3). El macho y la hembra tienen grandes zarcos de color rojo, en el macho los zarcos cuelgan debajo de la garganta y otra cae en el pico. El plumaje es en gran parte de color verdoso bronceado con reflejos de oro y cobre, las plumas tienen puntas negras en el cuello, el pecho y la espalda.



Figura 3.- *Meleagris gallopavo silvestris* o pavo salvaje oriental.

El macho tiene un penacho de plumas en el pecho llamado barba, que puede llegar al suelo en aves mayores. Las patas son de color rosa malva, con orejas cortas y potentes, Habita aproximadamente en la mitad oriental de los Estados Unidos hasta el sur de México, al oeste, está presente desde el estado de Washington a Nuevo México y Texas., y se le puede encontrar en los árboles de los bosques de las montañas y pantanos.

2.3.2 Pavo salvaje de Florida (*Meleagris gallopavo osceola*).

Fue descrito en 1890 por W.E.D. Scott y su nombre proviene del famoso jefe de los Seminole, Osceola, quien forzó a su tribu a luchar contra el hombre blanco en 1835. Esta ave habita en la mitad sur de Florida, siendo muy similar a *Meleagris gallopavo* pero perceptiblemente más oscuro en tono general. Las principales y notables características representativas del ave salvaje del este es que tiene un anillo en la barra de las plumas y en las alas secundarias internas tiene el color más oscuro, parduzco con irisaciones verdosas, predominando el color de la cola, las plumas y las coberteras superiores de la cola son similares en esta forma (Figura 4).



Figura 4.- *Meleagris gallopavo osceola*.

2.3.3 Pavo salvaje de Merriam (*Meleagris gallopavo merriami*).

De las regiones montañosas del oeste de los Estados Unidos fue nombrado por el Dr. E.W. Nelson en 1900 en honor a C. Hart Merriam, primer jefe del Servicio Biológico de los Estados Unidos.

Todas las plumas muestran una barra gris plateada subapical de aproximadamente media pulgada de ancho, con ligeros reflejos rosados y una línea estrecha del mismo tono en la punta extrema. Las plumas de la parte inferior de la espalda se extienden sobre la cola, siendo también negras con una barra subapical de bronce cobrizo metálico, y con la punta ancha con pulido ocráceo oscuro. El macho joven se asemeja al adulto, y la hembra adulta es negra con los tonos iridiscentes que se ven en el macho en la espalda, las alas y debajo de la superficie. Todas las plumas de la superficie superior tienen barras subapicales negras, y las puntas son grisáceas, volviéndose más anchas en la parte inferior de la espalda y la grupa, mientras que las plumas de la superficie inferior tienen puntas pálidas. Las puntas de las coberteras superiores de la cola son ocráceas, pero más pálidas que en el macho, mientras que las coberteras debajo de la cola se parecen mucho a las del macho (Figura 5).



Figura 5.- Macho *Meleagris gallopavo merriami* en estado de cortejo.

El hábitat de esta subespecie hasta ahora conocido en la actualidad, está restringido a las tierras bajas del este de México y el sur de Texas, no podríamos esperar encontrarla a una altitud superior a 2000 pies sobre el nivel del mar; mientras que la variedad mexicana se encuentra solo en las altitudes más altas de 3000 a 5000 pies sobre el nivel del mar.

2.3.4 Pavo salvaje del Río Grande (*Meleagris gallopavo intermedia*).

Esta subespecie fue descrita por primera vez por George B. Sennett en 1879. Su calificativo “intermedia”, significa que esta subespecie es intermedia entre especies y subespecies orientales, ya que es una especie occidental. Se menciona que el pavo Rio Grande difería de las otras razas (del este y de Merriamis específicamente) por ser intermedio; de ahí su nombre. El macho adulto es robusto, y su peso varía generalmente entre 7,7 y 9,5 kilogramos, mientras que la hembra adulta es mucho más pequeña, pesando de 3,6 a 5 kilogramos y midiendo aproximadamente 75 centímetros de altura. Sin embargo, algunos individuos pueden exceder este peso. Hasta la fecha, el pavo salvaje más pesado se registró en 2001 en New Market, en Iowa, y pesaba 16,2 kg.

En posición de alerta, puede alcanzar hasta un metro de altura. Su plumaje es negro en apariencia y varias de sus plumas muestran un brillo metálico llamado iridiscencia, compuesto de varios tonos de rojo, verde, cobre, bronce y oro.



Figura 6.- Macho *Meleagris gallopavo intermedia* en estado de alerta.

La coloración de su la cabeza es azul y roja y tiene una corona blanca. Durante la época de cría, el color rojo se vuelve más brillante debido al aumento del flujo sanguíneo en las carúnculas. A diferencia de los machos, las hembras, tienen la cabeza y el cuello de color azul-gris, y están parcialmente cubiertas con pequeñas plumas oscuras. Las hembras pueden tener carúnculas, pero son mucho más pequeñas que las del macho. Algunas hembras también pueden tener barba y/o espolones, pero este fenómeno es poco frecuente (menos del 10% de las hembras). El pavo de Río Grande vive en zonas semiáridas en grandes llanuras, pudiendo ser encontrada en pequeñas regiones boscosas de los estados de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas; además de Kansas del Sur hasta el norte de México. Reintroducido en el oeste donde estaba presente anteriormente en California, Oregón y Washington, esta subespecie aún es abundante en los Estados Unidos de América (NWTF, 2007).

2.3.5 Gould (*Meleagris gallopavo mexicana*).

Fue descrita por primera vez por J. Gould en 1856 durante sus viajes a México. Se encuentra en el noroeste de México, en partes del sur de Arizona y Nuevo México. Se puede distinguir de las otras subespecies por sus bordes oscuros en la cola y la cobertura de la cola superior e inferior (Figura 7).

La parte baja de la espalda es de un negro azul profundo y es deficiente en esos brillantes matices metálicos. Las plumas primarias del ala son negras con barras blancas. La hembra adulta es más oscura que la de las otras subespecies y los bordes de color amarillo oscuro la separan del blanco de mexicana y del castaño rojizo oscuro de *Meleagris gallopavo*. En los jóvenes de ambos sexos, los bordes de todas las plumas son más pálidos o más claros que los de los adultos.

El pavo norteño o pavo de Gould (*Meleagris gallopavo mexicana*) es la subespecie silvestre que actualmente está mayormente distribuida en México, principalmente en la porción noreste dentro de la Sierra Madre Occidental; se le puede encontrar en Chihuahua, Sonora, Durango, Zacatecas, Nayarit y Jalisco (NWTF, 2007). Esta subespecie fue reintroducida en Aguascalientes desde el año 1992 (Márquez et al., 2005). Sin embargo, su distribución histórica comprendía la costa del Pacífico hasta Colima (Nelson, 1900) e incluso en algunos de los estados del centro del país (Osgood, 1921).



Figura 7.- A la izquierda, macho joven de *Meleagris gallopavo mexicana* y a la derecha dos machos adultos.

2.3.6 *Meleagris gallopavo gallopavo*.

Habitaba originalmente en el sur de México, aunque en la actualidad está probablemente extinta. Es el precursor aceptado del pavo doméstico que los conquistadores españoles llevaron de México en 1500. Los restos más antiguos de *Meleagris gallopavo gallopavo* que se han encontrado dentro de un contexto urbano y fuera de su rango de distribución geográfica "natural", es en el Valle de Tehuacán, actual estado de Puebla, México. Es en el Valle de

Tehuacán, donde difícilmente el guajolote silvestre se distribuía de manera natural, sugiriendo que fue aquí donde se domesticó la especie (Schorger, 1966).

Diversos autores sitúan la domesticación de la especie en diferentes lugares. En el actual estado de Michoacán, la cultura purépecha posiblemente fue la responsable de la domesticación, ya que existen crónicas de la conquista que sitúan al pueblo purépecha como el domesticador del guajolote (Lozada, 1976). Dicha hipótesis se basa en el extenso uso de la especie para el aprovechamiento de sus huesos y plumas en la elaboración de adornos (Leopold, 1959). Se ha señalado también que para dicha cultura no tuvo importancia su uso como alimento (Crawford, 1990),

Considerando la distribución histórica, geográfica y actual del pavo doméstico mexicano y la descripción del tipo de vegetación y clima en el que se distribuía *Meleagris gallopavo gallopavo* de manera silvestre, es posible que se haya localizado en diferentes países del mundo, debido a que esta ave tiene una gran habilidad de adaptación, desde climas áridos hasta climas fríos. Durante la primera mitad del siglo XX en México, se consideraba su distribución en las zonas boscosas en ambos lados de la Sierra Madre, desde el norte de Chihuahua y Sonora, hasta Oaxaca y Veracruz (Leopold, 1944). Sin embargo, *Meleagris gallopavo gallopavo* pudo distribuirse naturalmente en zonas tropicales y subtropicales, (Nelson, 1900).

A pesar de los indicios de diferentes lugares de domesticación de otras subespecies, únicamente permaneció como doméstica la subespecie de *Meleagris gallopavo gallopavo* domesticada en México y es la que ha perdurado hasta la fecha.



Figura 8.- *Meleagris gallopavo* doméstico actual, a la izquierda un macho en estado relajado y a la derecha una hembra.

3. Subespecies modernas de *Meleagris gallopavo* en el mundo.

Históricamente existieron diferentes especies del género *Meleagris*, pero en la actualidad únicamente se conserva en estado silvestre y doméstico (*Meleagris gallopavo*). A pesar de que diferentes subespecies fueron domesticadas por distintas culturas norteamericanas y mexicanas, se reconoce que esta subespecie fue domesticada originalmente en México y que a partir de ella provienen todas las variedades domésticas del mundo (Leopold, 1944). En la actualidad solo prevalecen los descendientes de la subespecie domesticada en el Altiplano mexicano (*Meleagris gallopavo gallopavo*). La distribución actual de los pavos silvestres es diferente a la que originalmente tuvo, desapareciendo de lugares donde probablemente se distribuyó en la antigüedad. Al pavo doméstico actualmente se le cría en los estados donde posiblemente se encontró de manera natural el pavo silvestre.

Existen dos géneros, el pavo común o "*Meleagris gallopavo*", del cual derivaron todas las variedades de pavo doméstico que conocemos, como: Bronceado americano, Blanco Holandés, Raza Negra o Spanish Black, Rojo Bourbon, Blanco Betsville, Bronceado Gigante. El segundo género es el pavo ocelado "*agriocharis ocellata*", con plumaje verde azulado, el cual únicamente se ha encontrado en el sureste de México, principalmente en Yucatán.



Figura 9.- (1) Bronceado americano, (2) Blanco Holandés, (3) Raza Negra o Spanish black, (4) Rojo Bourbon, (5) Blanco Betsville y (6) Bronceado Gigante

4. Diferencia entre el pavo doméstico y el pavo de líneas comerciales o híbrido.

El pavo doméstico de traspatio es una de las aves de mayor tamaño, alcanzando los machos un peso entre 6 y 10 kg a la edad adulta y de 4 a 9 kg en las hembras, un largo de 85,7 cm a 96 cm en machos y 71,67 a 82,78 en hembras, una envergadura de 93,1 cm a 113,8 cm en machos y 86,50 cm a 103,90 cm en hembras (Hernández et al., 2005; López-Zavala et al., 2008; Camacho-Escobar et al., 2008). Los pavos tienen en la cabeza un apéndice carnoso llamado comúnmente "moco", de mayor tamaño en el macho. La cabeza y el cuello son de color blanco azulado cubiertos de pliegues y verrugas de color rojo llamados corales o carúnculas. En el pecho, los machos tienen un mechón de cerdas de color negro llamado escobeta. El color de la pluma del pavo depende de la raza, por lo que pueden ser de color blanco, bronceado, negro o canela y el pavo doméstico de Estados Unidos tiene como base genética al pavo bronceado (Klasing, 2005; Sponenberg et al., 2000; 2005) (Figura 10).

El origen del pavo híbrido se da como solución a las demandas de granjeros que pedían una especie de mayor peso y tamaño para la producción de carne.

La cruce se originó de diversas variedades y se obtuvieron las líneas modernas genéticas adaptadas al ambiente controlado de las explotaciones industriales, también es conocido como pavo híbrido, pavo industrial, de pechuga ancha o de doble pechuga, con rápido crecimiento y elevado peso corporal.

Estos pavos provienen de dos líneas:

- La primera, denominada "S", se caracteriza por ser de gran tamaño, pudiendo pesar hasta 20 kilos, teniendo un buen desarrollo de la pechuga. De esta línea provienen los machos utilizados para desarrollar a los pavos híbridos.
- La segunda, llamada "H", destaca por ser aves livianas, de hasta 7 kilos de peso, pero muy buenas ponedoras.



Figura 10.- A la izquierda, pavo autóctono doméstico de México y a la derecha, pavo comercial (Pavo buta o híbrido).

Por la marcada diferencia en tamaño y peso entre sexos (macho de 20 kilos y hembra de 7 kilos), que se traduce en un problema para el apareamiento natural, en la industria de los pavos se requiere de inseminación artificial. (que no es sinónimo de esterilidad, si no de eficacia híbrida) (Sponenberg et al., 2000; 2005). Además, presentan frecuentes problemas de patas o articulaciones debido al peso excesivo que tienen que soportar por su extraordinario desarrollo muscular.

4.1. Diferencias entre el pavo doméstico mexicano de traspatio o criollo y doméstico americano.

Una primera diferencia entre el pavo doméstico mexicano y el pavo doméstico de Norteamérica, es que el primero proviene directamente del guajolote mexicano sureño domesticado originalmente en Mesoamérica (*Meleagris gallopavo gallopavo*), mientras que el pavo norteamericano es descendiente de la cruce entre el pavo mexicano llevado a Europa por los conquistadores españoles y el pavo silvestre del Este (*Meleagris gallopavo silvestris*), del cual se originan las líneas modernas. A pesar de la controversia sobre si *Meleagris gallopavo gallopavo* está extinto o no en vida silvestre, su genética aún permanece en los pavos domésticos en México (Leopold, 1944; Crawford, 1992;) y es también reconocido como antecesor del pavo doméstico norteamericano, el cual proviene de la cruce de *Meleagris gallopavo gallopavo*, con la subespecie nativa del Este Norteamericano *Meleagris gallopavo silvestris* (Hale et al., 1969; Crawford, 1990; 1992;).

En cuanto a los recursos genéticos actualmente disponibles de *Meleagris gallopavo* a nivel mundial, es posible encontrar aves nativas en estado silvestre, nativas domesticadas y domésticas especializadas en producción intensiva originarios de Estados Unidos y Canadá

principalmente. Cada una de ellas son genéticamente diferentes, pero con rasgos en común (Sponenberg et al., 2000; 2005). En México, solo un par de estudios genéticos se han llevado a cabo; bajo una visión biológica y sin información genética o sobre el valor en términos de la ventaja o desventaja reproductiva y/o productiva que pudiera significar tener un animal de un color y no de otro, o presentar cierto patrón de plumaje, ya que estos caracteres no pueden ser considerados indicativos de divergencia genética. Sin embargo, de acuerdo con el criterio de caracterización de las razas tradicionales estadounidenses, aquellos colores y patrones de plumaje endémico de México presentarían un valor ornamental, sobre todo para los criadores interesados en la adquisición de pie de cría.



Figura 11.- Pavo autóctono de traspatio mexicano y pavo domestico de Estados Unidos (Bronceado americano).

No existe un censo nacional sobre las poblaciones del guajolote mexicano, sus ecotipos, razas o variedades, como tampoco lo hay sobre las relaciones genéticas que existen entre poblaciones a diferentes niveles: local, regional o nacional. Sin estos datos, la toma de decisiones para la conservación de este recurso biocultural se hace complicada. Basta echar un vistazo a las cifras mundiales para reconocer que México está muy atrasado en el estudio del pavo o guajolote mexicano, más aún si consideramos que las culturas mesoamericanas y sus descendientes son responsables de su origen y conservación.

5. Conservación de los recursos genéticos avícolas.

La conservación de los recursos genéticos avícolas locales, en los países en vías de desarrollo, debería de ser una prioridad, debido a que algunas subespecies o variedades han sufrido un fuerte deterioro e incluso han estado a punto de desaparecer en las últimas décadas, debido a la expansión de la avicultura industrial, que propicia la sustitución indiscriminada de genotipos

autóctonos por genotipos mejorados y la prevalencia de un reducido número de razas altamente productivas, que ofrecen al mercado una mayor cantidad de carne y huevo, a un menor precio y cuya presentación en tamaño, color y forma es uniforme o estándar.

Organizaciones como la FAO (1996) informan y tratan de concienciar a los organismos gubernamentales sobre la amenaza que supone la pérdida de recursos genéticos. Esta pérdida de diversidad se asocia también con el abandono del campo, los cruzamientos de absorción de genotipos criollos por razas mejoradas, el desconocimiento del entorno social, cultural y económico de estos sistemas de producción en pequeña escala que no propician su fomento, la carencia de estudios económicos y la falta de identificación de características únicas que los justifiquen, dentro de los sistemas de producción actuales.

La crianza del pavo doméstico se asocia a la explotación agrícola rural, con métodos tradicionales, en instalaciones rústicas que aprovechan el propio entorno de la vivienda y la participación de la familia (Díaz, 1975; Jerez et al., 1994). En estas comunidades campesinas, es común observar el desarrollo de un sistema de producción de pavo en pequeña escala, de bajos insumos, pero sostenible y en condiciones de bienestar, que genera alimentos inocuos de buena calidad, pero con baja productividad, cuyos excedentes son enviados a los mercados locales (INEGI, 1998).

En algunos países como México, España, Brasil, la crianza del pavo la realizan productores rurales y grupos indígenas, los cuales han preservado el sistema tradicional de crianza del pavo autóctono, cuya calidad de carne y preferencia en la cocina forman parte del patrimonio cultural de la población rural de los países.

En la actualidad, se han realizados pocos estudios relacionados con la conservación de especies avícolas, y estos generalmente describen a los diferentes tipos de animales de forma muy general, debido a que no realizan mediciones directas del animal, basándose únicamente en preguntas y respuestas tipo encuesta directa con el productor (Trigueros et al., 2003). Aun cuando es una especie económicamente importante, se desconocen muchos aspectos de su explotación, rentabilidad, características únicas y posible proyección a futuro (Rodríguez et al., 1996; López et al., 2008).

De acuerdo con el DAD-IS, en Europa se encuentra el 47 % de la diversidad racial del guajolote o pavo doméstico (16 razas) y 50 % de su población (aproximadamente 26 millones de animales). En América Latina existen 12 % (4 razas) y 6 % de la diversidad racial y población mundial (16 millones de animales), respectivamente. Aquellos países donde los guajolotes

fueron domesticados, paradójicamente, solo reportan una o dos razas. México no presenta ni cifras de producción ni la existencia de raza alguna (FAO, 2000; DAD-IS, 2019).

5.1 Biodiversidad.

Según el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB): “La variedad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas” (ONU/CDB, 1992).

La conservación de la biodiversidad es un tema que lleva tiempo preocupando a la sociedad. El incremento de la pérdida de recursos y la amenaza del medio ambiente por el desequilibrio de los ecosistemas debido principalmente a un uso inadecuado de los mismos, genera una preocupación a nivel mundial para garantizar la seguridad alimentaria y el disfrute de todos los recursos que en la actualidad existen. La principal razón para la conservación es que sin una intervención apropiada, especies enteras podrían perder la flexibilidad para adaptarse a circunstancias cambiantes (enfermedades, cambio climático, demandas del mercado, etc.) e incluso resentirse sus niveles de producción y en consecuencia su capacidad de cubrir las necesidades alimentarias requeridas por una población humana en crecimiento constante (Hoffmann, 2010; Boeetcher et al., 2015; Kantanen et al., 2015).

En el siglo XX se marca un punto de inflexión en la conservación del medio ambiente con la celebración de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano en 1972 en Estocolmo, conocida como la primera Cumbre de la Tierra. En esta cumbre surgen las primeras declaraciones sobre la necesidad de la conservación del medio ambiente humano, natural y artificial y se establecen unos principios básicos que facilitarán la conservación de la diversidad (ONU, 1972).

Sin embargo, es 20 años después en la Segunda Cumbre de la Tierra de Rio de Janeiro celebrada en 1992 donde se establece un Convenio sobre la Diversidad Biológica (ONU/CDB 1992), reflejándose el compromiso de los diferentes países para la conservación de la biodiversidad. Se definieron tres objetivos básicos: la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y el reparto justo y equitativo de los beneficios que se deriven de su utilización. El convenio entra en vigor el 29 de diciembre de 1993, supone un tratado internacional que en la actualidad cuenta con unos 193 países integrantes y promueve la cooperación entre los países miembros y la participación de organizaciones intergubernamentales. España firma el convenio en 1992 y lo ratifica en 1993.

Principales motivos para la conservación de los recursos genéticos animales (RGA) según la FAO (FAO, 1999):

- Forman parte de nuestro patrimonio y riqueza genética.
- Están ligados a nuestro patrimonio cultural.
- Permiten sistemas de explotación sostenibles y producciones extensivas y/o ecológicas, facilitando el mantenimiento de los ecosistemas y de la población rural.
- Mantienen la variabilidad, asegurando la capacidad de adaptación al medio y a condiciones ambientales y climáticas cambiantes.
- Garantizan la soberanía alimentaria, ante una economía globalizada, que con pocas especies obtiene la mayor parte de los alimentos.

Desde el inicio de la domesticación, el desplazamiento de los diferentes pobladores o colonizadores y la migración de los individuos de las diferentes especies o su desplazamiento junto a los humanos ha hecho que las adaptaciones de los animales a las nuevas condiciones den lugar a la formación de nuevas poblaciones diversas genéticamente. En la formación de las diferentes razas también se ha de tener en cuenta la posible existencia de mutaciones, deriva genética, cría selectiva y los procesos endogámicos y de cruzamiento, cambios que se han ido produciendo tanto de una forma natural, como por la intervención del hombre. Sin embargo, en la actualidad unas pocas razas cubren un gran porcentaje de la producción, el uso de sistemas de producción intensivos y el comercio globalizado conducen a la disminución de la variabilidad dentro de las razas, a la sustitución de las razas locales por razas mejoradas y a la pérdida de capacidad de las razas de reaccionar ante situaciones cambiantes. Todo esto sigue siendo estudiado conjuntamente por historiadores, arqueólogos y científicos (Gómez, 2005).

La FAO define la biodiversidad como la variabilidad genética de los diferentes tipos de recursos genéticos animales a nivel de especies, razas y genes, de los que se deben de conservar tantos alelos o variantes como sea posible (Cossa et al., 1993). Además, expone que: “la biodiversidad es esencial para la seguridad alimentaria y la nutrición. Miles de especies interconectadas constituyen una red vital de biodiversidad en los ecosistemas de los que depende la producción mundial de alimento. Con la erosión de la biodiversidad, la humanidad pierde el potencial para adaptar los ecosistemas a nuevos desafíos, como el crecimiento demográfico y el cambio climático. Alcanzar la seguridad para todos está intrínsecamente vinculado al mantenimiento de la biodiversidad.” (FAO, 1999; Blasco, 2008; Yang, 2013; Best et al., 2015).

Para poder actuar sobre la conservación de los Recursos Genéticos de los Animales (RGA) es necesario conocer su situación y la FAO propone un programa global para analizar y ordenar los RGA a nivel mundial, para establecer una estrategia de conservación y recuperación en base a la información recopilada. Se establece un sistema mundial de recogida de información estratificado denominado Domestic Animal Diversity Information System (FAO/DAD-IS) que permite registrar cualquier recurso, sea cual sea su estado y ubicación. Este sistema es una herramienta de comunicación e información, que permite contactar y obtener información a nivel mundial, nacional y regional, siendo un lugar seguro para depositar y acceder a datos, documentos e información relacionada con los RGA. A medida que se avanza en la localización e inventario de los RGA, se tiene información más exacta de la evolución de los mismos. Según este sistema, en 1999 el hombre utilizaba unas 40 especies animales (ganaderas) para alimentarse, de estas especies en ese momento se conocían 4.500 razas y se consideraba que más del 30% de estas razas se encontraban en peligro de extinción y de un 23% ni siquiera se tenía información (Barker, 1999; FAO, 1999).

Continuando con los acuerdos internacionales en el desarrollo del Plan Global de los RGA, en 2007 en Interlaken, se celebra la Primera Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Zoogenéticos. En ella se presenta la primera evaluación detallada de la “La situación de los recursos zoogenéticos mundiales”, como base para la presentación del “Plan de Acción Mundial sobre los Recursos Zoogenéticos”, firmado por 109 países (FAO, 2007b; Hoffmann et al., 2008).

Las prioridades estratégicas del Plan de Acción de Interlaken son:

- Caracterización, inventario y seguimiento de los riesgos asociados y las tendencias: realizar o completar los inventarios (DAD-IS) (FAO,1996), establecer normas técnicas y protocolos internacionales para la caracterización fenotípica y molecular, inventario y seguimiento de tendencia, que facilite la comparación de la información.
- Utilización sostenible y desarrollo: establecer políticas de utilización sostenible de los recursos, establecer estrategias y programas de mejora, mantener la variabilidad genética y promover agro-ecosistemas y producciones locales.
- Conservación: promover políticas nacionales de conservación, crear o potenciar programas de conservación in situ y ex situ, estrategias de conservación regional y mundial, establecer métodos y tecnologías normalizadas.

Políticas, instituciones y creación de capacidad.

En la conferencia celebrada en 2010, se hizo recuento de las pérdidas (erosión genética) y se informó que, de las 7.600 razas notificadas a la FAO por los estados miembros, 1.500 se encontraban en peligro de extinción o ya estaban extintas y de que durante los 6 primeros años de este siglo han desaparecido más de 60 razas, aunque en los últimos años se modifica el sistema para el cálculo del estado de peligro de una población (FAO, 2012).

A pesar del esfuerzo que se realiza, los resultados de los programas no acababan de ser lo suficientemente satisfactorios y se adopta por las partes el “Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020”, que consiste en una alianza con el objetivo de llegar a “Zero Extinción” (UNEP, 2010).

Aun así, existe una gran presión dentro de una economía de mercado globalizada que favorece el uso de unas pocas especies y razas foráneas de alta producción para la obtención de los alimentos mundiales, en contraposición con el uso de razas locales de producciones más reducidas con sistemas de producción más sostenibles, resultando difícil la implantación de políticas que favorezcan la conservación de las razas (Hoffmann, 2010; Conde et al., 2015).

La Política Agraria Común de la Unión Europea desarrolla un programa de apoyo a los Recursos Genéticos de Animales Domésticos (RGAD) (Reglamento 870/2004 del consejo de 24 de abril de 2004) por el que se establece un programa comunitario para la conservación, caracterización y utilización de los recursos genéticos incluyendo los vegetales, los microbianos y los animales domésticos. Posteriormente se publican ayudas en los programas de desarrollo rural dirigidas al fomento de las razas en peligro de extinción (REGLAMENTO (CE) N° 870/2004).

En España se establecen normas dirigidas a la conservación de la diversidad genética, se promueve el inventariado de los recursos genéticos y se catalogan oficialmente las distintas razas ganaderas. También se proponen herramientas para continuar y mejorar la información de dichos registros y se promueve la caracterización de los recursos genéticos autóctonos. En 2019 se publica el Programa Nacional de Conservación, Mejora y Fomento de las Razas Ganaderas, el cual establece las normas básicas y de coordinación para su desarrollo y regula la normativa zootécnica (RD 45/2019). Las prioridades que rigen dicho programa son:

- Inventariado, caracterización y clasificación de las razas.
- Fomento de la cría en pureza de la raza y mejora ganadera.
- Reproducción animal y genética (apoyo a los centros especializados).

- Programas de desarrollo institucional, coordinación y creación de capacidad.
- Gestión y difusión de la información (MAGRAMA/ARCA).
- Adecuación de las normativas y creación de líneas de ayudas (financiación).

Organismos no gubernamentales internacionales (FAO; REDCYTED) y nacionales en España (SERGA: Sociedad Española de Recursos Genéticos Animales) y en Portugal (SPREGA) apoyan la conservación de los recursos genéticos animales y fomentan la difusión de todos los temas que hacen referencia a la conservación de los recursos (Carolino y Castro, 2009; Ajmonen-Marsan y The GLOBALDIV Consortium, 2010).

5.1.1 Recursos genéticos animales (RGA).

La zootecnia es la ciencia que se encarga de los Recursos Genéticos Animales y su producción, para ello agrupa a las poblaciones en especies, razas, estirpes o líneas, según su grado de diferenciación.

El concepto raza ha ido cambiando y su definición es objeto de debates y controversias, llegando a obtenerse múltiples definiciones según las características consideradas: culturales, sociológicas, folclóricas, evolutivas, técnicas, científicas, morfológicas, genéticas, etc. Algunas de las definiciones más conocidas son:

“Colectividad de individuos, que poseen un conjunto de caracteres distintivos y trasmisibles por generación” (Gonzales, 1903).

“Conjunto de individuos con caracteres morfológicos, fisiológicos y psicológicos propios, por los que se les distingue de otros de su misma especie y que son trasmisibles por herencia dentro de un margen de fluctuación conocido” (Aparicio, 1956).

“Concepto técnico-científico, identificado y diferenciado de un grupo de animales, a través de una serie de características (morfológicas, productivas, psicológicas, de adaptación, etc.) que son trasmisibles a la descendencia, manteniendo por otra parte una cierta variabilidad y dinámica evolutiva” (Sierra, 2001).

5.1.2 Catalogación y clasificación de los recursos genéticos.

Para tener conocimiento de la situación de los diferentes recursos, se establecen sistemas denominados catálogos o inventarios donde se pueden registrar las razas y el estado en que se encuentran, pudiendo estos ser de ámbito local o internacional. En dichos registros se establecen categorías, en base a su estado de riesgo o amenaza. Sin embargo, la situación de riesgo de una

población es algo cambiante dado el carácter evolutivo de las razas y depende de muchos factores y circunstancias. Una población que en este momento puede considerarse poco útil y consecuentemente esto la ha llevado a una situación crítica, con el cambio de las circunstancias (clima, demanda social, economía, situación sanitaria, etc.) puede pasar a ser una población imprescindible. Es por ello que el objetivo es conservar la máxima diversidad genética que permita la conservación de las diversas poblaciones. Y esto supone ante todo la conservación de genes, que quedan a disposición de necesidades futuras, que actualmente se desconocen (Kohler-Rollefson et al., 2009).

En las últimas décadas se establecen diferentes criterios para asignar a una población o raza según su estado de riesgo, amenaza o peligro. Inicialmente estas categorías se establecían en base a los datos censales, pero actualmente se tiende a incorporar caracteres de modulación que orientan sobre el estado evolutivo de la raza: distribución geográfica, porcentaje de hembras que crían en pureza, tendencia poblacional de los tres últimos años o en una década, etc. (Sánchez, 2002). Incluso se puede hablar de un tercer grupo de valores según la existencia de entidades que trabajen para su conservación, de actividades culturales donde está presente la raza, de un programa de conservación y mejora en marcha, o de un mercado específico para sus productos, con la localización de su nicho de mercado y su diferenciación, etc. (Delgado et al., 2010b).

A continuación, se detallan algunas de las categorías establecidas y sus criterios:

- Brooke & Ryder (1978) proponen cinco categorías para clasificar a las especies silvestres, teniendo en cuenta sus censos y su tendencia:
 - En peligro.
 - Vulnerable.
 - Rara.
 - No amenazada momentáneamente.
 - Indeterminada, con datos insuficientes.
- Maijala et al. (1984) catalogan a la población según el tamaño actual de la misma, tendencia a cambiar, riesgo de sufrir cruzamientos, existencia de asociación de criadores y patrón de distribución de la población.

- La Asociación Europea de producción Animal (EAAP), establece la división en cinco categorías en función del incremento de la consanguinidad en 50 años (ΔF) (Simón & Buchenauer, 1993):
 - En peligro crítico, ΔF superior al 40 %.
 - En peligro, ΔF entre un 26 y un 40 %.
 - Ligeramente en peligro, ΔF entre un 16 y un 25 %.
 - Posiblemente en peligro, ΔF entre un 5 y un 15 %.
 - Fuera de peligro, ΔF por debajo del 5 %.

- La FAO clasifica la situación de las razas en siete categorías (FAO, 2007):

Extinta: cuando han desaparecido todos sus efectivos, tanto vivos como crío-conservados.

Crítica: cuando el número de hembras reproductoras no supera los 100, y/o el número de machos reproductores es igual o inferior a cinco. O bien cuando el tamaño efectivo de la población está por debajo de 120. O bien cuando el porcentaje de hembras de cría que se aparean en pureza es menor al 80%.

Crítica-mantenida: cuando las poblaciones que, aun manteniendo las cifras anteriores, poseen programas activos de conservación y sus cifras permanecen estables en el tiempo.

Amenazada: cuando el número de hembras reproductoras está entre 100 y 1.000, y el de sementales entre cinco y 20, siempre que más del 80 % de las hembras se apareen en pureza.

Amenazada-mantenida: cuando se presenta la situación de amenazada, pero existen programas de conservación y la actuación de instituciones públicas o privadas, además de mantener sus cifras estables en el tiempo.

Sin riesgo: el número de hembras de cría supera las 1.000 y el número de sementales los 20, o cuando el tamaño total de la población supera los 1.200 animales, y está creciendo.

Desconocido: cuando no hay información disponible que permita evaluar objetivamente la situación de la población.

5.1.3. Prioridades de conservación.

Dado el interés en conservar la máxima diversidad genética posible, lo difícil que resulta mejorar y lo costoso del desarrollo de los programas de mejora, es previsible que se pretenda establecer prioridades de conservación. En muchos artículos y en diferentes foros de debate se

trata la posibilidad de priorizar acciones y recursos en base a la diversidad aportada (Barker, 2001). La toma de decisiones en este sentido requiere del análisis simultáneo de varios criterios, de la participación de científicos de diversos ámbitos y de sistemas altamente estudiados para evitar resultados sesgados (Joost et al., 2010).

Los avances en los conocimientos y la aplicación de la genética molecular pueden facilitar la toma de decisiones según el análisis de la contribución a la diversidad que conllevaría la conservación de una población u otra (Jamieson et al., 2006; Cañon et al., 2011; Ginja et al., 2013).

5.1.4. Estrategias y programas de conservación y mejora.

En base a las recomendaciones de científicos, organismos independientes como la FAO y la EAAP y de las estrategias planteadas a nivel gubernamental, se establecen los programas de mejora para evitar la pérdida de diversidad genética y favorecer la conservación de las razas. Estos programas pueden dividirse en programas de conservación y/o selección. Existe gran cantidad de estudios que valoran la idoneidad de utilizar uno u otro sistema o ambos. La elección del sistema de conservación se realiza en función del estado en que se encuentra la población en el inicio del programa, y su estrategia depende de la capacidad técnica, económica y de infraestructura para aplicar cada uno de los protocolos.

Delgado (2010), cuando hace referencia al planteamiento de los programas de conservación y mejora habla de conservación, estructuración y selección. La estructuración se basa en la creación o existencia de entidades y organismos que den apoyo a la conservación de la raza para evitar su retroceso y sitúa esta acción entre la conservación y la selección. En este mismo sentido las leyes publicadas para la gestión y conservación de los recursos establecen como máximo exponente de garantía de conservación de los RGA la existencia de las asociaciones de criadores, las cuales, tras la comprobación del cumplimiento de las condiciones requeridas de representatividad y capacidad, son reconocidas oficialmente para la gestión de los libros genealógicos y de los programas de cría. Según el estado en que se encuentran dichos recursos y su gestión, se clasifican las razas en función de sus posibilidades (Delgado et al., 2010):

- Población a conservar:
 - No está caracterizada ni definida (no disponen de patrón).
 - Sus censos son bajos y/ el número de rebaños escaso.
 - Carece de estructura (Asociación de criadores, núcleos de control, etc.).
 - Se dispone de nula o escasa información técnico-científico sobre ellas.
 - No dispone de banco de germoplasma o es rudimentario.
- Población a estructurar:
 - Está caracterizada y definida (dispone de patrón).
 - Sus censos y numero de rebaños son medios-altos.
 - Dispone de una estructura parcial.
 - Se dispone de suficiente información técnico-científica sobre ellas.
 - Carece de programas de conservación y defensa de sus productos.
 - No dispone de banco de germoplasma o es rudimentario.
- Población a mejorar:
 - Está caracterizada y definida (dispone de patrón).
 - Sus censos y número de rebaños son medio-altos.
 - Dispone de estructura poblacional.
 - Se dispone de suficiente información técnico-científico sobre ellas.
 - Dispone o está en camino de disponer de programas de promoción y defensa de sus productos, que deben implementarse.
 - Dispone o está en camino de disponer de banco de germoplasma u otro material genético. Y se plantea la creación de duplicados.

Según esta clasificación, comparada con la establecida por la FAO, serian razas a conservar y estructurar las que se encuentran en situación crítica, amenazada y como razas a mejorar las que están fuera de riesgo.

Como conclusión a los trabajos revisados se puede decir que, para el planteamiento de un programa de cría de una raza determinada, se deberá conocer cuál es la situación de partida: estado de peligro, estructura de la población, censo, población efectiva, interés social, posibilidades de desarrollo, ubicación, etc. y a partir de este conocimiento se plantea si se desarrolla un programa de conservación o de selección (Taberlet et al., 2011).

5.2. Tipos de programas de conservación.

Programa de conservación: Se basa en el mantenimiento de diversidad genética de la raza, evitando pérdida de genes (Camacho et al., 2011; Dumasy et al., 2012).

Los programas de conservación pueden plantearse mediante actuaciones *in situ* o *ex situ*, que a su vez pueden ser *in vivo* o *in vitro*. Estos sistemas deben ser complementarios y en ningún caso excluyente. Por lo general la conservación *in situ* es la primera elección dado que es el sistema tradicional de producción y mantiene a las razas ligadas a los ambientes que le dieron origen. Pero las condiciones o la situación en que se encuentra la raza, pueden llevar a optar por la conservación *ex situ* que depende de otros factores externos, como son las posibilidades económicas, los avances de la técnica para la conservación *ex situ in vitro* o la conservación de una población se elige teniendo en cuenta las posibilidades del momento y de la situación de la raza (Blackburn, 2004; Gandini et al., 2007).

Conservación *In situ*

Implica la recuperación y el mantenimiento de los animales vivos en el lugar donde se ha desarrollado, en su propio ambiente (Maiwashe & Blackburn, 2004; Li et al., 2009; Blackburn et al., 2011). El principal inconveniente suele ser que son razas económicamente poco rentables, siendo este el motivo de abandono en muchas ocasiones, además de poco estudiadas o caracterizadas, por lo que resulta difícil buscar su nicho de conservación (Halimani et al., 2013).

Conservación *Ex situ*

Consiste en mantener poblaciones cerradas fuera del ambiente en que se desarrollan habitualmente. Supone una garantía de conservación ante circunstancias de riesgo como son su bajo interés productivo con alta posibilidad de abandono, problemas sanitarios epidemiológicos de gravedad, con alta mortalidad o con duras medidas de contención para evitar su expansión, fuerte presión a favor del cruce industrial para obtener mayor rendimiento productivo y económico, etc. (Caroli & Pizzi, 2012).

In vivo, zoológicos, parques reservas, etc. Se trata de mantener la población fuera de su ambiente habitual de cría. Pueden darse dos situaciones: el mantenimiento de todos los individuos de la raza fuera de su entorno y en un único reservorio, solo justificado en caso crítico de grave amenaza y con poblaciones de censos muy reducidos; o de una parte de la población, en este caso es muy importante la gestión de toda la población en conjunto, teniendo en cuenta los posibles aislamientos genéticos (Silva et al., 2010; Azevedo et al., 2011; Woelders et al., 2012).

In vitro, generalmente se basa en la instauración de sistemas de crioconservación y en la creación de colecciones o bancos de material genético: germoplasma y/o embriones u otro material genético (ovocitos, células somáticas, tejidos o ADN) (Falge et al., 1996; Harnal et al., 2002; Blackburn, 2006; Blesbois et al., 2007; Blackburn, 2009). Este sistema permite recuperar, en un futuro la diversidad perdida (Frankham, 1999).

Previamente al diseño y al establecimiento de cualquier programa de conservación de una raza se inician los estudios de la misma, que continua a lo largo de su desarrollo para vigilar en todo momento su evolución (Zanetti et al., 2011). Se requiere la organización del substrato, es decir, determinar la situación de partida en cuanto a la localización, identificación y registro de los individuos pertenecientes a la población, registro de los antecedentes genealógicos conocidos, listado de explotaciones y criadores de la raza, ubicación y distribución, estructura de la población, sistemas de explotación, circunstancias sociales y ambientales, etc. (Folch & Jordana, 1998; Roswitha & Johann, 2003; Miro-Arias et al., 2012). Es esencial la recogida de toda la información posible para la definición de la raza y realizar su caracterización genética, morfológica, reproductiva y productiva.

Programa de selección: consiste en la búsqueda de progreso genético mediante la utilización de los individuos mejor dotados genéticamente para formar la siguiente generación o el producto final. El progreso genético de la población debe hacerse sin perder de vista la interacción entre genotipo, fenotipo, fisiología y adaptabilidad de la raza, para no perder la relación y el equilibrio con el medio ambiente de gran valor en las razas locales (Williams, 2005; Ellen et al., 2014).

Metodología en programas de selección:

- Elección de parámetros que se quieren mejorar (Bauer et al., 2012).
- Selección de los criterios de mejora (Rodero et al., 2013).
- Control de rendimientos: carne, leche, huevos, funcional, etc. (Lupi et al., 2012).
- Reproducción controlada: distancia genética de los reproductores, participación de ancestros, maximizar la población efectiva, mínima de diversidad (Gandini et al., 2014).
- Diseño del esquema de selección (Mwacharo & Drucker, 2005).
- Programa de difusión de la mejora: catálogo de sementales, boletines, etc.

Herramientas e infraestructura utilizadas en los programas:

- Sistemas informáticos y de registros generales: DAD-IS, ARCA u otros.
- Libros genealógicos: redacción, establecimientos de estructura y funcionamiento, puesta en marcha de todos sus registros.
- Software para el análisis estadístico de los datos recogidos, que permitirá valorar su evolución.
- Fincas colaboradoras: explotaciones ganaderas, que tienen y crían animales de la raza, los cuales están inscritos en su registro genealógico correspondiente y cumplen con los programas establecidos para su conservación y/o mejora.
- Centros de cría: en algunos casos, especialmente en las situaciones críticas y en especies, de corto ciclo biológico, que así lo permitan o en circunstancias que lo favorezcan como son la disponibilidad de centros donde ubicarlos. Su existencia permite un aporte de ejemplares a los nuevos criadores o de animales seleccionados y mejorados a las explotaciones que ya están criando una raza concreta, para difundir la mejora conseguida.
- Centros de testaje o de prueba de sementales: para conocer a los sementales mejorantes debe de estudiarse la capacidad o el grado de transmisión de la información genética deseada. Para ello se debe de disponer de una gran cantidad de sementales sometidos a sistemas de cría homogéneos (en razas pequeñas como gallinas y conejos) o sometidos a valoración en diferentes explotaciones (en especies de mayor tamaño como ovino o bovino). Para ello, deben de conectarse los rebaños con el mismo semental y así pueden diferenciar los efectos genéticos de los efectos ambientales o de manejo.
- Centros de recogida, almacén y distribución de material genético: permite conservar las colecciones de material genético actualizadas y aplicar técnicas de reproducción asistida, que facilitan: Elección del semental para el cruce más idóneo, en base a los objetivos del programa. Recuperación del material genético perdido, incorporando algunos ancestros. Aplicar el efecto de fundador para mejorar las distancias o recuperar diversidad. Incluso realizar cruces por absorción para recuperar o dar viabilidad a razas que en un momento determinado no se les dio valor y que ahora se detecta la importancia de su conservación para hacer frente a situaciones cambiantes.
- Bancos de germoplasma: en muchas especies es el sistema de garantía de la conservación *ex situ* más avanzado y con mejores perspectivas de intervención en acciones futuras.

- Centros de genética: la información que aporta la genética permite tomar decisiones como: elección de los programas más adecuados para cada población. Asignación de los individuos a la población de referencias (inclusión o exclusión). Comprobación de filiaciones, conocimiento de genealogías. Valorar la importancia de conservación, relaciones entre individuos y entre razas. Uso de índices genéticos, para la mejora. Evaluación de los progresos en los programas aplicados.

6. Herramientas de genética molecular para la conservación y caracterización de animales.

La aplicación de la genética molecular en el estudio de poblaciones es relativamente reciente. En la actualidad las técnicas moleculares son muy utilizadas para analizar la diversidad genética de las poblaciones animales, aunque hasta hace poco su desarrollo iba ligado al interés económico que podían presentar las diferentes especies y en consecuencia se priorizaba su uso en el bovino, porcino y en la especie aviar. No obstante, su uso en las razas locales puede producir beneficios significativos, si se utiliza para facilitar al criador o ganadero la toma de decisiones (Biscarini et al., 2015).

El genoma contiene toda la información necesaria para el desarrollo y el funcionamiento correcto del organismo. En los pavos, el genoma está constituido por 16 717 pb, siendo dicha secuencia similar en promedio a la del pollo, la codorniz japonesa y las gallinas de Guinea (16 785, 16 697 y 16 726 pb) respectivamente (Lucchini et al., 2001; Mock et al., 2001; Drovetski, 2002).

La existencia de diversos equipos científicos y consorcios que trabajan en genética animal a nivel internacional (ECOGENE; ISGC; BIOBOVIS; RED CONBIAND), junto con la reducción de los costes que supone la utilización de estas técnicas, acelera su utilización con diversos objetivos: estudios evolutivos, localización e identificación de genes que predisponen la aparición de ciertas enfermedades, identificación de caracteres productivos, caracterización de poblaciones, análisis de diversidad genética, control de genealogías, etc. Aun así, no debe de olvidarse que cualquier técnica tiene sus limitaciones (Allendorf et al., 2010).

En la década de los años 60 del siglo XX, se generaliza el uso de marcadores genéticos para la identificación de un individuo o comprobación de filiación. Ciencias como la genética, bioquímica e inmunología, ofrecen la posibilidad de estudiar unas estructuras, que varían de unos individuos a otros. La caracterización con marcadores moleculares se basa en el

polimorfismo que presentan ciertos fragmentos de ADN. Estos marcadores deben de cumplir algunos requisitos: ser estables a lo largo de la vida de un individuo y estar controlados por un solo gen o *locus* genético y además las técnicas empleadas para su caracterización deben ser científicamente probadas, reproducibles y precisas. En España estas técnicas se imponen en los años 90 del siglo XX para estudiar la genealogía y caracterizar genéticamente las poblaciones. Posteriormente se utilizan para analizar caracteres cuantitativos de alto interés económico difíciles de medir y para aplicar en los programas de conservación (Delgado et al., 2001).

Los estudios del ADN comienzan a ofrecer nuevos y numerosos marcadores genéticos moleculares ampliamente utilizados para realizar estudios de variación genética, distancias genéticas entre individuos y controles de asignación y de filiación. Algunos ejemplos son los estudios de AFLPs (Ajmone-Marsan *et al.*, 2001), ADN mitocondrial (Amilis et al., 2009), Cromosoma Y (Zhang et al., 2014) o RAPDs (Rodrigues de Oliveira et al., 2005). Los microsatélites han sido los marcadores de elección en estudios de diversidad genética en varias especies de animales vertebrados (Vega-Pla et al., 2006; Peter et al., 2007; Groeneveld et al., 2010; Lenstra et al., 2012; Delgado et al., 2012; Lyimo et al., 2014; Martínez et al., 2015; Jordana et al., 2015). Hasta el momento los microsatélites siguen siendo adecuados para realizar estudios de diversidad genética y establecer las relaciones genéticas entre razas (Bruford et al., 2015).

7. Marcadores moleculares.

Singh et al. (2014) definen los marcadores moleculares como una variación específica del ADN entre individuos, a la cual se han asociado ciertas características. Estos marcadores genéticos se basan en la tecnología del ADN recombinante y el polimorfismo se detecta directamente sobre la propia molécula de ADN. Los cambios más frecuentes son mutaciones que se observan por la sustitución de un nucleótido o por el cambio en el número de bases (Rosenberg et al., 2003; FAO, 2011).

El avance en las técnicas de reacción en cadena de polimerasa PCR (Mullis et al., 1986; Mullis, 1991) y la utilización de nuevas herramientas estadísticas que facilitan el tratamiento e interpretación de los datos obtenidos, son determinantes para su progreso y desarrollo. La PCR consiste en una reacción enzimática catalizada por una polimerasa, que permite la amplificación de un fragmento de ADN a partir de una pequeña cantidad inicial, que actúa de molde. Para que se realice esta reacción se requiere de elementos específicos denominados primers, que son complementarios a zonas colindantes del fragmento de ADN que se requiere amplificar.

Posteriormente su visualización se consigue mediante electroforesis y el genotipado se realiza con aplicaciones informáticas específicas.

Entre las variaciones de bases de ADN se incluyen inserciones, delecciones, translocaciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. Tienen un amplio abanico de aplicaciones como la filiación, la determinación de distancias genéticas, la determinación de enfermedades hereditarias y la selección asistida por marcadores (MAS).

Los marcadores se pueden agrupar según sus características y sistemas de detección (Martínez, 2001; Aranguren-Méndez et al., 2005; Villalobos, 2010). Entre los más utilizados están:

- RFLPs (*Restriction fragment length polymorphisms*).
- RAPDs (*Random amplified polymorphic DNA*).
- AFLPs (*Amplified fragment length polymorphisms*).
- SSRs (*Sequence tandem repeats*)- STRs (*Short tandem repeats*).
- SNPs (*Single nucleotide Polymorphisms*).

7.1 Polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLPs).

La causa del polimorfismo es la pérdida de una o más dianas de restricción debido a mutaciones puntuales, en consecuencia, la enzima pierde capacidad de reconocer dicha diana y por tanto de cortar el ADN en ese lugar. Es una de las primeras técnicas descritas desde la aparición de la PCR. Con este método se demuestra, que los genomas tienen niveles de variación muy superiores a los observados mediante el análisis de proteínas (Botstein et al., 1980). Su limitación se debe a que solo identifica dos alelos por *locus* y requiere de un ADN en condiciones óptimas. Además, es una técnica cara, laboriosa y compleja que presenta una baja repetitividad. Todo ello ha hecho que en el mundo animal se haya relegado su empleo a circunstancias excepcionales y al campo de la investigación (Parker et al., 1998). En el campo de los pavos se han ocupado para realizar estudios en carne, estudiar complejo mayor de histocompatibilidad y trabajar con muestras degradadas

7.2 Polimorfismo amplificado aleatoriamente (RAPDs).

Consiste en usar fragmentos de ADN como modelos aleatorios para amplificar el ADN utilizando un solo cebador oligonucleótido sintético corto de 10 pb. Mediante la reacción de la PCR a temperaturas bajas, se generan una serie de fragmentos de amplio espectro a partir del ADN molde (Martínez-Trancón *et al.*, 1998; Becerra Paredes, 2000). La ventaja que presenta

esta técnica es que no hace falta conocer la secuencia del ADN a estudiar y los niveles de polimorfismos son generalmente altos para la mayoría de cebadores. La desventaja es que la amplificación de los RAPDs es muy sensible a las condiciones de la reacción. Son marcadores genéticos multialélicos, multilocus y dominantes, con herencia mendeliana. Su carácter dominante hace que sean poco informativos y poco útiles para el mapeo genético, pero sí lo son para la detección de genes singulares y para la identificación de estirpes o variedades (Rafalski & Tingey, 1993).

7.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

Consiste en la amplificación selectiva, mediante PCR, de fragmentos de restricción a partir del ADN genómico. Tras el análisis de los fragmentos amplificados mediante electroforesis se obtienen patrones de bandas complejos, pero repetibles de un experimento a otro. Son marcadores dominantes (ausencia o presencia de bandas) y en consecuencia poco informativos. Se han utilizado en estudios de identificación y análisis de las relaciones genéticas entre individuos (Vos *et al.*, 1995).

7.4. Polimorfismos de secuencias repetitivas cortas (SSR).

El polimorfismo se debe a la repetición en tándem de un fragmento de ADN formado por un número variable de pares de bases. El grado de repetición, el tamaño del fragmento repetido y el patrón de distribución de las secuencias repetitivas en el genoma son los principales criterios de clasificación (Martínez, 2001). Los más utilizados son los Microsatélites (STRs), que son secuencias repetidas de entre una y seis pares de bases.

En 1989 tres equipos de investigadores, que estudian el ADN, descubren en el genoma humano secuencias muy peculiares que fueron denominadas microsatélites (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989). Los microsatélites son marcadores moleculares localizados en regiones no codificantes de ADN, compuestos por secuencias de uno a seis nucleótidos repetidos en tándem entre 10 a 30 veces (Fries *et al.*, 1990; Goldstein & Pollock, 1997; Noble, 1999). El polimorfismo de los microsatélites se basa en la variación en el número de repeticiones de la secuencia repetitiva. En consecuencia, los diferentes alelos de un microsatélite se diferencian por el número de repeticiones de la secuencia repetitiva.

Según el tipo de repetición en la secuencia de microsatélites se clasifican en (Oliveira *et al.*, 2006):

- Microsatélites perfectos, las secuencias repetidas no son interrumpidas por ninguna base que no pertenezca a las mismas, como, por ejemplo: GAGAGAGAGAGA.
- Microsatélites imperfectos, existen bases entre las secuencias repetidas que no coinciden con la misma, TATATATGTTATATATA.
- Microsatélites interrumpidos, se observa una pequeña secuencia que no se corresponde con las repeticiones, CGCGCGCGTAGCCG.
- Microsatélites compuestos, contienen dos secuencias distintivas adyacentes, CGCGCGCGGTATATATATATA.

La frecuencia de las distintas secuencias varía según el genoma estudiado y aunque pueda estar formado por secuencias de uno a seis nucleótidos, las más comunes son repeticiones dinucleotídicas, seguidas de las mononucleotídicas, trinucleotídicas y del resto en menos medida (Tautz & Renz, 1984; Beckmann & Soller, 1990). Las repeticiones (CA)_n son las frecuentes en los mamíferos y en consecuencia las más utilizadas. No obstante, también se encuentran las secuencias (GC)_n y (TG)_n aunque en mucha menor frecuencia (Tautz *et al.*, 1986).

La variación genética de los microsatélites se detecta utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis *et al.*, 1986b; Saiki, 1990, Mullis, 1991) y una electroforesis de los productos resultantes.

El material de partida es generalmente sangre, aunque puede emplearse también pelos, plumas, sangre en papel y otros tejidos biológicos, siendo necesaria muy poca cantidad de material de partida. La PCR se desarrolla en ciclos de dos o tres fases: La primera desnaturalización de las cadenas de ADN, la segunda hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias del ADN diana y la tercera es la fase de elongación de los cebadores por acción de la polimerasa. En la de dos fases se repiten todos los pasos de la PCR de tres fases, pero se elimina el paso de elongación, repitiendo solo el pasaje de desnaturalización e hibridación. Después de 30-35 ciclos se produce un efecto “meseta”. Se trata de la atenuación del ritmo exponencial de amplificación con el incremento, a partir de este punto, de productos no específicos.

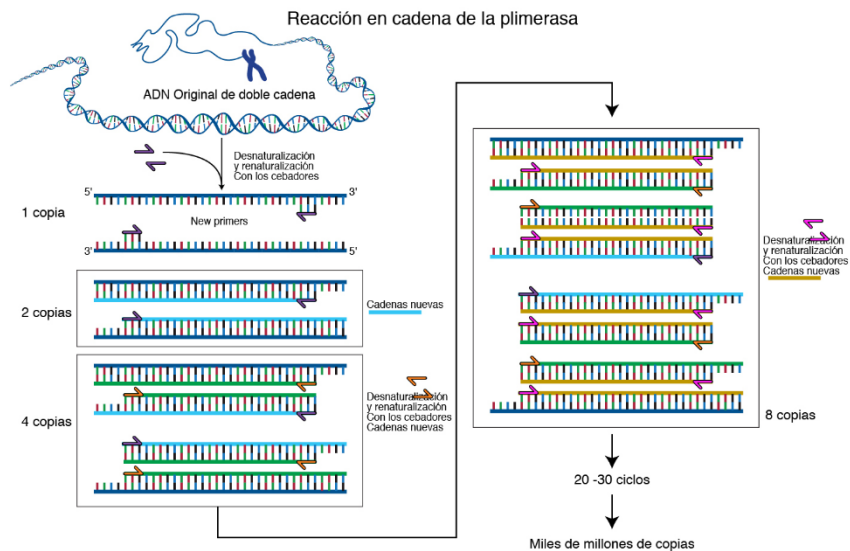


Figura 12.- Esquema del proceso de amplificación de secuencias mediante PCR.

Fuente: National Human Genome Research Institute.

Mediante la técnica de electroforesis, se analizan las variaciones en longitud de los fragmentos de ADN generados con la amplificación. La electroforesis se lleva a cabo mediante el empleo de secuencias automáticas, que ofrecen otras facilidades adicionales para la identificación de las variantes y su procesamiento informático (Vanfleteren & Vierstraete, 1999).

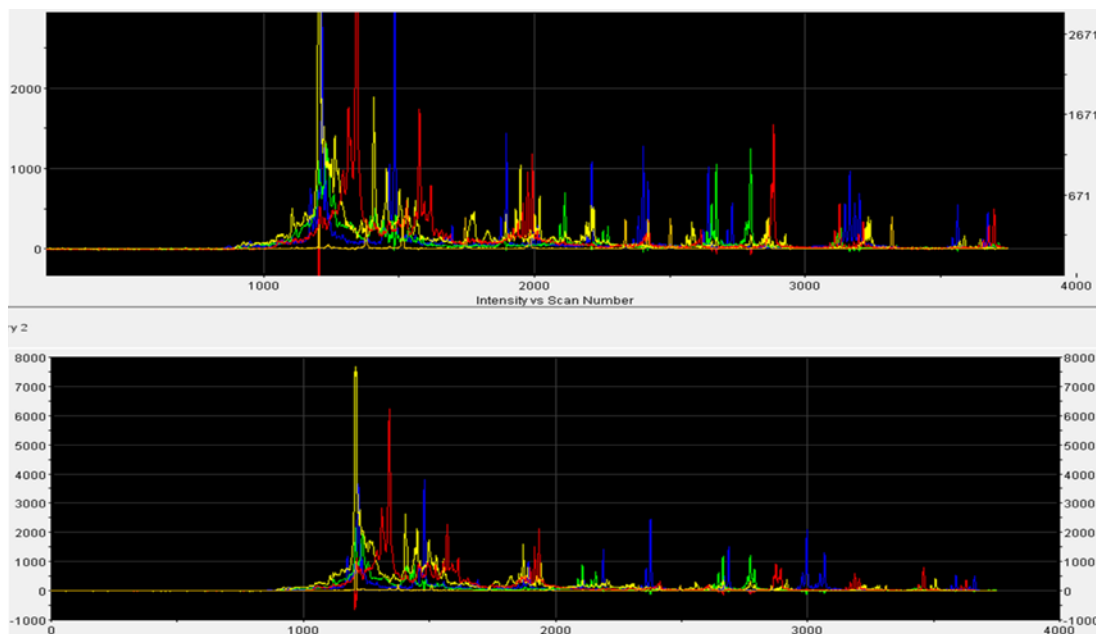


Figura 13.- Separación de fragmentos amplificados mediante electroforesis.

Genescan Analysis, Genotyper y Genemapper son algunos de los programas que se utilizan para obtener la fórmula genotípica de los individuos analizados. Los diferentes alelos se nombran según su nomenclatura establecida o en caso del diseño de un nuevo panel de marcadores, se le asignará el nombre después de analizarse en diferentes poblaciones de animales del panel que se esté diseñando. Con el genotipo se obtiene la fórmula genética de cada uno de los animales analizados.

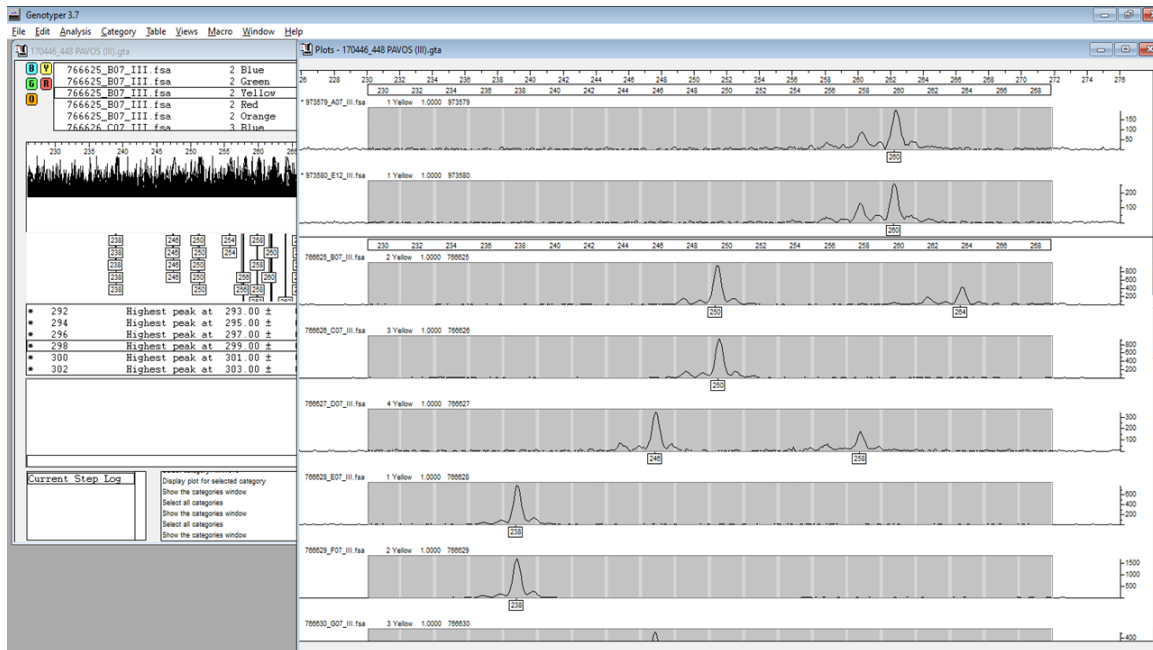


Figura 14.- Denominación alélica de los fragmentos obtenidos utilizando el programa Genotyper v 3.7.

Ventajas que presentan la utilización de los microsatélites como marcadores genéticos (Gonzales, 2003):

- Son muy frecuentes y están repartidos por todo el genoma (ADN) y a menudo presentan un alto grado de polimorfismo en cuanto al número de repeticiones de la secuencia.
- El modelo de herencia es mendeliano y los alelos detectados presentan dominancia.
- Se necesitan cantidades muy pequeñas de material biológico para la determinación de las variantes alélicas, lo que permite el estudio de muestras muy antiguas.
- El material de obtención del ADN es diverso, sangre, pelo, lana, hueso, etc. e incluso puede estar en condiciones de conservación no óptimas.
- Las técnicas empleadas para la detección de la variabilidad son muy simples en comparación con otras técnicas de investigación del polimorfismo del ADN y se han facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos.

En los últimos años, los microsatélites son una herramienta de bajo coste y se utilizan en gran cantidad de estudios en especies domésticas: evaluación de la diversidad genética intra y entre razas, aportando información de origen, relaciones entre razas y estado de las poblaciones. En base a los resultados se pueden establecer los programas de conservación de las razas (Aranguren-Méndez & Jordana, 2001). Los microsatélites se estudian en todas las especies domésticas: equino, porcino, caprino, aves, etc. (Jordana *et al.*, 2001; Martínez, 2001; Martínez *et al.*, 2005; Martin-Burriel *et al.*, 2007; Lasagna *et al.*, 2011; Bakhtiarizadeh *et al.*, 2012; Gama *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2014).

8. Aplicación de los marcadores de los microsatélites en pavos.

Los microsatélites por sus características son un tipo de marcadores muy empleados en los estudios de poblaciones y son de elección como método fiable para la tipificación e identificación individual y para la caracterización genética de poblaciones (Valle *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2005; Avellant, 2005; Vega-Pla *et al.*, 2007; Marmi *et al.*, 2007b; Viudes de Castro *et al.*, 2009; Cecobelli *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2012; Pablo *et al.*, 2013; Villalobos *et al.*, 2018).

Con la información obtenida del estudio de las variantes de cada microsatélite presente en una población se puede calcular el grado de heterocigosis, la variabilidad que presenta cada uno de los marcadores diseñados para la población, la que se puede deducir del conjunto de ellos y la diversidad intrapoblacional. Además, se obtiene información de la diversidad entre poblaciones, valorando las migraciones existentes entre las poblaciones compradas y la distancia genética que hay entre las mismas (Arranz *et al.*, 1998; Azor *et al.*, 2004; Ferrando *et al.*, 2007a; Ferrando *et al.*, 2007b; Dalvi *et al.*, 2008; Quiroz *et al.*, 2008; Lasagna *et al.*, 2011; Kunene *et al.*, 2014; Pons *et al.*, 2016).

Todo individuo de una población determinada presenta una serie de características que difieren del resto y que se incrementa a medida que las relaciones de parentesco son menores; cuando dos poblaciones dejan de intercambiar material genético mediante el apareamiento, los individuos de las respectivas poblaciones llegan con el tiempo a presentar caracteres comunes a todos los miembros de cada uno de ellas, pero diferentes entre los dos. El conocimiento de la secuencia del ADN en puntos concretos puede poner en evidencia el grado relativo de distanciamiento que están teniendo dichas poblaciones. Por ello, los microsatélites son muy utilizados en estudios de evolución (Buchanan *et al.*, 1994; Diez-Tacson *et al.*, 2000; Gutierrez-Espeleta *et al.*, 2000; Tapio *et al.*, 2005; Lawson Handley *et al.*, 2007; Gregoire Leroy *et al.*,

2015), en las pruebas de asignación (Arranz et al., 1998; J.-J. Arranz et al., 2001; Rosa et al 2013) y en control de filiación (Martínez et al 2007; Martínez et al., 2008; Sanz et al., 2014).

9. Análisis Estadístico.

9.1. Caracterización genética de poblaciones.

Para la cuantificación de la diversidad genética que presenta una población se utilizan una serie de parámetros que se basan en la variabilidad de los alelos y de las frecuencias de los mismos.

9.1.1 Números de Alelos (N_a) e intervalo de número de alelos por locus.

Es un valor que se obtiene del recuento directo de los alelos observados para cada locus. Su intervalo indica el menor y mayor número de alelos por locus. Este parámetro varía según el tamaño de la muestra y el número de marcadores analizados. Algunos estudios demuestran que el número de alelos totales no implica directamente una mayor diferenciación genética. Para conocer el grado de diversidad se requiere de más información sobre la estructura y el comportamiento de la población (Glowatzki-Mullis et al., 2009).

9.1.2. Número medio de alelos (NMA).

Se obtiene con la suma de todos los alelos detectados en todos los loci, dividido por el número total de loci. Este parámetro es uno de los más utilizados en los estudios de diversidad genética de las poblaciones, su variabilidad condicionará la elección de los microsatélites como marcador. Ofrece información sobre la diversidad genética de la población, en principio a mayor número de alelos, mayor es la variabilidad genética que existe y viceversa.

El NMA junto con otros datos de frecuencias, grado de polimorfismos y heterocigosis, permite caracterizar la población y analizar su estructura y los eventos que la han originado. Un valor NMA alto junto a una Heterocigosis esperada (H_E) alta y un valor de índice de fijación F_{IS} altos puede ser debido a la introducción de otras razas (Quiroz et al., 2008). Un valor bajo de NMA también puede indicar una cría de rebaños cerrada (Azor et al., 2004), un muestreo incorrecto e incluso si va unido a una Heterocigosis observada (H_O) mayor a la H_E puede ser debido a un caso anterior de cuello de botella en la población (Arranz et al., 1998). Un valor bajo de NMA y una baja H_E podría ser debido al aislamiento (Quiroz, 2007)

9.1.3. Frecuencias alélicas.

La frecuencia genotípica es la frecuencia de cada uno de los posibles genotipos que aparecen en una población mendeliana. La frecuencia alélica o génica se puede definir como el cociente de dividir el número de alelos iguales presentes, por el número total de alelos de la población o

como la frecuencia relativa de un alelo en una población mendeliana determinada. El cálculo de las frecuencias alélicas se hace por recuento directo de los alelos, asumiendo que la observación de un solo alelo representa la condición de homocigosis y que no hay alelos nulos, ni no amplificados.

Los cambios producidos en las frecuencias alélicas resultan ser indicadores de la evolución de una población. Pueden ser cambios sistemáticos hacia un mismo sentido y son debidos a mutaciones, migraciones o acciones de selección. Sin embargo, también pueden ser dispersos, producidos al azar por deriva genética o por endogamia (Young et al., 1996; Gutierrez-Espeleta et al., 2000; Marmi, 2007; Glowatski-Mullis et al., 2009).

9.1.4. Polimorfismo.

Un gen se considera polimórfico si la frecuencia del alelo más frecuente es menor o igual a 0,95. Cuando uno de los alelos de un marcador supera el 0,95 se considera homocigoto, dado que el segundo apenas tiene presencia y puede desaparecer fácilmente de la población por deriva genética (Martínez et al., 2005). Se calcula por recuento directo. El polimorfismo de un marcador varía de una población a otra, por lo que algunos de los microsatélites se mantienen en el estudio a pesar de ser monomórficos en alguna de las poblaciones.

9.1.5. Numero efectivo de alelos (A_e).

Es el número de alelos que pueden estar presentes en una población. Su medida indica el número de alelos esperados en cada locus de una determinada población.

El cálculo de este índice se realiza mediante la ecuación de Kimura y Crow (1964). El resultado A_e se ve afectado por la proporción de los loci polimórficos, el número de alelos por locus polimórfico, las frecuencias alélicas y por el tamaño de la muestra. Las posibles variaciones por el tamaño de la muestra y el polimorfismo de los loci, reduce el uso de esta medida de diversidad, aunque puede proporcionar información útil para establecer la estrategia del muestreo.

9.1.6. Riqueza alélica (RA).

Es el número medio de alelos por locus corregido para el número de individuos de la menor población muestreada. Cuantifica el número total de alelos diferentes detectados en cada uno de los loci de una población.

9.1.7. Heterocigosis (H_E y H_O).

Una valoración de la diversidad genética es la heterocigosis de la población, medida como la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus, o lo que es lo mismo la frecuencia promedio de individuos de una población que ostentan dos alelos diferentes en un locus concreto.

Generalmente se usa el termino heterocigosis para referirse a heterocigosis observada (H_O), y el de diversidad genética para referirse a la heterocigosis esperada (H_E).

La proporción de individuos heterocigotos observados en una muestra de la población es lo que se denomina H_O . Se obtiene dividiendo el número de individuos heterocigotos para cada locus por el total de individuos analizados. Si se calcula a partir de los genotipos encontrados en la población para todos los loci se trata de la heterocigosis media observada.

Su error estándar viene dado por la raíz cuadrada de la varianza y dependerá del número de loci estudiados y del tamaño de la muestra.

La Heterocigosis esperada (H_E) se obtiene a partir de las frecuencias génicas, en el supuesto de que haya equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y representa la diversidad genética. Consiste en la probabilidad de que dos alelos seleccionados aleatoriamente sean diferentes en una población en equilibrio. Es conocida como índice de diversidad genética de Nei (Nei, 1973; Nei, 1977; Nei et al., 1983).

En el caso en que una población se encontrara en completo equilibrio de Hardy-Weinberg, la H_E y la H_O serian equivalente. El resultado varío de 0 a 1. El error es menor a medida que aumenta el número de loci empleados y el error causado por el tamaño de la muestra se ve reducido con el aumento de microsatélites.

El aumento de la heterocigosis en una población, se produce por diversos motivos, siendo el más frecuente la existencia de migración (Ceccobelli et al., 2010). El descenso de heterocigosis puede deberse a: tamaño pequeño de la población, aislamiento de la población, número reducido de fundadores, alta selección para la especialización y a la cría en endogamia o consanguinidad (Arranz et al., 1998; Azor et al., 2004).

Para valorar si el descenso de la heterocigosis se debe a un proceso de endogamia, debe analizarse este dato junto con otra información sobre la estructura de la población, ya que la heterocigosis por si sola es una medida de diversidad, no de consanguinidad.

9.1.8. Desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (*HWE*).

Una población diploide se considera en equilibrio *HWE* par aun locus genético polimórfico, si la proporción de genotipos observados en la población puede ser completamente definida por las frecuencias alélicas del locus en cuestión.

Los motivos que producen desviación del *HWE* son:

- Apareamientos no producidos al azar.
- Existencia de subdivisiones dentro de la población.
- Coancestros (antepasados comunes).
- Selección natural.
- Migración o flujo de genes de poblaciones externas.
- Técnicas de muestreo incorrectas.
- Presencia de alelos nulos.

La ley de *HWE* se basa en que una población grande bajo apareamiento aleatorio, sin selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación (Hardy, 1908). Esto no implica que se cumplan todas las condiciones enumeradas anteriormente, ya que algunas de ellas pueden no cumplirse y las frecuencias siguen presentando las proporciones previstas por la ley.

En una población en equilibrio la frecuencia alélica es igual a la raíz cuadrada de la frecuencia genotípica. En el caso de los microsatélites, que poseen un gran número de alelos; el número de genotipos es muy elevado cuando las frecuencias alélicas son muy bajas; pudiendo ser algunas frecuencias genotípicas igual a cero.

9.1.9. Contenido de información polimórfica (*PIC*).

Es un indicador de la calidad de los microsatélites utilizados para los estudios génicos, depende del número de alelos y de sus frecuencias, por lo que la información del PIC por sí sola no es suficiente para decidir la elección de un marcador, pero si sirve como orientación (Botstein et al., 1980). Se consideran muy informativos si el PIC es superior a 0,5; medianamente informativos si se encuentran entre 0,25 y 0,5 y poco informativos si es inferior a 0,25.

9.1.10. Estructura y distancias genéticas entre poblaciones.

Para determinar la estructura de las poblaciones y para analizar la relación existente entre poblaciones, se utilizan otros cálculos y tratamientos estadísticos como son: índices de fijación o estadísticos *F*, análisis de varianza molecular o AMOVA, distancias genéticas, análisis

multivariado como la factorial de correspondencia (Belkhir et al., 1996) y modelos basados en técnicas bayesianas (Pritchard et al., 2000).

9.1.11. Índices de fijación (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}).

Wright (1965) se propuso medir las desviaciones de las frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas por medio de tres parámetros, proponiendo para ello la teoría de fijación o estadísticos F , que posteriormente desarrollarán otros autores (Weir & Cockerman, 1984; Chakraborty & Danker-Hopfe, 1991). La teoría de Wright pretende demostrar como la estructura poblacional determina la estructura genética.

Propuso tres parámetros: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} para medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas:

$F_{IS}(f)$ indica la correlación, relativa a la subpoblación entre dos alelos. Índice de fijación de los individuos respecto a las subpoblaciones o desviación de las frecuencias genotípicas observadas en las subpoblaciones respecto a las esperadas, considerando que existe equilibrio de *HWE*.

Es un índice que permite valorar la deficiencia o el exceso de heterocigotos promediado en cada población. El valor puede variar entre -1 y 1. Si el valor de F_{IS} es positivo indica excesos de homocigotos. Si el valor de F_{IS} es negativo refleja un exceso de heterocigotos o una falta de homocigotos.

$F_{IT}(F)$ correlación relativa a la población total o índice de fijación de los individuos respecto al total de la población o desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total respecto a las esperadas, considerando que existe equilibrio de *HWE*.

$F_{ST}(\theta)$ es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de ellos o entre dos alelos tomados al azar uno de cada subpoblación. Indica el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones. Es un índice que informa sobre la deficiencia o el exceso de heterocigotos promediado en un grupo de poblaciones. Su valor varía de 0 a 1 y a diferencia de F_{IS} y F_{IT} no puede tener un valor negativo (Nei, 1973).

Si el valor de F_{ST} es 0 indica que las frecuencias alélicas son iguales en las poblaciones analizadas y no existe divergencia genética. Si el valor de F_{ST} es 1 demuestra que las frecuencias están fijadas para alelos alternos y son diferentes en las poblaciones (Wright, 1943; Wright, 1969).

Nei redefinió los índices de fijación y mostró que los estadísticos F pueden calcularse a partir de la H_O y H_E (Nei, 1977).

Con los estadísticos F se puede conocer la estructura poblacional tanto en situaciones en que las exista selección como en las que no la haya, ya que los términos se encuentran definidos por las frecuencias alélicas y genotípicas de la población en un momento concreto (Nei, 1977).

Existen unos estadísticos análogos que establecen el grado de parentesco de varios pares de alelos (Cockerham, 1969; Cockerham, 1973). En el supuesto de individuos diploides muestreados de una serie de poblaciones, se definen tres parámetros: F que representan la correlación de alelos dentro de los individuos de todas la poblaciones, se corresponde con el F_{IT} de Wright y sería el coeficiente de consanguinidad; Θ , que es equivalente al F_{ST} de Wright, y que sería la correlación de alelos de diferentes individuos en la misma población o coeficiente de parentesco, y f , que es la correlación de los alelos dentro de individuos y dentro de las poblaciones y se corresponde con F_{IS} . Estos tres parámetros se relacionan entre si mediante la expresión

$$f = \frac{(F - \Theta)}{(1 - \Theta)}$$

El cálculo se realiza mediante un análisis de componentes de la varianza, existiendo tres fuentes de variación: poblaciones, individuos dentro de poblaciones y alelos dentro de los individuos. El análisis de componentes de la varianza para datos de genotipo en poblaciones genéticas se construye con las frecuencias alélicas y genotípicas (Weir, 1990).

La medida F_{ST} estándar no puede considerarse como una medida de distancia genética ya que F_{ST} se define para varias poblaciones y la distancia genética se definiría para un par de poblaciones. Nei propone una versión modificada de F_{ST} que puede ser usada como medida de distancia genética cuando se consideran solo dos poblaciones (Nei, 1987).

9.1.12. Tasa de migración (Nm).

Cuando mayor es el flujo genético entre dos poblaciones, menor es la diferenciación genética entre ellas, por lo tanto, la diferenciación genética se ve condicionada por la migración existente. Existe una relación entre el F_{ST} y el Nm expresada mediante la siguiente ecuación (Wright, 1969):

$$Nm = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$$

Si el valor de Nm supera el 1 se consideran como poblaciones no diferenciadas, según Wright (1931), mientras que valores por encima de 2 serían suficientes para contrarrestar los efectos de la deriva. Si Nm es grande, la deriva genética será poco importante y contrarrestada por la

migración. Por lo tanto, las subpoblaciones tenderán a mantener las mismas frecuencias genéticas. Si el valor de Nm es muy bajo, predomina el efecto de la deriva y la mayoría de las poblaciones estarán fijadas.

Otro método para estimar la Nm es el de los alelos privados. Este método y la estimación de la Nm a partir de F_{ST} son parecidos, al basarse en la distribución de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Sin embargo, simulaciones han demostrado que el método de alelos privados es más sensible a errores en la recogida de datos (Slatkin, 1994).

9.1.13. Coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}).

Existe una metodología alternativa para analizar la diferenciación genética entre poblaciones en la que no es necesario conocer las frecuencias genotípicas, porque trabaja directamente con frecuencias alélicas en términos de H_E dentro y entre poblaciones (Nei, 1973). Mide la proporción de diversidad génica que está distribuida entre las poblaciones. No se tiene en cuenta la distribución de frecuencias genotípicas dentro de una población, si no la variación genómica intra e interpoblacional (Nei, 1987). Este método tiene la ventaja de que no está influenciado por el número de alelos por locus, ni por el modelo de evolución (diseñado teniendo en cuenta la mutación, selección y migración) ni por el sistema de reproducción del organismo en cuestión. No obstante, si se requerirá de un número mínimo de alelos, para que los valores sean significativos.

La magnitud relativa de la diferenciación genética entre subpoblaciones pueden ser medida por el coeficiente de diferenciación genética:

$$G_{ST} = \frac{\overline{H_{e_s}}}{H_{e_t}}$$

Donde, H_{e_s} : diversidad genética media entre subpoblaciones; H_{e_t} : diversidad genética media en la población total.

9.1.14. Análisis de varianza molecular AMOVA.

Es un método que sirve para estudiar la variación molecular dentro de una especie. Se basa en un modelo jerárquico, puede contener diferentes supuestos evolutivos sin modificar la estructura básica del análisis, utilizando métodos de permuta, que no requieren de una supuesta distribución normal.

Puede existir diferenciación genética cuando hay un fraccionamiento de una población original en subpoblaciones aisladas. La heterocigosis de estas subpoblaciones disminuye respecto a la población inicial y con un tamaño menor, la erosión genética empujaría hacia una fijación más rápida de alelos diferentes de la que podría ocurrir en una población más grande.

En el estudio de variabilidad entre genotipos, los estadísticos F se pueden calcular según F_{CT} , F_{ST} y F_{SC} de la siguiente manera:

$F_{CT} = \sigma^2_a / \sigma^2$ permutación dentro de grupo.

$F_{SC} = \sigma^2_b / \sigma^2_b + \sigma^2_c$ permutación entre poblaciones y dentro de grupos.

$F_{ST} = \sigma^2_a + \sigma^2_b / \sigma^2$ permutación entre poblaciones y entre grupos.

Tabla 1.- AMOVA para análisis de grupos de poblaciones.

Fuente de variación	<i>g.l.</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Mínimos</i> <i>(media)</i>	<i>cuadrados</i>
<i>Entre grupos</i>	G-1	(entre grupos)	$n'' \sigma^2_a + n' \sigma^2_b + \sigma^2_c$	
<i>Entre poblaciones</i>	p-G	(Entre poblaciones/dentro de grupos)		$n \sigma^2_b + \sigma^2_c$
<i>Entre individuos dentro de poblaciones</i>	2N-p	(entre individuos dentro de poblaciones)		σ^2_c
<i>Total</i>	2N-1	(Total)		σ^2_t

G: número de grupos; p: total de poblaciones; N: número de individuos.

9.2. Distancias genéticas.

En genética de poblaciones una población puede ser definida mediante las frecuencias alélicas de las variantes que segregan en dicha población. A partir de las frecuencias alélicas se calculan distancias genéticas. La interpretación biológica de las distancias genéticas depende del modelo de divergencia utilizado. Son cuatro las fuerzas que pueden modificar la genética de las poblaciones: deriva genética, mutación, selección y migración.

Los modelos para estudiar divergencia entre dos poblaciones que descienden de una población ancestral común varían si lo que se pretende es estudiar la evolución o diferenciación de las especies o de una raza y si las razas a distanciar pertenecen al mismo tronco o sus ancestros llevan mucho tiempo en divergencia. Después de la especiación (el momento en que dos especies se convierten en dos especies distintas), deja de existir migración entre las poblaciones,

por lo que la migración se ignora en los modelos utilizados para el estudio de análisis de evolución o separación de una especie (que supone un distanciamiento de miles de años). En el caso de los distanciamientos de razas, se trata de periodos más cortos (cientos de años) y se consideran evoluciones independientes de las poblaciones. Cuando se utilizan microsatélites, que son neutros, se asume que la selección tampoco afecta a los cambios en las frecuencias alélicas de estos marcadores. Por lo tanto, la diversidad genética observada viene determinada por dos parámetros: deriva genética y, para periodos de tiempos largos, mutación.

La diferenciación genética entre pares de poblaciones son indicadores de su separación en el tiempo. Cuando dos poblaciones se separan, los procesos de selección, mutación y deriva, conllevan a la diferenciación en la frecuencia alélica, en consecuencia, con el tiempo va aumentando la diferenciación de las frecuencias alélicas. Por ello, el estadístico de F_{ST} de Wright (1969), puede ser utilizado como medida de distancia genética ya que considera, a diferencia de las distancias convencionales, la tasa de migración entre poblaciones. Distancias pequeñas pueden indicar que aún existen migraciones o flujo entre las poblaciones o bien que la separación entre las poblaciones es de hace poco tiempo (Slatkin, 1995).

El cálculo de distancias entre razas o poblaciones se basa en el modelo de deriva exclusivamente o en los algoritmos de cálculo de los procesos de mutación y presupone que cualquier alelo tiene la misma oportunidad de surgir.

Existen varias medidas para calcular las distancias genéticas, las más utilizadas son las citadas a continuación (Takezaki & Nei, 1996):

Distancia Estandar de Nei (D_S):
$$D = -\ln \left(\frac{\sum_i x_i y_i}{\sqrt{\sum_i x_i^2 \sum_i y_i^2}} \right)$$

Distancia de Cavalli-Sforza (D_C):
$$D_C = (2/\pi) \sqrt{2 \left(1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i} \right)}$$

Distancia de Nei (D_A):
$$D_A = 1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i}$$

Distancia mínima de Nei (D_M):
$$D_M = \frac{1}{2} \sum_i (x_i - y_i)^2$$

Distancia de Reynolds (D_{Reynolds}):
$$D_{\text{Reynolds}} = \frac{1}{2} \frac{\sum_i (x_i - y_i)^2}{1 - \sum_i x_i y_i}$$

Donde, x_i e y_i son las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y respectivamente.

Para simplificar, las fórmulas se dan para un solo locus. Para ampliar a más loci, se deben sumar todas las distancias para cada locus y dividir por el número de loci cuyos alelos aparecen en las expresiones.

Desde el punto de vista de la evolución, en periodos de tiempo cortos, la D_A es lineal en el tiempo, pero a medida que aumenta la distancia genética por encima de un determinado nivel, esta relación lineal desaparece. Este problema se observa especialmente cuando se utilizan microsatélites con una alta tasa de mutación y un número elevado de alelos.

9.2.1. Medidas de distancias genéticas según el modelo de deriva puro.

Cuando se quieren comparar poblaciones muy relacionadas, el principal factor para describir la variabilidad genética es la deriva genética, porque en espacios cortos de separación las divergencias por mutación resultan insignificantes.

Reynolds et al. (1983) introduce una medida de distancia genética que es la distancia mínima de Nei normalizada con una valoración de la heterocigosis en la población fundadora ($1 - \sum_i [x_i y_i]$).

En estos modelos de deriva puro, los valores de distancia no reflejan la filogenia exacta de las poblaciones estudiadas, porque varía en base al número de generaciones y al tamaño de la población.

9.2.3. Medidas de distancia genética según el modelo de mutación.

Uno de los cálculos más simples de distancia genética se basa en la proporción de alelos compartidos (Bowcock et al., 1994) y puede usarse para medir distancia entre individuos (D_{SA}) (Chakraborty & Jin, 1993). Esta medida de distancia se puede usar también para ver la subestructura de una población (Bowcock et al., 1994).

No existe un consenso general sobre cuál de las distintas medidas de distancia genética es la más apropiada para análisis de poblaciones dentro de especies, como es el caso de razas de animales domésticos y menos aún entre variedades dentro de las razas. No obstante, las correlaciones entre varias medidas de distancia son, generalmente, bastante altas (Nei et al.,

1983), particularmente cuando se aplican a poblaciones locales como es el caso de poblaciones ganaderas. La distancia estándar de Nei (D_s) es la más usada en estudios de evolución genética de poblaciones naturales, mientras que las medidas de distancia basadas en el estadístico F_{ST} de Wright (Reynolds et al., 1983) son más apropiadas para procesos evolutivos a corto plazo como es el caso de divergencia entre poblaciones ganaderas, especialmente si el tamaño efectivo de las poblaciones varía en el tiempo y entre razas. Las primeras distancias D_A , D_S y D_C contemplan los efectos de deriva genética y mutación por lo que son más utilizados en estudios evolutivos, de separaciones largas. Las distancias D_m y $D_{Reynolds}$ tienen en cuenta solo los efectos de deriva y son más utilizados en el cálculo de distancias entre poblaciones más próximas.

En la práctica, se aconseja calcular dos o más distancias genéticas y examinar las similitudes y las diferencias entre ellas, para determinar en qué grado las conclusiones obtenidas dependen de la elección de la distancia genética y saber si los resultados son concluyentes.

9.3. Construcción de árboles de distancia genética.

Las matrices de distancias genéticas contienen toda la información que proporcionan los marcadores genéticos estudiados acerca de las relaciones entre las razas estudiadas, pero estos resultados son difíciles de interpretar sin análisis adicionales. Por ello los datos obtenidos se utilizan en análisis de agrupamiento y se construyen árboles que son representaciones gráficas o dendogramas de los valores de distancias entre pares de poblaciones. La fiabilidad de los árboles obtenidos se examina con un test de replicaciones (Bootstrapping) con 1000 re-muestréos con sustitución de los loci (Felsenstein, 1995).

9.3.1. Árboles de distancias individuales.

Los microsatélites tienen un grado relativamente alto de heterocigosis y muchos alelos para cada locus, por lo que cada individuo puede ser definido de una forma casi inequívoca. Esto hace que puedan construirse árboles filogenéticos usando los individuos como unidades taxonómicas (OTUs), al obtenerse resultados significativos de alelos compartidos entre individuos miembros de las poblaciones estudiadas. Estos árboles se construyen a partir de los valores de la distancia genética D_{SA} (Bowcock et al., 1994).

9.4. Red filogenética (Phylogenetic network).

Son gráficos utilizados para representar relaciones filogenéticas entre diferentes poblaciones y son usualmente empleados cuando las representaciones mediante árboles no son suficientes.

Se distinguen dos tipos de redes filogenéticas, las redes implícitas y las explícitas: las implícitas proveen herramientas para visualizar y analizar señales filogenéticas incompatibles tales como los “split Networks”. Las explícitas proveen escenarios para estudios de evolución tales como hibridación y recombinación (Klopper & Huson, 2008).

Se representa por redes donde cada taxa es representada por nodos y sus relaciones evolutivas son representadas por bordes o líneas paralelas que en filogenética se denominan ramas. Existen varios tipos de redes, que se utilizan según los datos que se pretenden representar, sus combinaciones y las representaciones que se desean obtener: “phylogenetic Network”, “reticulate Networks”, “splits network”, “NeighborNet”, etc.

9.5. Análisis Factorial de Correspondencia (AFC).

El análisis Multivariante es un conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente grupos de datos en el sentido de que hay variables medidas para cada individuo u objeto estudiado. El AFC permite descubrir similitudes entre conjuntos de variables, presentando matrices o tablas de contingencia de frecuencias y valores promedios. Tienen como objetivo encontrar la estructura más sencilla reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información importante. Para realizar esta reducción se simplifica el número de variables a un pequeño número de índices.

Para utilizar los datos genotípicos individuales, cada individuo está representado por su resultado para cada modalidad de cada variable categórica, asignando 0 para la ausencia, 1 para la presencia del alelo en el estado heterocigoto y 2 para el estado homocigoto. El análisis de correspondencia puede condensar la información de un gran número de alelos y loci en pocas variables sintéticas. Con este método las frecuencias alélicas de las poblaciones en todos los loci, se usan como variables y el clúster de cada población se representa gráficamente (Li et al., 2005).

Este sistema se usa para compensar la deficiencia de las reconstrucciones filogenéticas anteriormente detalladas, porque en las representaciones anteriores no se tiene en cuenta los efectos de entrecruzamiento entre las ramas del árbol. Este sistema si permite la representación de las relaciones de un grupo de poblaciones, que han sido objeto de flujo genético de otras externas, aunque no proporciona una reconstrucción tan estricta de la historia evolutiva.

Su representación gráfica es una serie de puntos distribuidos en el espacio formando una especie de nube, donde los puntos representan individuos y sus dimensiones o diferentes distribuciones

espaciales a cada uno de los alelos. El primer eje es el que tiene la contribución mayor a la inercia total. La suma de los ejes indica el porcentaje de información representada.

9.6. Estructura genética de las poblaciones.

Para estudiar la estructura genética de las poblaciones se suele partir de unas agrupaciones o poblaciones predefinidas o razas, que están formadas por un grupo de individuos que presentan unas frecuencias alélicas, que las caracterizan. El grado de relación entre las diferentes poblaciones vendrá determinado por la proximidad de sus frecuencias alélicas.

El método basado en un algoritmo bayesiano (Monte Carlo Markow Chain), asigna a cada individuo a un clúster a partir de la mezcla de individuos o poblaciones con posibles relaciones ancestrales. El modelo de Falush et al. (2003) permite estimar el origen de la región del cromosoma dentro del individuo, proporcionando la posibilidad de un análisis histórico de la diferenciación, divergencia o agrupamiento de los individuos formando nuevos clústers, según el número de agrupamientos que se propongan o consideren e incluso permitirá detectar posibles divisiones o subagrupaciones, dentro de una misma raza o conjunto (Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez, 2013).

Para el análisis de la subestructura de las razas se utiliza un algoritmo bayesiano del programa de análisis STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) que emplea un modelo basado en el método de cadenas Markov de Monte Carlo, que estima la distribución a posteriori de cada coeficiente de mezcla de cada individuo (q). La media de esta distribución representa una estimación de la proporción que el genoma de un individuo tiene de las poblaciones parentales. El algoritmo supone que las poblaciones ancestrales están en equilibrio Hardy Weinberg. Con este programa se hace un análisis de agrupamiento de los individuos estudiados en un diferente número de clústers (K) que representarían el número de poblaciones asumidas utilizando un modelo de mezcla en el cual cada individuo podría contener en su genoma porcentajes variables de las poblaciones ancestrales de las que proviene. Su representación gráfica se realiza mediante el programa DISTRUCT (Noah A. Rosenberg, 2004).

10. Polimorfismo del ADN mitocondrial.

El ADN mitocondrial (ADNmt) fue descubierto en 1963, por Margit M. K. y Sylvan Nass utilizando microscopía electrónica y un marcador sensible al ADN mitocondrial. El ADNmt es un material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares. Este genoma, de aproximadamente 16719 pares de bases (p.b.) en los pavos, codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales, trata del estudio del ADN

que se encuentra dentro de las mitocondrias y ha sido durante mucho tiempo una herramienta útil para identificar la relación matrilineal.

Esta técnica es muy interesante, dado que el espermatozoide aporta pocas mitocondrias al cigoto y por ello se considera que el material genético que posee la cría procede de la madre (Becerra & Paredes, 2000). Puede haber grandes grupos de individuos que comparten el mismo mitogenoma debido a la relación matrilineal que comparten y es distante en comparación con los familiares conocidos, pero mucho más cerca para pares de individuos en la población. Esta variación limitada tiene implicaciones importantes para el uso de ADNmt para ayudar a identificar individuos o establecer relaciones. Se utiliza sobre todo para estudios de diversidad, origen de enfermedades, relaciones ancestrales y datos evolutivos, en la actualidad se han utilizado en pavos para detectar líneas maternas ancestrales del pavo doméstico con el pavo salvaje *Meleagris gallopavo gallopavo* (Mullis et al., 1986; Meadows et al., 2005; Marmi et al., 2007a; Fernando et al., 2009a; Zhao et al., 2011).

10.1. Región D-LOOP o control.

El nombre D-loop se deriva de “bucle de desplazamiento”, que se encuentra en el ADNmt como un punto intermedio de replicación, este segmento del genoma mitocondrial se denomina región de control. La región D-Loop, ocupa 1122 pares de bases y se sitúa entre el gen que codifica para el RNA de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina. En la región control se localizan el origen de replicación de la cadena H, los promotores para la transcripción de las dos hebras (PL y PH), dos lugares de unión de factores de transcripción (Tfam), tres bloques de secuencias conservados asociados con el inicio de la replicación (CSBI, II y III) y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas (TAS) (Coskun et al. 2003; Foran et al. 1988). La región control destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes (Vigilant et al. 1991; Greenberg et al. 1983) y por su elevada variabilidad intrapoblacional. Esta variabilidad se concentra en tres regiones o segmentos hipervariables: HVSI (posiciones 16024-16365), HVSII (posiciones 73-340) y HVSIII (posiciones 438-574) (Lutz et al. 1998; Vigilant et al. 1991).

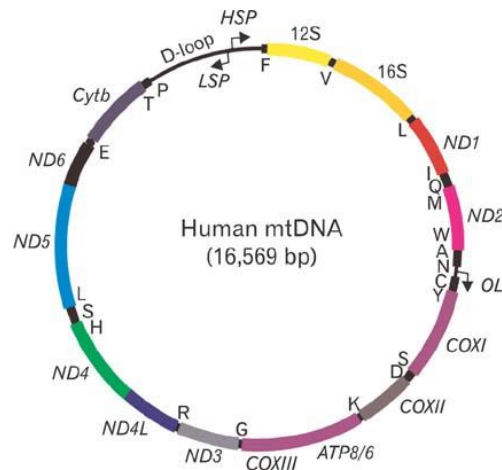


Figura 15.- Región D-Loop de ADN mitocondrial en humanos.

10.2. Índices de diversidad.

Los índices de diversidad proporcionan una medida de la cantidad de variación de una población, siendo especialmente útiles para realizar comparaciones entre poblaciones a grosso modo. Los más empleados en el estudio de la variabilidad del mtDNA de las poblaciones actuales son: el número de posiciones variables (v), el número de haplotipos diferentes (k), la diversidad genética (o haplotípica) de Nei (H), la diversidad nucleotídica (S) y el número medio de diferencias por parejas (S_n).

10.2.1. Distribución de las diferencias por parejas o mismatch distribution.

Otra forma habitual de representar la diversidad mitocondrial es la distribución de las diferencias por parejas, también conocida como “mismatch distribution” o distribución de las “mean pairwise differences”. Este tipo de representación es adecuado para aquellos datos en los que pueden computarse diferencias discretas entre los diferentes alelos, haplotipos en el caso del mtDNA. Las diferencias pueden ser sustituciones de bases, RFLPs o número de repeticiones de microsatélites. En el caso de los haplotipos mitocondriales, las secuencias de una muestra determinada se comparan dos a dos y se calcula el número de diferencias. Por lo tanto, si existen n secuencias en la muestra será necesaria la realización de $n(n-1)/2$ de estas comparaciones. Finalmente se construye un histograma con la frecuencia observada para cada número de diferencias. Además de describir la diversidad de una muestra, estas distribuciones permiten realizar inferencias acerca de la historia demográfica de las poblaciones. Se ha demostrado que los episodios de crecimiento demográfico, de declive o los cuellos de botella sufridos por una población dejan huellas características en la distribución de las diferencias por parejas. Por el contrario, una distribución asimétrica de las diferencias por parejas es indicadora

de una población cuyo tamaño ha sido constante durante largo tiempo (Rogers & Harpending 1992).

10.2.2. Los haplogrupos mitocondriales.

El concepto de haplogrupo fue introducido por vez primera por A. Torroni, D. Wallace y colaboradores a inicios de los 90' (Torroni et al. 1992), podríamos definir un haplogrupo o cluster mitocondrial como una agrupación de haplotipos que comparten ciertas sustituciones diagnósticas (definidas por enzimas de restricción o por secuenciación directa) y que presentan un origen común. Esto implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran. La aplicación de este tipo de estudios en muestras de diferentes continentes por separado reveló la existencia de localizaciones geográficas de los haplogrupos mitocondriales, de manera que podían distinguirse clusters exclusivamente africanos, europeos y asiáticos respectivamente. Esta característica ha resultado ser de extrema utilidad para la inferencia de patrones migratorios dentro y fuera de cada continente. La combinación de los datos de secuencia y de enzimas de restricción de regiones codificantes y no codificantes disponibles, así como el análisis de nuevos marcadores ha llevado a una disección cada vez más compleja de los diferentes haplogrupos mundiales, que queda reflejada en su compleja nomenclatura.

La nomenclatura inicial propuesta por Wallace y Torroni (TORRONI et al. 1992) identifica los clusters principales designándolos con una letra mayúscula (Ej: A, B, C, D, H, I, L, U, V). Los clusters pueden dividirse, a su vez, en sub-clusters que se designan por su letra correspondiente seguida de un número (Ej: L2). Las subdivisiones al nivel siguiente se realizan alternando letras minúsculas y números (Ej: U5a1b). Las líneas que presentan los motivos (del inglés "motif") propios de un haplogrupo pero no los de los diferentes sub-haplogrupos del mismo se designan con un asterisco (*) y habitualmente reciben el nombre de paragrupos en lugar de haplogrupos (Ej: J*). Cuando dos o más haplogrupos previamente definidos comparten una serie de motivos que sugieren un origen común, se tiende a agruparlos uniendo los nombres de los diferentes clados (Ej: HV, JT).

Debido a lo anterior, a medida que se fue acumulando un mayor número de datos de la variabilidad del mtDNA de las poblaciones humanas, los métodos "clásicos" de reconstrucción filogenética se mostraron cada vez menos efectivos y fue necesario el desarrollo de nuevas herramientas específicas para el análisis poblacional de este peculiar material genético. PENNY

et al. 1995 desarrollaron un método que les permitía explorar el espacio de los árboles más parsimoniosos generados a partir de un conjunto de datos.

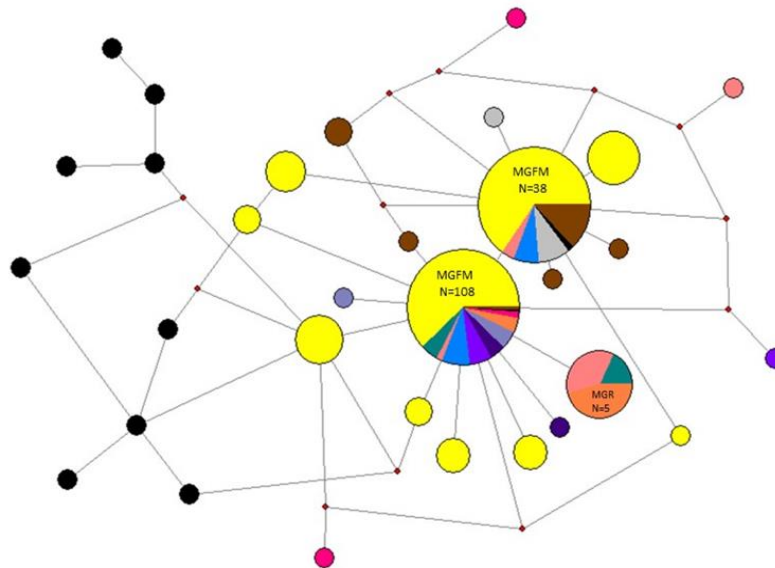


Figura 16.- Red de haplotipos con ejemplos de denominación en los haplogrupos principales.

Sin embargo, la aproximación de mayor éxito fue la de BANDELT et al. 1995. Este método de reconstrucción filogenética –denominado “Método de las redes medias” o “Median Networks”– permite resumir los árboles más parsimoniosos de un grupo de datos en forma de una única red, e informa, además, acerca de la frecuencia de cada haplotipo observado. En este tipo de reconstrucción se identifican las sustituciones homoplásicas y se presentan en forma de puntos reticulares, lo que facilita su interpretación evolutiva

10.2.3 Topología de los networks.

La topología de los Median Networks o Median Joining Networks puede orientar acerca de la historia demográfica de una población determinada. Por ejemplo, las filogenias en forma de estrella con un haplotipo central del que surgen varios haplotipos separados de éste por un único paso mutacional–, son signatures de una expansión poblacional. Este patrón puede explicarse de la siguiente manera: una determinada variante mitocondrial experimenta condiciones reproductivas favorables durante un largo período de tiempo y aumenta de frecuencia. Tras muchas generaciones algunos de los descendientes portadores de este haplotipo adquieren nuevas mutaciones. En algunos casos la variante ancestral se extingue por deriva genética. Si alguno de los descendientes sufre el mismo proceso que la variante inicial, en la filogenia en forma de estrella aparecen subgrupos o sub-clusters (Forster 2004).

10.2.4. Datación de los clusters.

Para la datación de los diferentes clusters se estima el tiempo del ancestro común más reciente (TMRCA, Time of the Most Recent Common Ancestor) de cuantas líneas lo integran. Para ello se consideran aquellos haplotipos relacionados, se calcula su diversidad y se estima el tiempo que ésta ha tardado en generarse con una tasa de mutación determinada. La estima no se corresponde exactamente con el momento en que surgieron las mutaciones que caracterizan a dichos clusters, pues desde ese momento hasta la fijación de dichas mutaciones en las líneas descendientes puede haber transcurrido mucho tiempo.

Entre las medidas de diversidad más empleadas para calcular el TMRCA está el estadístico U (Rho) (FORSTER et al. 1996). La datación mediante este estadístico requiere de la reconstrucción filogenética entre los haplotipos que conforman un cluster determinado, habitualmente en forma de Median networks o Median joining networks.

CAPÍTULO 1

“Tracing worldwide turkey biodiversity using D-loop sequence mitochondrial DNA analysis”

Amado Manuel Canales, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado, Amparo Martínez, Patricia Cervantes, Agueda Pons, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein, María Esperanza Camacho

Animals 2019, 9, (11), 897.

<https://doi.org/10.3390/ani9110897>

Simple summary: The development of new production lines of turkeys has relegated native breeds to a second position. This has increased the need for new research to ensure the conservation of local turkey breeds and the maintenance of biodiversity. The objective of the present study was to identify turkey populations, their origins, and maternal lines through mitochondrial DNA analysis. For this study, mitochondrial DNA samples from 93 turkeys (*Meleagris gallopavo*) were used. The animals belonged to populations in Brazil, Mexico, Spain (Andalusia and Majorca) Italy, Iran, Egypt, and the United States. The haplogroup network that formed suggested that turkey domestic populations group into a single haplotype. However, genetic differences within the haplogroup were found. The present study may provide a better approach for the implementation of conservation strategies for domestic turkey populations.

Abstract: According to recent archeological evidence, turkey (*Meleagris gallopavo gallopavo*) domestication may have occurred in Mexico around 2000 years ago. However, little is known about the phylogenetic and genealogical background underlying domestic turkey populations. This study aimed to further understand the domestication process and identify inter- or intraspecific connections between turkey populations to determine their origins, trace their global expansion, and define the species' genetic value. Ninety-three domestic turkeys (local breeds) were sampled from populations in Brazil, Mexico, USA, Spain, Italy, Iran, and Egypt. Publicly available sequences from previous studies were also included. Standard mitochondrial DNA, genetic diversity, and haplotype network analyses were performed. Seventy-six polymorphic sites were identified. Turkeys from Mexico showed the greatest number of polymorphic sites (40), while turkeys from Italy and Brazil reported only one site each. Nucleotide diversity was also highest in Mexico and the USA ($\pi = 0.0175$ and 0.0102 , respectively) and lowest in Brazil and Italy. Of the six major haplogroups defined, the Mexican and USA populations appeared to have remained more stable and diverse than the other populations. This may be due to conservative husbandry policies in the rural areas of other populations, which have prevented the introduction of commercial turkey lines.

Keywords: *Meleagris gallopavo*; mtDNA; phylogenetic relationships; genetic diversity; populations

1. Introduction

Despite the global economic importance of turkeys (*Meleagris gallopavo*), scientific efforts to understand the genetic diversity of the species have been infrequent. *M. gallopavo* is presumably the only important North-American domestic species of turkey [1]. Geographical

and morphological criteria have been used to identify and describe six subspecies in North American territories [2], namely *Meleagris gallopavo gallopavo* (domestic Mexican subspecies), *Meleagris gallopavo silvestris* (wild), *Meleagris gallopavo mexicana* (Gould), *Meleagris gallopavo intermedia* (Rio Grande), *Meleagris gallopavo osceola* (Florida), and *Meleagris gallopavo merriami* (Merriam) [3]. The Mexican subspecies is generally accepted as the ancestral origin and the only important domestic population from which the other subspecies may have descended. This is due to its particular ability to adapt to tropical and humid climates in North America [1,4], which provided the basis for the successful introduction of the species to southeastern Canada and to the eastern and southern regions of the USA after its reintroduction by British European Pilgrims in 1620 [1].

Mitochondrial DNA (mtDNA)-based molecular studies have been performed on domestic turkey populations in order to trace the history of the extinct wild subspecies, *M. g. gallopavo* [5]. Historical registries have suggested that different prehispanic Mexican groups, like the Teotihuacans, began the domestication of the turkey for the first time between 200 and 700 BC [4]. Considering this context and that the fact that, according to the hypothesis suggested by Flannery [6], Leopold [7], and Schorger [8], an exact time for domestication cannot be clearly identified, the highlands of Michoacan, Mexico have been proposed as the most likely original focus for the species. This is supported by the most likely archaeological hypotheses, based on findings within the Tehuacan Valley (Puebla). Bones dating from approximately 700 AD have also been identified in Guatemala, which suggests the southern expansion of the species by that time [9].

The definition of zoogenetic resources and the characterization of local populations are challenging but necessary when aiming to develop biodiversity conservation policies [10]. In this context, the use of mtDNA sequences in phylogeographical analyses has been extensively explored and has offered a highly sensitive method to analyze the origin and evolutionary processes of different species [1,11].

All the main current domestic turkey varieties descend from the native turkey of central Mexico, which was subsequently imported into Europe during Spanish colonization and was later distributed throughout the extensive Spanish territories. However, it was not until the seventeenth century that turkeys spread across Europe, South America, Africa, and many countries of the Middle East as an alternative to pork. The relationships among wild turkeys have been extensively evaluated, primarily for conservation purposes, using both morphological and mitochondrial molecular tools, such as amplified fragment length

polymorphism (AFLP), DNA markers, and mitochondrial control region analysis by using heterologous primers from the chicken. Mock et al. [2] evaluated the genetic variation among wild turkeys widely distributed in the USA. In their study, molecular analyses revealed relationships among turkeys from distinct geographical regions that were also consistent with earlier morphological definitions of turkey varieties [2].

Differences among turkey varieties have also been investigated at the molecular level using diverse nuclear DNA marker systems [12,13], including microsatellites and single nucleotide polymorphisms (SNPs). mtDNA assessment can explain and provide additional support to the evaluation of distinctions between local domestic breeds and other heritage and commercial turkey breeds (industrial meat production), based on their relatedness [14]. Presently, several studies of turkey characterization are ongoing. For instance, African populations are being characterized based on their external characteristics [15]. However, studies on the genetic background of domestic populations of this species are scarce, with only a few molecular genetic studies reported on domestic turkeys from rural communities in Spain, Mexico, USA, Iran, Italy, Egypt, and Brazil.

The present study aimed to analyze mitochondrial diversity in several domestic breeds of turkey from seven different countries located on four different continents (America, Europe, Asia, and Africa). Original regions and derivate populations were included in the study. Firstly, we analyzed sequences of the mtDNA D-loop region from domestic, commercial, and wild turkeys obtained from GenBank to evaluate their domestication process, shed light on their origin, trace their worldwide expansion, and define the genetic value of the species, thus emphasizing the repercussions of domestication. Secondly, we developed a haplogroup network by analyzing Nei's genetic distances and performing an analysis of molecular variance (AMOVA) to assess inter-and intraspecific global connections between turkey populations.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Blood samples were collected from domestic turkey populations (local breeds) from 2015 to 2018. For each individual, blood samples were taken from the brachial vein, placed in 2 mL vials containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Additional blood samples were then collected on filter paper sheets and were stored at room temperature until further analysis. Samples were deposited in the Animal Breeding Consulting Laboratory at the University of Córdoba, Spain. A total of 93 samples from local domestic turkey breeds

were available for analysis. Eleven samples were collected from rural communities northeast of Paraíba, Brazil; ten samples were from rural communities in Veracruz City, Mexico; ten samples were from Giza Governorate, Egypt; thirty samples were from rural environments in Spain, including eighteen from Andalusia (Sevilla, Cadiz, and Córdoba) and twelve from the Balearic Archipelago (Mallorca); six samples were from a turkey breeding station established in 1983, with birds from northern and northwestern Iran; twenty-two samples belonging to two different breeds were from Italy, with ten samples from the Parma breed and twelve from the Romagnolo breed; and six samples were from Iowa, USA.

2.2. Ethics Statement

Ethical approval was not needed for this study. Blood samples were collected from local turkey populations by qualified veterinarians during their routine practice within the framework of official programs aimed at the identification and health monitoring of the breeds and populations included in the present study. Sample collection did not involve any endangered or protected species. The blood samples were manually collected without injuring the animals, and no other types of tissue (e.g., meat) were used in the present study.

2.3. DNA Extraction and Amplification

DNA was extracted from paper impregnated with blood samples by using a Chelex-100 resin[®] (BioRad, Spain) [16]. The mtDNA D-loop sequence was obtained from Genbank accession number EF153719 (*M. gallopavo* mitochondrion 16,717 bp) [17], and Primer3 software (v0.4.0) [18] was used to design primers (F: 5'-CCAAGGATTACGGCTTGAAA-3' and R: 5'-TCTTCAGTGCCATGCTTTTG-3') to amplify an mtDNA region of 1248 bp. PCR reactions were performed in a total volume of 25 µL containing 1 × PCR buffer (20 mM of Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM of KCl; 1.5 mM of MgCl₂), 200 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 10 pmol of each oligonucleotide, 1 U of MyTaq DNA polymerase (Bioline, London, UK), and 30 ng of DNA. The reaction mixtures were placed in a thermocycler (C1000 Touch; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) under the following amplification conditions: 95 °C for 5 min; 34 cycles of 95 °C for 45 s, 59 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min; and a final extension at 72 °C for 45 min. Amplicon quality was assessed on a 1.5% agarose gel with ethidium bromide, using size (100 bp ladder) and concentration standards. Sufficient amplicon quality was indicated by a single well-defined band of approximately 1000–1300 bp. DNA sequencing was performed by the dideoxy technique on both strands, using a commercial service (Macrogen, Madrid, Spain). In addition to these 93 sequences, we analyzed sequences from wild subspecies

(*M. g. merriami*, *M. g. intermedia*, *M. g. osceola*, *M. g. silvestris*, and *M. g. Mexicana*), domestic birds, and commercial lines (improved turkey breeds for meat production) obtained from the NCBI GenBank database (Table S1), resulting in a total of 542 sequences.

2.4. Genetic Diversity and Differentiation

The sequence editing, alignment, and construction of data matrices were performed using Mega v5 [19] and Gblocks 0.91b [20,21]. The number of haplotypes (H), polymorphic sites (S), and nucleotide (π) and haplotype (Hd) diversity estimates for the domestic populations were calculated using DnaSP v5 [21]. An AMOVA [22] was used to calculate genetic variation and differentiation between populations by performing 10,000 permutations. In addition, F_{ST} (permuting haplotypes among population among groups) values from pairwise comparisons were computed with 1000 permutations using ARLEQUIN v3.1 [23].

2.5. Genealogical Relationships between Haplotypes

To establish genealogical relationships between haplotypes and their frequencies, a haplotype network was constructed using the median-joining method with the software NETWORK v4.6.0.0 [24] under default parameters. The relationships between haplotypes were also analyzed using phylogenetic inference. Matrices for these analyses included haplotypes that were identified in this study and haplotypes for each subspecies that were reported in the NCBI GenBank database (Table S1). The models of DNA substitution were evaluated for domestic and wild populations using Splitstree v4.14.6 software [24].

3. Results

3.1. Sequence Analysis, Genetic Diversity and Differentiation

Ninety-three sequences (620–780 bp long) of the mtDNA D-loop were obtained from the DNA samples of *M. gallopavo* collected for this study. These sequences were registered in GenBank (accession numbers: MK284411-MK284503). Twenty haplotypes were identified within the domestic turkeys, and these all showed overall moderate Hd values and low π values (Table 1). Six haplotypes were identified in domestic turkeys from Mexico. Five haplotypes were detected in birds from Egypt and Iran, with nineteen and eleven polymorphic sites, respectively. These two populations showed high Hd values and moderate π values. In the Spanish populations from Andalusia and Majorca, we detected three haplotypes with five and fourteen polymorphic sites, respectively. Finally, only two haplotypes were identified in the Romagnolo and Parma populations from the Italian and Brazilian populations. Only one polymorphic site was reported

for the Romagnolo and Brazilian populations, which also showed moderate Hd values and low π values.

Table 1. Genetic diversity indices for each population in the study.

Population	N	Tnm	H	Hd	π	S
<i>Egypt</i>	10	19	5	0.844	0.0070	19
<i>Brazil</i>	11	1	2	0.327	0.0005	1
<i>Andalusia (Spain)</i>	18	5	3	0.451	0.0013	5
<i>Iran</i>	6	11	5	0.933	0.0058	11
<i>Majorca (Spain)</i>	12	14	3	0.318	0.0037	14
<i>Mexico</i>	9	40	6	0.833	0.0175	40
<i>Parma (Italy)</i>	10	4	2	0.200	0.0012	4
<i>Romagnolo (Italy)</i>	12	1	2	0.530	0.0008	1
<i>USA</i>	5	16	3	0.700	0.0102	16
<i>Total</i>	93	79	20	0.596	0.0047	76

N: number of individuals; Tnm: total number of mutations; H: number of haplotypes; Hd: haplotype diversity; π : nucleotide diversity; S: number of polymorphic sites.

In the domestic local populations used in this study, we detected three haplotypes, designated as MGDH1, MGDH2 and MGDH3. The dominant haplotype was MGDH2 ($n = 59$), and it was present in 62.76% of the individuals in the population, sharing a maternal line with nine Brazilian individuals, five Egyptian individuals, thirteen Andalusian individuals (Spain), ten Majorcan individuals (Spain), five Mexican individuals, nine Parma individuals (Italy), seven Romagnolo individuals (Italy), and three American individuals (USA). Two domestic individuals from Egypt, four from Andalusia, and three from Iran shared the MGDH1 and MGDH2 haplotypes. Therefore, in the following analyses, they were treated as a single group referred to as “Mundi,” following the premise described by Padilla et al. [1]. Next, to corroborate and strengthen our results, the mtDNA D-loop sequences of additional domestic turkeys (described as *M. gallopavo*) were used to form a group referred to as “Mundi/Domestic.” Sequences of wild individuals reported in the NCBI GenBank database were also included. A summary of the genetic indices for each of the populations studied can be found in Table 2. The total population analyzed ($n = 542$) showed overall moderate Hd values and low π values (Table 2). The “Mundi/Domestic” turkeys showed an Hd value of 0.562 and a low π value. Among the wild populations, diversity levels varied, with the *M. g. mexicana* population showing the lowest Hd and π values. By contrast, the *M. g. osceola* and *M. g. silvestris* populations showed the highest diversity (Table 2).

Table 2. Genetic diversity indices for each population studied.

Population	N	H	S	Hd	π	Tajima's D Value
<i>Mundi/Domestic</i>	273	21	37	0.562	0.00215	-2.38448 (NS, $p < 0.01$)
<i>M. g. merriami</i>	86	14	13	0.724	0.00441	0,69964 (NS, $p < 0.10$)
<i>M. g. intermedia</i>	77	13	13	0.887	0.00574	-0,15106 (NS, $p < 0.10$)
<i>M. g. osceola</i>	8	8	8	1	0.00538	-1,14142 (NS, $p > 0.10$)
<i>M. g. silvestris</i>	77	22	23	0.923	0.00516	-1,57292 (NS, $0.10 > p > 0.05$)
<i>M. g. mexicana</i>	36	6	9	0.352	0.00221	-1,65410 (NS, $0.10 > p > 0.05$)
<i>Total</i>	542	17	56	0.643	0.02442	-2,24320 (NS, $p < 0.01$)

N: number of individuals, H: number of haplotypes, S: polymorphic sites, Hd: haplotype diversity, π : nucleotide diversity, NS: Not significant.

3.2. Analysis of the Internal Genetic Differentiation of the “Mundi” Group

In addition, we analyzed genetic differentiation, including the following external population sequences from Genbank: Oscence turkey samples from Alto Aragon, Spain (OSCE); *M. gallopavo* archaeological (MGA) samples; and samples dating back to 1903, belonging to prehistorical wild *M. g. gallopavo* specimens collected from Veracruz-Llave, Mexico (named 1903). Additionally, we analyzed samples from a commercial line (COMER, meat production turkey,); domestic turkeys from Izabal, Guatemala (GUAT); and domestic turkeys from Michoacan and Puebla, Mexico (DOMEX).

The greatest differentiation in the “Mundi” group was observed between Mexico–Iran, Iran–Brazil, and Romagnolo–Iran turkeys. By contrast, the lowest genetic differentiation values were found between Mexico–Majorca, Parma–Majorca, Parma–Mexico, and USA–Egypt turkeys. The OSCE turkeys showed the highest F_{ST} values of all the populations included in the “Mundi” group. Turkey populations showing the least genetic differentiation were observed between 1903 and Egypt, Andalusia, or the USA; Guatemala and Brazil, Majorca, Mexico, Parma, or the USA; and DOMEX and Andalusia (Spain, Table 3). To corroborate our results, the genetic distances among populations were estimated from mitochondrial sequences using the neighbor-joining method (Figure 1).

Table 3. Pairwise genetic differentiation (F_{ST} —permuting haplotypes among population among groups) of populations.

	MGBra	MGEgy	MGAnd	MG Ira	MGMall	MGMex	MGPar	MGRom	MGUsa	OSCE	MGA	1903	COMER	GUAT
MGBra	0													
MGEgy	0.041	0												
MGAnd	0.138	0.104	0											
MG Ira	0.755	0.148	0.623	0										
MGMall	0.032	0.076	0.082	0.636	0									
MGMex	0.057	0.074	0.098	0.791	-0.013	0								
MGPar	0.040	0.080	0.090	0.662	-0.000	-0.005	0							
MGRom	0.038	0.022	0.309	0.709	0.202	0.268	0.213	0						
MGUsa	0.139	-0.000	0.153	0.288	0.105	0.105	0.090	0.203	0					
OSCE	0.907	0.385	0.853	0.868	0.821	0.940	0.846	0.861	0.570	0				
MGA	0.469	0.321	0.544	0.495	0.455	0.442	0.436	0.485	0.257	0.608	0			
1903	0.302	-0.258	-0.093	0.225	0.097	0.352	0.120	0.311	-0.275	0.893	0.218	0		
COMER	0.443	0.149	0.343	0.020	0.404	0.427	0.399	0.466	0.185	0.511	0.489	-0.163	0	
GUAT	-0.040	0.043	-0.005	0.825	-0.128	-0.116	-0.121	0.200	-0.052	1.000	0.320	0.384	0.337	0
DOMEX	0.103	0.250	-0.023	0.458	0.095	0.067	0.092	0.253	0.219	0.711	0.702	-0.180	0.376	-0.018

MGBra: Brazil, MGEgy: Egypt, MGAnd: Andalusia, MG Ira: Iran, MGMall: Majorca, MGMex: Mexico, MGPar: Parma, MGRom: Romagnolo, MGUsa: USA, OSCE: Oscence, MGA: *Meleagris gallopavo* archeological, 1903: *Meleagris gallopavo* archeological dating back to 1903, COMER: commercial breeds, GUAT: domestic breeds from Guatemala, DOMEX: domestic breeds from Mexico.

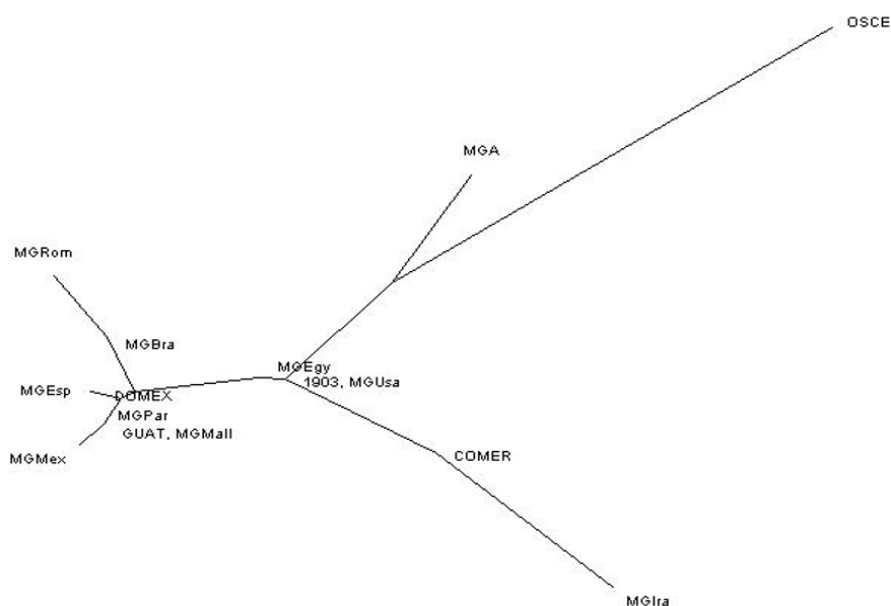


Figure 1. Neighbor-joining distance tree obtained after 5000 bootstrap replicates. MGBra: Brazil, MGEgy: Egypt, MGAnd: Andalusia, MG Ira: Iran, MGMall: Majorca, MGMex: Mexico, MGPar: Parma, MGRom: Romagnolo, MGUsa: USA, OSCE: Oscence, MGA: *Meleagris gallopavo* archeological, 1903: *Meleagris gallopavo* archeological dating back to 1903, COMER: commercial breeds, GUAT: domestic breeds from Guatemala, DOMEX: domestic breeds from Mexico.

We defined two groups of *M. gallopavo*. The first group was divided into the following populations: North America–South America vs Africa, Europe, and Asia. The second group was divided based on a domestication criterion differentiating America, Europe, and Africa–Asia. The distribution of genetic variation obtained using an AMOVA ($p < 0.01$) for the first defined group (North America–South America vs Africa, Europe, and Asia) showed that the genetic variation within populations was higher than the genetic variation within groups (Table 4). However, an appreciable amount of variation was also detected within groups (10.40%). The percentage of genetic variation among populations and the low fixation index indicated that subpopulations were not well differentiated and, hence, the populations comprising the species were not structured. When the population was divided into domestication zone groups, the percentage of genetic variation within populations was 83.66%. A low fixation index value, F_{CT} , and high variation within populations indicated a lack of genetic structure and differentiation among subpopulations (Table 5).

Table 4. Summary of analysis of molecular variance (AMOVA) significant value results ($p < 0.01$) without a priori assumptions, defined by population.

Source of Variation	df	Sum of Squares	Variance Components	Percentage of Variation	Fixation Indices
Among groups	1	32.51	0.12069 Va	7.03	
Among populations/ within groups	3	14.207	0.17839 Vb	10.40	F_{SC} : 0.11182 F_{ST} : 0.17429 F_{CT} : 0.07033
Within populations	538	762.335	1.41698 Vc	82.57	
Total	542	811.794	1.71607		

Group: North America–South America vs Africa–Europe–Asia. Variance for group, Va; variance for population, Vb; variance for haplotypes within a population within a group, Vc; permuting haplotypes among population among groups, F_{ST} ; permuting haplotypes among populations within groups, F_{SC} ; permuting populations among groups, F_{CT} .

Table 5. Summary of AMOVA significant value results ($p < 0.01$) without a priori assumptions, defined by domestication zone.

Source of Variation	Df	Sum of Squares	Variance Components	Percentage of Variation	Fixation Indices
Among groups	2	38.284	0.05577 Va	3.26	
Among populations/ within groups	1	3.104	0.22331 Vb	13.07	F_{SC} : 0.13513 F_{ST} : 0.16336 F_{CT} : 0.03265
Within Populations	539	770.405	1.42932 Vc	83.66	
Total	542	811.794	1.70841		

Groups: “America vs Africa–Asia vs Europe.” Variance for group, Va; variance for population, Vb; variance for haplotypes within a population within a group, Vc; permuting haplotypes among population among groups, F_{ST} ; permuting haplotypes among populations within groups, F_{SC} ; permuting populations among groups, F_{CT} .

3.3. Haplotype Network

We constructed a two-haplotype network to visualize the relationships between haplotypes and their frequencies. The first network consisted of 294 frequencies and included domestic turkeys from Mexico, commercial lines (industrial turkeys for meat production), archaeological samples, and the “Mundi” group. For the second network, 542 frequencies were used, including the “Mundi” group, wild turkeys, commercial lines, and domestic prehistoric and archeological samples (Supplementary Materials Table S1).

The first analysis showed that haplotypes differed from each other by a moderate number of mutations. The network (Figure S1) showed three haplogroups, each one with a dominant haplotype. The biggest haplogroup formed was *Meleagris gallopavo* from Mexico (MGFM) $n = 108$). This group contained eight haplotypes, namely Brazil (nine individuals), Egypt (five individuals), Andalusia (thirteen individuals), Majorca (ten individuals), Mexico (five individuals), Parma (nine individuals), Romagnolo (seven individuals), and the USA (three individuals).

Two domestic individuals from Egypt, four from Andalusia, and three from Iran shared the same haplotype. Most of the domestic turkeys from Brazil, Egypt, Andalusia, Majorca, Italy, Mexico and USA shared the same haplotype and maternal line as the “Mundi” group. This haplogroup comprised Mexican, Guatemalan domestic, and one of the archaeological samples. The second principal haplogroup included eleven “Mundi” haplotypes, which clustered with those obtained from the NCBI GenBank database, comprising 38 individuals related to the dominant haplotype, MGFM (Supplementary Materials Figure S1).

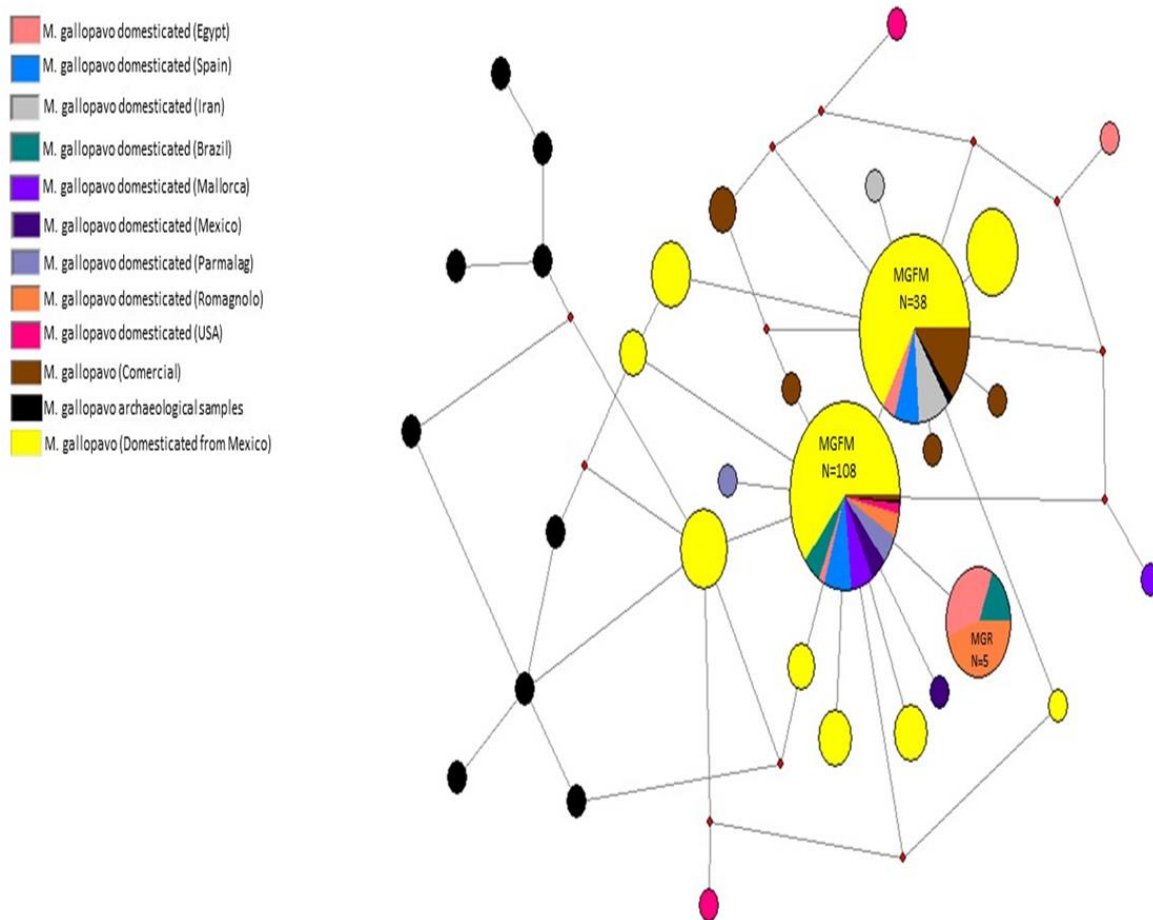


Figure S1. Median-joining haplotype network. The relationships between haplotypes identified in domesticated *M. gallopavo*, including 293 individuals, commercial lines' and arqueological samples; and 31 haplotypes are shown.

The third haplogroup detected contained only “Mundi” haplotypes, with the Romagnolo population being most common. The rest of the “Mundi” haplotypes consisted of unique sequences, with one per population from Egypt, Iran, Mallorca, and Mexico; one Parma individual; and two from the USA. Archaeological samples included in this study separated into unique sequences in the network, as seen in Figure S1.

The second analysis revealed 17 haplotypes that differed from each other by a high number of mutations. The network (Figure 2) displayed six haplogroups. H_1 was the main haplogroup and was composed of 318 individuals and seven haplotypes. The dominant haplotypes corresponded to the domestic samples, with most of the “Mundi” and domestic populations included in this haplogroup. In the periphery of these haplogroups, it was possible to observe seven unique sequences beginning to form. Four of these haplotypes belonged to the “Mundi”

population. Haplogroup H_2 was located between H_1 and H_3 and contained haplotypes from *M. g. merriani* and archeological and prehistorical domestic samples.

Haplogroup H_3 comprised four haplotypes, all of which consisted of individuals belonging to wild *M. gallopavo*. Dominant haplotypes comprised *M. g. merriani* individuals, who shared a haplogroup with *M. g. silvestris*, archeological samples, and *M. g. intermedia*.

Haplogroup H_4 was shared by prehistorical domestic, *M. g. silvestris*, and *Osceola* haplotypes. The H_5 haplogroup showed eight haplotypes and these were linked to H_1, H_3, H_4, and H_6. The main haplogroup comprised prehistoric domestic haplotypes and was shared by domestic and wild turkey populations of the subspecies *M. g. Mexicana*, *M. g. osceola*, *M. g. merriani*, *M. g. silvestris*, and *M. g. intermedia* and archeological samples. Haplogroup H_6 consisted of four individuals belonging to “Mundi” populations (two from the USA and two from Mexico) and *M. g. silvestris* turkeys.

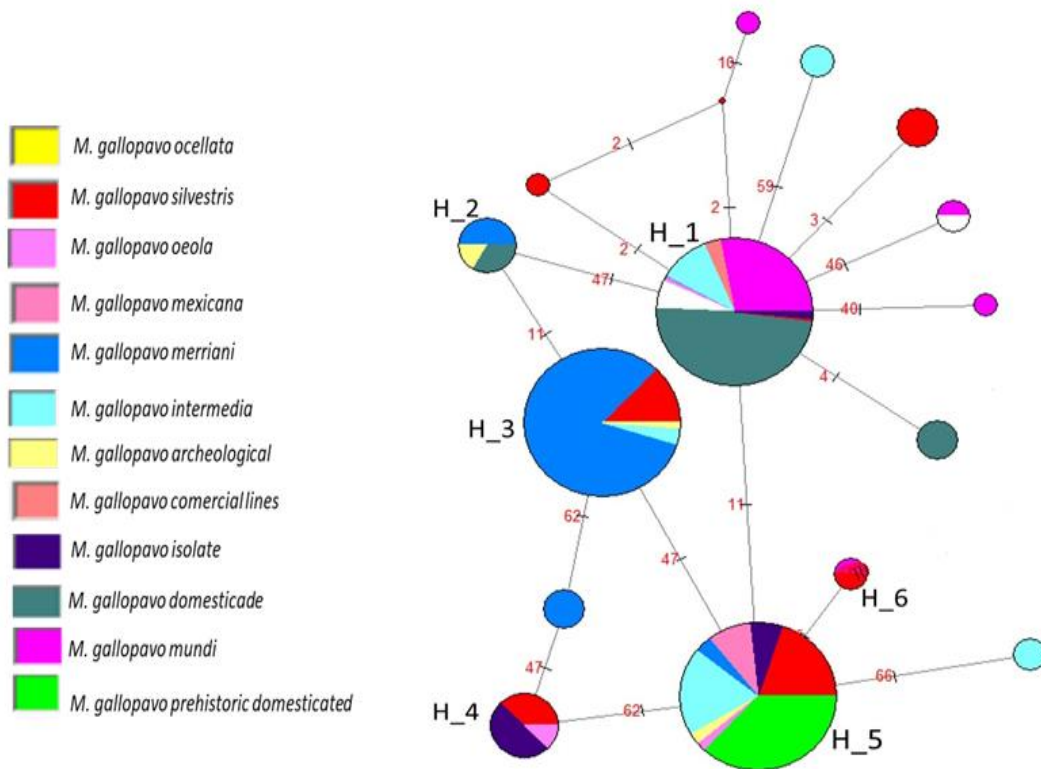


Figure 2. Median-joining haplotype network. Relationships are depicted between haplotypes identified in domestic and wild *M. gallopavo*, including 542 individuals and 17 haplotypes.

4. Discussion

Haplotype diversity represents the probability that two randomly sampled alleles are different, while nucleotide diversity is defined as the average number of nucleotide differences per site in pairwise comparisons among DNA sequences, based on the analysis of generated sequences. The results of the present study suggested a moderate level of haplotype diversity and low nucleotide diversity, which may indicate a period of rapid population growth that enhanced the retention of new mutations [25,26].

The results of the analysis of genetic diversity per population revealed that Mexico and USA populations had high H_d and π values. These results differ from those reported for wild turkey populations from the USA, which have high levels of H_d but low levels of π [1,27,28]. Grant and Bowen (1998) suggested these high H_d and π levels may be ascribed to secondary contact between previously differentiated allopatric lineages or to a long evolutionary history in a large stable population; that is to say that the turkey population belonging to the putative place of domestication should have highest mtDNA variability.

The populations from Egypt and Iran showed high values for H_d and low values for π . This condition is often attributed to an expansion process characterized by a period of a low effective population size and a bottleneck, followed by a rapid expansion [1,26]. Similarly, the findings for the Andalusia and Romagnolo populations showed a moderate value for H_d and a low value for π . This has also been reported by Guan et al. [27] in a Spanish black turkey population. These authors ascribed these values for H_d and π as indicative of populations having originated from a small number of founders. The populations from Brazil and Majorca and the Parma population showed low values for H_d and π .

These findings have normally been attributed to different population dynamics, such as periodic bottlenecks in a region or metapopulation structures within regions, directly caused by the low levels of diversity present in the population [26]. The “Mundi/Domestic” turkey population showed high H_d and π values. These results contrast with those obtained by Padilla et al. [1] who reported moderate values for H_d and low values for π in mixed domestic and commercial turkeys.

4.1. Haplotype Network

mtDNA diversity patterns often reveal historic migration routes that may date back to the dispersal of the first domesticated animals. Genetic variability is expected to decrease with increasing geographical distance from the epicenter of domestication [29,30] unless an

introgression from a wild ancestor species occurred outside the domestication site [30,31]. Qualitatively, the absence of haplogroups in a given region that is still present in neighboring regions indicates a founder effect during or after a gene flow from nearby regions.

Most previous studies dealing with turkey species have only comprised local samples and, hence, have only partially considered haplotype variability. This makes valid conclusions difficult when comparing several international studies. In this context, our study may help clarify such relationships and define turkey mitochondrial haplogroups, since we comprehensively analyzed samples from Mexico and the USA, the countries where the domestication process of turkeys is presumed to have started, but we also included samples from populations in Iran, Egypt, Brazil, Spain, and Italy.

Six divergent groups were identified, but the dominant haplotypes in haplogroup H_1 were the main founding maternal lines of domestic turkeys. On the one hand, since these two maternal lines were detected in individuals from the commercial line and in domestic individuals from Mexico and the USA, these two populations may be the most likely origin of the current highly selected commercial lines. However, the turkey varieties from Andalusia, Majorca, Iran, Egypt, and Italy and the commercial populations may have derived from the wild Mexican population. This suggests that commercial lines may share the same origin and that specific nuclear DNA haplotypes may have been indirectly selected in modern domestic turkey populations.

4.2. Analysis of the Internal Genetic Differentiation of the “Mundi” Group

While population genetic diversity data suggested that Mexico and USA populations were consistently more diverse than the other populations analyzed, in the case of the USA, the high level of divergence between haplotypes may be attributed to secondary contact between previously differentiated allopatric lineages and the stable population settled in the area.

This may have occurred when British Pilgrims brought domestic European turkeys back to eastern North America in the 17th century. These reintroduced birds hybridized with the American eastern wild turkey (*M. g. silvestris*), resulting in the ancestors of the modern commercial turkeys [9].

In Mexico, the high level of diversity may be attributed to the fact that the local population from this area is a large stable population with a long evolutionary history. Domestic Mexican turkeys tended to be among the most diverse populations, while Brazilian turkeys tended to be the least diverse, particularly with respect to mtDNA diversity values. The remaining

domesticated populations showed a general pattern of moderate haplotype diversity and low nucleotide diversity among mitotypes.

Grant and Bowen [26] suggested that such a pattern could be ascribed to a recent expansion from a period in which there was a low population size and where low sequence diversity among mitotypes may have been attributed to a recent coalescence event. In this context, the high nucleotide diversity may be a result of the retention of mutations in an expanding population.

The F_{ST} pairwise values estimated for the nine “Mundi” populations are reported in Table 4. After analyzing the distances between the populations studied, it became evident that Parma and Majorca populations showed no significant genetic differences or variation with respect to the Mexican population. The Egyptian population did not differ from the USA population, which was the population with the second highest nucleotide and haplotype diversity. It should be noted that negative F_{ST} values should be effectively seen as zero values. A zero value for F_{ST} indicates that there is no genetic subdivision between some populations that were included in the study.

By contrast, when Mexican and USA populations were compared, significant differences in diversity were observed. After comparing them to populations outside the haplogroup (OSCE, MGA, 1903, COMER, GUAT, and DOMEX), we can infer that “Mundi” populations had greater variability and were more distant from the COMER, MGA, and OSCE populations. Archaeological samples from populations dating back to 1903 [5] and GUAT and DOMEX populations were shown to differ in terms of their variability and showed a low-to-moderate distance. The population from Iran was the most genetically distant from the rest of analyzed populations, being very close to the COMER populations. This information was inferred from the neighbor-joining tree distance (Figure 1). By analyzing pairwise genetic differentiation and the distribution of genetic variation through the AMOVA analysis, it was possible to observe genetic differences within populations. These results indicated that, although these groups shared common haplotypes and a common maternal line, mtDNA variation in the populations and the proportion of unshared haplotypes in each group was significant and variable [1,32].

5. Conclusions

Our results showed a moderate haplotype diversity and a low nucleotide diversity, which may be attributed to a period of population expansion followed by a period of low effective population. The majority of domestic turkey breeds in Brazil, Egypt, Andalucia, Mallorca, Italy, Mexico, and the USA were seen to share the same haplotype and maternal line. Our results

suggest that turkey populations from Mexico and the USA were historically large and stable populations that occupied a wide geographical distribution ranging from the north to the center of the American territories. These populations then thrived and became stable and more diverse than the other populations over the years. Such success may be attributed to the conservative management practices used in rural areas that did not permit the introduction of commercial lineages or improved crossbred turkeys for production. Turkey populations from rural communities in Andalusia, Majorca, Egypt, Iran, Italy, and the USA consisted of six haplotypes, which has not previously been reported for *M. gallopavo* populations.

CAPÍTULO 2

“Multiplex microsatellite panel for the genetic characterization and diversity assessment of domestic turkey (*Meleagris gallopavo gallopavo*)”

Amado Manuel Canales Vergara, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo

Italian Journal of Animal Science (EN REVISIÓN)

Abstract

Domestic turkey production generally only utilizes a few genetically improved lines, and local breeds are severely endangered. Furthermore, the genetic resources of domestic turkey have not been properly investigated, which could, ultimately, lead to the extinction of local breeds as well negatively affect their corresponding genetic diversity and environmental adaptation. Although several microsatellite markers have been designed for mapping and QTL analysis, there is no standard panel of markers for genetic characterization or genetic diversity assessment. Accordingly, the present study was conducted with the aim to develop a set of polymorphic microsatellite markers that could be used for international turkey population studies. Thirty-nine microsatellites were selected based on information on polymorphism, DNA sequence, and chromosome position. The markers were screened using 105 DNA samples from local turkey breeds from Mexico, the USA, Italy, Brazil, Egypt, and Spain. A total of 401 alleles were identified, with a mean number of alleles per marker of 10.28 ± 4.25 . All microsatellites were polymorphic, with at least 4 alleles and no more than 19 alleles. Furthermore, allelic richness ranged from 3.810 to 17.985, mean heterozygosity ranged from 0.452 ± 0.229 to 0.570667 ± 0.265 , PI values ranged from 0.213 (MNT264) to 0.850 (RHT0024) and the mean Fis value was 0.322. Overall, the panel was highly polymorphic and exhibited moderate Hardy-Weinberg disequilibrium, thereby indicating its value as a tool for biodiversity and population structure studies that could play an important role in promoting the conservation of local turkey breeds.

Keywords: *Meleagris gallopavo*, STRs; biodiversity, power of exclusion.

Introduction

The domestic turkey (*Meleagris gallopavo*) was domesticated in central America at least 782000 years ago, even if recent research suggests a possible second domestication event in the southwestern United States between 200 BC and AD 500 (Thornton et al. 2012). However, all of the main domestic turkey varieties used today are descendants of the turkey raised in central Mexico, which was subsequently imported into Europe during the Spanish colonization of the southern USA and Mexico during the 16th century (Speller et al. 2010). Today, the industrial production of the species is relatively widespread, with numerous genetic lines or varieties, and the species is appreciated for its excellent productive performances, which make it one of the greatest sources of meat worldwide. However, many local breeds still exist, even outside the species' original domestication area in Mexico. In fact, following the expansion of the Spanish

domains, during the 17th century, the turkey was spread throughout Europe and, subsequently, into many countries in the Middle East (Crawford 1992). The conservation of animal genetic resources is a compromise of the countries, and the morphological, functional, and genetic characterization of breeds is an important first step (Alderson 2018). In turkeys there are some studies on the phenotypic characterization at the national level (Adeyemi and Oseni 2018). Microsatellite markers, despite being progressively replaced by single nucleotide polymorphism (SNP) markers, remain a valid tool for assessing the genetic diversity of marginal populations in which the number of individuals necessary to know all the layers of the population is unknown (Vieira et al. 2016) and for which there are no significant genetic resources, as in the bovine species. Microsatellite markers in the turkey genome have been thoroughly studied (Reed et al. 2000; Burt et al. 2003; Chaves et al. 2005). However, the markers have typically been used to develop chromosome and linkage maps or wild species. In addition, only a few studies of biodiversity have been conducted, and only few Short Tandem Repeats (STRs) loci have been tested. Currently, little literature exists regarding the conservation status and biodiversity of local turkey breeds. Colombo (2014) tested the microsatellites recommended by the FAO for chickens and found that 22 of the markers were conserved and informative in the turkey. The aim of the present study was to select and validate a panel of microsatellite markers that could be used for biodiversity studies, paternity assessment, and individual identification in local domestic *M. gallopavo*. The present study represents the first attempt to develop a specific panel of molecular markers that can be used for biodiversity studies of turkey.

Material and Methods

Sampling and DNA extraction Flinders Technology Associates cards-spotted blood (FTA; GE Healthcare, Chicago, Illinois, United State) card- samples were collected from 105 unrelated individuals of several local turkey breeds, including Spanish Black turkey (n=29); Spanish Majorquin turkey (n=7); Italian Romagnolo turkey (n=24); Italian Parma turkey (n=8); Mexican Guajolote (n=12); Egyptian turkey (n=3), Brazilian turkey (n=2), and North American turkey (n=20). DNA was extracted from each blood sample by incubating tree 2mm² punch in 100 µL 5% Chelex resin (Bio-Rad, Hercules, California, USA) suspension at 95 120°C for 10 min and then at 99°C for 3 min. The lysates were centrifuged one minutes at 2000RCF, and the resulting supernatants were stored at -20 °C.

Microsatellite design

A total of 45 loci were selected from existing literature regarding genome mapping and biodiversity assessment in *M. gallopavo* based on 1) distribution in the genome (i.e., among different chromosomes) and 2) sufficient polymorphism in terms of allele richness and heterozygosity, when such information was available. Using the Turkey_2.01 genome assembly (INSDC Assembly GCA_000146605.1, Sep 2010), the loci were located, and 500-bp sequences from before and after the repeated motif were used for primer design. The primer pairs used for PCR amplification were designed using Primer3 v. 0.4.0 (Rozen and Skaletsky 2000) and the following parameters: optimum length of 20 ± 5 bp, optimum melting temperature of $\sim 60 \pm 5$ °C, and GC content of 20–80%. The software was also used to check primers from the literature and, eventually, to modify them, in order to achieve melting temperatures of 57–65 °C, to allow more efficient multiplex PCR, and to achieve minimum and maximum amplicon sizes of 70 and 450 bp, respectively, which is the optimum range of readability for capillary electrophoresis fragment analysis. Finally, the putative primer sequences were checked for hairpin and self-dimerization using the IDT web tool (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) and checked for specificity using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Microsatellite locus amplification

The primers were synthesized by either Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, United States) or Life Technology (Carlsbad, California, USA), with HPLC purification, and labelling was achieved using the M13-tailed primer method (Boutin-Ganache et al. 2001), in which forward primers are labelled with a specific tail (one for each fluorescent-labelled oligos) and amplified in the presence of four complementary FAM, NED, PET, and VIC fluorescent-labelled oligos. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed in three different sets (set one, 14 loci; set two, 15 loci; set three, 10 loci; Supplementary table 1) in 10- μ L reactions that contained 2 μ L Chelex lysate (~ 10 ng genomic DNA), 1X MytaqHS 5X buffer (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany), 0.5 U of MytaqHS Polymerase (Bioline), 0.1 μ M of each fluorescent M13 oligo, 0.22 μ M of each forward M13-labelled primer, and 0.2 μ M each reverse primer. The PCR cycle involved in a two-step protocol: 3 min at 95 °C for Taq polymerase activation, 35 cycles of 95 °C for 30 sec followed by 3 min at a multiplex-specific annealing temperature, and a final extension step of 60 °C 20 min. Each annealing step was checked using the gradient function in a Bio-Rad T1000 thermal cycler (Hercules, CA, USA). The lengths of the microsatellite fragments were visualized using an ABI prism 3130 Genetic Analyzer (Life Technology), POP7 polymer, and GeneScan500-LIZ (Life Technology) as an

internal size standard, and the genotypes were determined using ABI Genemapper 5 (Life Technology).

Statistical analysis

Mean allele richness and mean observed and unbiased expected gene diversity, along with their standard deviations and polymorphic information content (PIC), were obtained using MICROSATELLITE TOOLKIT (Park, 2001). Non-exclusion probabilities considering the first (NE-1P), second (NE-2P), or parent pairs (NE-PP) and individual (NE-I) and sib identity (NE-SI) were estimated using Cervus v. 3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were estimated using Genepop v. 4.0 (Rousset, 2008), whereas F statistics were calculated using Genetix v. 4.05 (Belkhir, 1999).

Results

Microsatellite selection and PCR optimization

Based on amplification efficiency (number of target molecules produced measured as intensity of the fluorescent signal), success rate (absence of amplification failure), and the absence of non-specific amplification, a total of 39 microsatellite markers were selected for the panel: WT83, TUM20, MNT318, RHT0024, MNT374, WT90-2, MNT331, MNT353, WT75, TUM023, MNT288, MNT264, MNT258, RHT0009, MNT361, MNT266, MNT295, MNT391, MNT360, MNT13, MNT247, MNT411, 189MNT274, MNT294, MNT348, MNT393, MNT11, MNT014, MNT297, TUM16, WT77-2, MNT386, MNT282, RHT0216, MNT321, WT54, MNT389, MGP-18, and MNT344. Six dinucleotide markers (MNT296, MNT379, MNT409, RHT0131, RHT0174, and MNT412) were excluded due to the problems described above. The general characteristics of the selected loci along with the corresponding primer sequences and dyes, are presented in Supplementary Table 1. The paucity of information about turkey genetics, especially information about expected allelic range, resulted in unusually large distances between loci. The 39 primer sets were allocated to eight PCR multiplex reactions and to three electrophoresis sets (Supplementary Figure 1). Gradient amplification indicated an optimal hybridization temperature of 59 ± 0.5 °C, based on the band broadness, for all the multiplex reactions, except the WT75 and MNT13 markers (58 ± 0.6 °C).

Marker polymorphism and quality

A total of 401 alleles were identified and a mean number of alleles for marker of 10.28 ± 4.25 . All microsatellites were polymorphic, with at least four alleles (MNT014, MNT288, MNT353, and W77-2) and no more than 19 alleles (MNT274). The number of effective alleles ranged

from 1.283, for MNT264, to 6.784, for MNT247, with a mean of 3.459, and the F_{is} values ranged from 0.168, for MNT11, to 0.929, for MNT360. Meanwhile, the observed (HO) and expected (HE) heterozygosity values were 0.452 ± 0.229 and 0.667 ± 0.265 , respectively (Table 1), and PIC values ranged from 0.213, for MNT264, to 0.850, for RHT0024. Deviations from HWE were observed in 29 of the 39 loci (Table 1).

Power statistics

The non-exclusion probability values are shown in Table 2. The first two values (NE-1P and NE-2P) give the non-exclusion probability when the parents were considered individually (first and second parent of the opposite sex, respectively). In both cases, the MNT264 locus yielded the greatest values (0.975 and 0.882), and the MNT247 locus yielded the lowest values (0.449 and 0.288). When parent pairs were considered, the results were comparable for identity and sibling identity non-exclusion probability, with the MNT264 locus yielding the greatest values (0.975, 0.882, and 0.785, respectively) and the MNT247 locus yielding the lowest values (0.449, 0.288, and 0.120, respectively). The combined exclusion probability (PEC, Table 2) of a marker set indicate the probability of these marker to exclude an erroneous individual, for example a father. In our panel the results showed that in general less than 12 loci are sufficient for any kind of analysis. In particular combined exclusion probabilities considering the first parent (PEC-1P) show that only 12 loci are needed to correctly excluding a wrong individual, in the case of the second parent (PEC-2P) six loci and when parent pairs are considerate (PEC-PP) three. Only two loci would be needed to distinguish an individual in identity test (PEC-I) while seven are necessary for sib identity exclusion (PEC-SI).

The aim of the present study was to construct a polymorphic panel of microsatellite markers that could be used in studies of turkey biodiversity. Accordingly, the proposed panel was established using eight local turkey populations, in order to detect as much genetic variation as possible and to produce a panel that would be useful both for genetic diversity and kinship analysis studies. Using published information about microsatellite loci in turkeys, a panel of 45 microsatellite markers was established, and 39 of these were selected on the basis of their technical quality. Until the present work, only a few studies had used microsatellite markers in turkey (Smith et al. 2005; Lopez-Zavala et al. 2013; Seidel et al. 2013). The mean allele richness values observed in the present study were higher to those reported by Lopez-Zavala et. al. (2013), who investigated seven loci and reported a mean richness value of 9.28. The results of the present study also indicated that the MNT247 and MNT274 loci consistently yielded the greatest number of alleles ($n=19$), in contrast to the results of Burt et. al. (2003) who reported

that the markers only yielded seven alleles in Large White turkey. Meanwhile, the allele richness of the W75 and W77-2 loci in the present study (six and four alleles, respectively) was lower than that reported by Lopez-Zavala et al. (2013), who used the markers for the genetic characterization of domestic and wild turkey populations in Mexico (Lopez-Zavala et al. 2013). However, when compared to the present study, both studies that were previously cited (Burt et al. 2003; Lopez-Zavala et al. 2013), were limited in number of markers and in sample size. In the present study, the analysis of 39 markers revealed a high mean F_{is} value (0.322). Observed heterozygosity (mean 0.452 ± 0.229) ranged from 0.048 (MNT360) to 0.667 (MNT 47), which indicated that the marker panel exhibited relatively low polymorphism (Ott 1992). Indeed, previous microsatellite studies have reported mean H_O values of 0.533 in 144 samples (Lopez-Zavala et al. 2013), whereas Smith et. al. (2005) reported a mean H_O of 0.73 in 94 samples of five varieties of domestic turkeys from the United States. Because studies of turkey genetics are relatively limited it might also be useful to compare the results of the present study with those of studies focused on chickens. For example, Ceccobelli et al. (2015), who studied 16 European chicken breeds, and Granevitze et al. (2007), who studied 64 chicken populations, estimated H_O values of 0.456 and 0.460, respectively, which are very close to the findings of the present study. The expected frequencies of heterozygotes per locus (Table 1) ranged from 0.222 (MNT 264) to 0.857 (MNT 247), and the mean H_E values were generally moderate (0.667 ± 0.1912) but higher than those previously reported in turkey. For example, Lopez-Zavala et. al (2013) reported a mean H_E value of 0.560, which is similar to the H_E value reported by Granevitze et. al. (2007) for chickens (0.520) and lower than that reported to native chickens in Korea (Kong et al. 2006). The Hardy-Weinberg disequilibrium results may indicate the presence of population stratification within a sampled population that can lead to equilibrium deviation. Others factors that contribute to Hardy-Weinberg disequilibrium include selection and inbreeding, in the case of closed populations. In the present study, selection forces could be ruled out because the local breeds are (Granevitze et al. 2007; Blackburn et al. 2011; Montenegro et al. 2015).

In most cases, acceptable combined probabilities for marker sets, in exclusion using codominant markers, should be between 0.997 and 0.9999 (Okada and Tamate 2000; Liu and Yao 2013). Starting from this assumption, considering the first and second parent of the opposite sex (given the genotype of the first parent) with first 12 and nine respectively most informative loci we can exclude the wrong parent (Table 2). The combined exclusion probability for a candidate parent pair tha exhibit an acceptable probability of exclusion, near 100%, already with the four

most informative loci, whereas combined exclusion probability for the identity of two unrelated individuals and combined exclusion probability for the identity of two siblings requires three and six loci, respectively. According to these results, a panel of ≥ 12 of the most informative markers is sufficient for correct parentage and identification analysis in *M. gallopavo*, as previously reported for other farm animal species, like cattle (Schnabel et al. 2000; Stevanovic et al. 2010), chickens (Olowofeso et al. 2016), and horses (Cho and Cho 2004).

Conclusion

In the present study, a large panel of microsatellite markers was developed and confirmed for use in turkey diversity studies. The panel consists of 39 polymorphic loci, which were selected for optimal distribution in the *M. gallopavo* genome and for efficient reproducibility in the laboratory. Statistical analysis indicated a high degree of polymorphism and moderate degree of Hardy-Weinberg disequilibrium, which indicated that the panel was suitable for biodiversity and population structure studies. For the first time, a standardized tool is available for the international meta-analysis of the turkey's genetic substructure at the international level. Also, the PEC results showed that a relatively low number of markers is needed for parentage and identification study.

Table 1: Microsatellite marker panel proposed by the present study.

Locus	Na	Ae	Ho	He	PIC	Fis	HW
MGP-18	11	5.188	0.476± 0.289	0.811± 0.140	0.783	0.414*	**
MNT11	12	2.633	0.519± 0.244	0.623± 0.242	0.571	0.168*	NS
MNT13	12	4.912	0.571± 0.206	0.800± 0.134	0.771	0.287*	**
MNT014	4	2.558	0.420± 0.150	0.612± 0.091	0.542	0.315*	**
MNT247	19	6.784	0.667± 0.283	0.857± 0.082	0.837	0.223*	**
MNT258	11	2.908	0.437± 0.293	0.659± 0.225	0.603	0.339*	**
MNT264	5	1.283	0.144± 0.167	0.222± 0.227	0.213	0.351*	NS
MNT266	16	2.994	0.365± 0.228	0.670± 0.183	0.617	0.457*	**
MNT274	19	3.040	0.356± 0.305	0.674± 0.279	0.639	0.473*	**
MNT282	10	2.360	0.452± 0.175	0.579± 0.187	0.508	0.220*	NS
MNT288	4	2.245	0.437± 0.228	0.557± 0.235	0.495	0.217*	NS
MNT294	7	3.239	0.552± 0.184	0.695± 0.191	0.652	0.206*	NS
MNT295	8	4.075	0.598± 0.244	0.758± 0.270	0.718	0.212*	NS
MNT297	10	2.916	0.419± 0.212	0.660± 0.221	0.625	0.366*	**
MNT318	5	1.682	0.181± 0.178	0.408± 0.265	0.382	0.557*	**
MNT321	13	5.109	0.506± 0.299	0.809± 0.183	0.781	0.376*	**
MNT331	13	6.036	0.640± 0.294	0.839± 0.137	0.816	0.238*	*
MNT344	14	4.272	0.529± 0.291	0.767± 0.252	0.733	0.311*	**
MNT348	10	5.283	0.245± 0.170	0.815± 0.178	0.787	0.700*	**
MNT353	4	1.596	0.305± 0.198	0.376± 0.222	0.345	0.189*	*
MNT360	7	3.013	0.048± 0.056	0.671± 0.297	0.608	0.929*	**
MNT361	11	4.179	0.587± 0.314	0.764± 0.106	0.727	0.234*	*
MNT374	9	2.784	0.408± 0.298	0.644± 0.248	0.593	0.368*	**
MNT386	12	2.497	0.500± 0.336	0.603± 0.296	0.583	0.171*	*
MNT389	15	3.212	0.471± 0.353	0.692± 0.149	0.640	0.321*	**
MNT391	12	2.508	0.439± 0.177	0.604± 0.095	0.533	0.275*	**
MNT393	16	3.725	0.519± 0.280	0.735± 0.200	0.703	0.295*	*
MNT411	13	4.701	0.569± 0.136	0.791± 0.091	0.764	0.282*	**
RHT0009	8	3.778	0.534± 0.255	0.739± 0.093	0.692	0.278*	*
RHT0024	15	6.482	0.480± 0.324	0.850± 0.311	0.831	0.436*	**
RHT0216	11	3.192	0.454± 0.304	0.690± 0.337	0.660	0.344*	*
TUM16	9	2.003	0.346± 0.190	0.503± 0.207	0.459	0.313*	NS
TUM20	17	5.478	0.630± 0.116	0.822± 0.105	0.795	0.234*	**
TUM023	6	3.184	0.550± 0.126	0.689± 0.111	0.637	0.203*	**
W75	6	3.163	0.414± 0.190	0.687± 0.201	0.634	0.399*	**
W77-2	4	2.768	0.510± 0.269	0.642± 0.207	0.568	0.207*	NS
WT54	11	3.119	0.563± 0.121	0.683± 0.094	0.631	0.176*	NS
WT83	4	2.066	0.400± 0.225	0.519± 0.113	0.460	0.229*	*
WT90-2	8	1.994	0.388± 0.216	0.501± 0.265	0.461	0.227*	NS
MEAN	10.282	3.459	0.452± 0.229	0.667± 0.192	0.626	0.322	

Locus, marker name; Na, mean number of alleles; Ae, effective number of alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; PIC, polymorphism information content; Fis, subpopulation fixation Index; HW, Hardy-Weinberg equilibrium; *, p<0.05; **, p<0.01.

Table 2. Non-exclusion probability values of the 39 selected microsatellite markers.

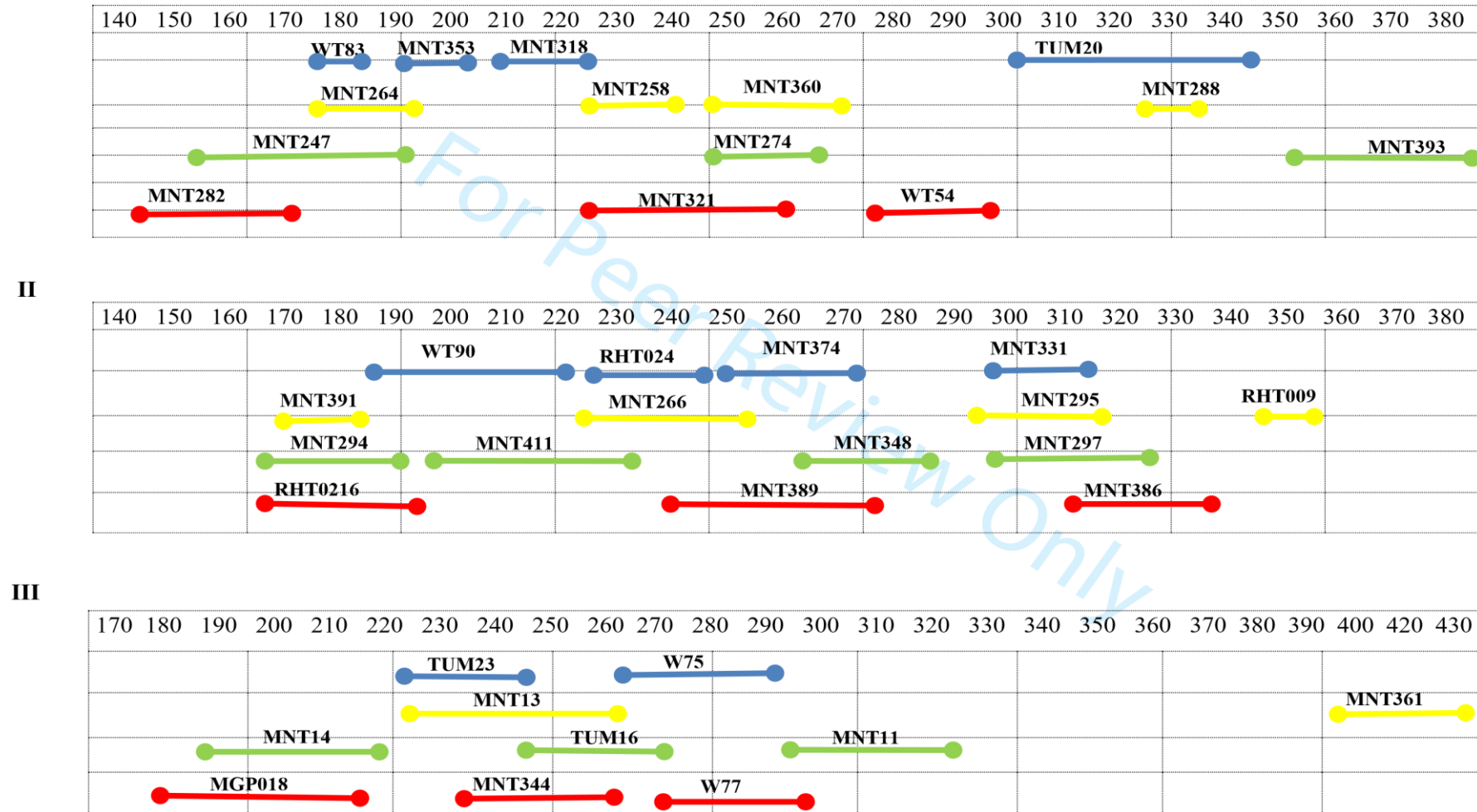
<i>Locus</i>	NE-1P	PEC*	NE-2P	PEC*	NE-PP	PEC*	NE-I	PEC*	NE-SI	PEC*
MNT247	0,449	<u>0,551</u>	0,288	<u>0,712</u>	0,120	<u>0,898</u>	0,037	<u>0,969</u>	0,333	<u>0,667</u>
RHT0024	0,459	<u>0,794</u>	0,296	<u>0,915</u>	0,122	<u>0,989</u>	0,039	<u>0,999</u>	0,337	<u>0,888</u>
MNT331	0,489	<u>0,899</u>	0,321	<u>0,973</u>	0,144	<u>0,999</u>	0,046	1,000	0,344	<u>0,961</u>
TUM20	0,524	<u>0,947</u>	0,351	<u>0,990</u>	0,170	1,000	0,056	1,000	0,355	<u>0,986</u>
MNT348	0,538	<u>0,972</u>	0,364	<u>0,997</u>	0,180	1,000	0,059	1,000	0,359	<u>0,995</u>
MNT321	0,547	<u>0,984</u>	0,371	<u>0,999</u>	0,185	1,000	0,062	1,000	0,363	<u>0,998</u>
MGP-18	0,548	<u>0,991</u>	0,372	1,000	0,189	1,000	0,062	1,000	0,362	<u>0,999</u>
MNT13	0,560	<u>0,995</u>	0,384	1,000	0,196	1,000	0,066	1,000	0,368	1,000
MNT411	0,572	<u>0,997</u>	0,393	1,000	0,200	1,000	0,069	1,000	0,374	1,000
MNT344	0,612	<u>0,983</u>	0,433	0,999	0,238	1,000	0,086	1,000	0,390	0,999
MNT361	0,626	<u>0,999</u>	0,447	1,000	0,257	1,000	0,091	1,000	0,392	1,000
MNT295	0,639	<u>0,999</u>	0,460	1,000	0,272	1,000	0,097	1,000	0,397	1,000
MNT393	0,650	1,000	0,466	1,000	0,263	1,000	0,100	1,000	0,409	1,000
RHT0009	0,671	1,000	0,495	1,000	0,311	1,000	0,113	1,000	0,411	1,000
RHT0216	0,700	1,000	0,513	1,000	0,304	1,000	0,125	1,000	0,438	1,000
MNT294	0,712	1,000	0,533	1,000	0,339	1,000	0,134	1,000	0,438	1,000
MNT389	0,713	1,000	0,545	1,000	0,354	1,000	0,145	1,000	0,442	1,000
MNT274	0,716	1,000	0,535	1,000	0,328	1,000	0,141	1,000	0,450	1,000
TUM023	0,731	1,000	0,560	1,000	0,378	1,000	0,147	1,000	0,444	1,000
WT75	0,732	1,000	0,561	1,000	0,380	1,000	0,149	1,000	0,445	1,000
WT54	0,735	1,000	0,565	1,000	0,382	1,000	0,152	1,000	0,448	1
MNT266	0,736	1,000	0,569	1,000	0,379	1,000	0,161	1,000	0,457	1
MNT297	0,736	1,000	0,554	1,000	0,351	1,000	0,150	1,000	0,459	1
MNT258	0,750	1,000	0,586	1,000	0,401	1,000	0,171	1,000	0,465	1
MNT360	0,755	1,000	0,596	1,000	0,425	1,000	0,171	1,000	0,459	1
MNT374	0,760	1,000	0,593	1,000	0,404	1,000	0,177	1,000	0,474	1
MNT386	0,773	1,000	0,582	1,000	0,362	1,000	0,177	1,000	0,494	1
MNT11	0,783	1,000	0,619	1,000	0,437	1,000	0,194	1,000	0,488	1
WT77-2	0,794	1,000	0,647	1,000	0,494	1,000	0,202	1,000	0,481	1
MNT391	0,801	1,000	0,659	1,000	0,491	1,000	0,227	1,000	0,506	1
MNT014	0,811	1,000	0,664	1,000	0,509	1,000	0,220	1,000	0,500	1
MNT282	0,822	1,000	0,683	1,000	0,523	1,000	0,248	1,000	0,524	1
MNT288	0,845	1,000	0,700	1,000	0,547	1,000	0,258	1,000	0,537	1
TUM16	0,864	1,000	0,714	1,000	0,548	1,000	0,291	1,000	0,572	1
WT90-2	0,864	1,000	0,710	1,000	0,540	1,000	0,289	1,000	0,573	1
WT83	0,866	1,000	0,726	1,000	0,577	1,000	0,290	1,000	0,564	1
MNT318	0,913	1,000	0,770	1,000	0,616	1,000	0,377	1,000	0,641	1
MNT353	0,928	1,000	0,800	1,000	0,666	1,000	0,421	1,000	0,668	1
MNT264	0,975	1,000	0,882	1,000	0,785	1,000	0,615	1,000	0,793	1

NE-1P, non-exclusion of one candidate parent; NE-2P, candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex; NE-PP, candidate parent pair; NE-I, identity of two unrelated individuals; NE-SI, identity of two siblings; PEC, combined exclusion probability calculated using the Jamieson formula (Jamieson 1994); markers needed to reach the target combined probability of 0.999 are in bold and underlined.

Supplementary Table 1: Total primers pair designed in available scaffold sequence of *Meleagris gallopavo gallopavo*. Locus, name of the microsatellite's locus; AC, NCBI Access number; Forward and Reverse primers of selected locus; RG, range of amplification; CH, Chromosome location; TM, primer pair melting temperature; DYE, fluorescent molecule used; MX, PCR multiplex set, Reference.

Locus	AC	Forward	Reverse	RG	CH	TM	DYE	Reference
WT83	AF111574	GAAGAGCTGCAGGTGAGGT	GAGCATGCCTAAGTTGAAGCT	177-184	5	59 °C	FAM	Smith,E.J. et. al. (1998)
TUM20	U79311	ACACGACCAGAAACAGACCA	TGAGCAGTTCCTGTGTAGGACA	300-345	1	59 °C	FAM	Huang,H.-B. et. al. (1996)
MNT318	AY552888	GCTCACGCTGTCTGAAAGAT	GCCCTTTCAGTACTGACTTCC	205-221	1	59 °C	FAM	Knutson,T.P. et. al. (2004)
RHT0024	AL592602	ACTGGTGAGTGAAATGGGGT	TGATCAATTCAGGACGGGGA	227-249	12	59 °C	FAM	Burt,D.W. et. al. (2003)
MNT374	AY552942	TGGTAGGCAAAAGGAAGCAG	TCAAACGTGATCTGTTGGAG	250-270	3	59 °C	FAM	Knutson,T.P. et. al. (2004)
WT90-2	AF111645	CCTATTGTTCCCATTTGCG	CACACTCACACACACACACC	187-224	-	59 °C	FAM	Smith,E.J. et. al. (1998)
MNT331	AY552901	CTGTGGATGTCAAGCCCATG	AGTCTGTGGTAGTCTGCAGC	299-314	13	59 °C	FAM	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT353	AY552923	AAGGCATGACTTTTGGAGCC	TGTGCATATATTAGTTGGGTGG	190-202	6	59 °C	FAM	Knutson,T.P. et. al. (2004)
WT75	AF434907	ATGAGCAAGTAGGAAGGCTGT	CGAGCTTTGGTATTGGCTGG	260-290	2	58,6 °C	FAM	Smith,E. et. al. (2001)
TUM023	U79332	GCAGTTGGTTCATGTTCCCC	AGAGTCTCGGATTGCGACC	222-248	1	59 °C	FAM	Huang,H.B. et. al. (1999)
MNT288	AY552860	TGTAAGCACAGTGAGGCAGA	GGCAACTCTAGTCATCAGAAATC	326-334	6	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT264	AY552836	CAACACTTGTGCCAGCTCTG	CTTTCACACCTGCAGCATT	179-192	10	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT258	AY552830	GCATTACTTTCAGAGCTGCCT	GTCTATCCGGGACCCAAACT	226-240	2	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
RHT0009	AL592578	CGAGTTGATCAGAGGAGAAACAC	TTTCTGACTGTTCCACGCTG	342-352	22	59 °C	NED	Burt,D.W. et. al. (2003)
MNT361	AY552930	TGCACCTAAAGAAGTACAGGGA	TCTCACATCCTCCACCCAAC	397-430	29	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT266	AY552838	TGGTCTTTTGTCTCCCCTATT	CCTTATCTAGTCTTAGTGCAGCC	226-258	8	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT295	AY552867	AAGGACTATTCAGCACACCAGA	AGAATGGCCAGCAAACAAAC	297-316	-	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT391	AY552959	ATGGCCATCCCCTGAAAGATT	AACAGTTTTCATACACCCAGCC	170-186	3	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT360	AY552929	CACACTACGTTTTGTGCTGC	TGCTAACATGTGGCTGGAAT	249-270	-	59 °C	NED	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT13	AF482372	GTTGACTTGACTCGCTCAGC	GGGGATGCTGAACTGTGTTG	233-268	-	58,6 °C	NED	Reed,K.M. et. al. (2002)
MNT247	AY552819	GGAAACAACCTTGAGCCATTCC	TCAGGCCTCACTTCTTTATGAA	154-194	4	59 °C	VIC	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT411	AY926544	GCTAACTGCACCTTAATTGGGAAG	CATGTTTGGAGAAATCCAGTCTC	199-232	21	59 °C	VIC	Chaves,L.D. et. al. (2006)
MNT274	AY552846	CTGCCAGTGGAGAAGGATCT	GCCTACTTTACTGTTTGTGATATGG	249-265	5	59 °C	VIC	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT294	AY552866	TTCTGCCACTTCTCCCCTAC	GCTCTGCAGTAGGTTTGTGG	165-193	17	59 °C	VIC	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT348	AY552918	AGTTTGTA AAAATGGGACCAAAGG	ACAGGATAGGAGTGTAGCTGA	262-282	-	59 °C	VIC	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT393	AY552961	CCGTGTGTTCTGATGTAACA	GGAGCTGGGGTATGCGTG	350-385	5	59 °C	VIC	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT11	AF482370	GCCCTCGAGTATTAGCCACTC	TTTCTGACACAGGTACAAGGAAAC	296-321	10	59 °C	VIC	Reed,K.M. et. al. (2002)
MNT014	AF482373	AAGAACTGGTGATTGCTTTCCA	CATTAATGAGAGCGTGTATGGGG	190-220	1	59 °C	VIC	Reed,K.M. et. al. (2002)
MNT297	AY552869	GGTTAGTTACTGCTTCTTCTGT	TGTCCTCCTAAGTGCCTGTT	299-321	4	59 °C	VIC	Knutson,T.P. et. al. (2004)
TUM16	U79309	AGAGACCCACCAAGTGTTTTCT	GTCTCACCATCCTCACCTTGT	244-270	-	59 °C	VIC	Huang,H.B. et. al. (1999)
WT77-2	AF434908	GTTTGATCGGGTCTCGGAGA	GCAGTGCAGGGGTTTATG	269-295	-	59 °C	PET	Smith,E. et. al. (2001)
MNT386	AY552954	GCACCCAAACCTTATCCTGT	ACATCACTGGGAAATCTTTTGC	312-336	13	59 °C	PET	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MNT282	AY552854	GGCATCACACAGCCATTAGC	TGCTAGGAGGGGAGAAAGAA	144-180	26	59 °C	PET	Knutson,T.P. et. al. (2004)
RHT0216	AL593080	GGGTTCCAGAAAGACCAAGC	GTGCTCCTCCATGTCCAAC	165-197	7	59 °C	PET	Burt,D.W. et. al. (2003)
MNT321	AY552891	TGATTTGCTCATCGACTTGCA	CGCGAGTGAATGCTTTGTGA	228-260	-	59 °C	PET	Knutson,T.P. et. al. (2004)
WT54	U79330	CATCCATCCTGTGTCTCCA	ACAGTGTACAGATTCCCCTT	278-296	19	59 °C	PET	Huang,H.-B. et. al. (1999)
MNT389	AY552957	TCTATGGAAGACAGGAAACAGGA	TTTGTCACTGCCACACACAC	240-274	8	59 °C	PET	Knutson,T.P. et. al. (2004)
MGP-18	DQ497634	AGGAATGGTTCAGAGGCAGG	TCTGGGAAGAAGTGAGCAGG	177-214	2	59 °C	PET	Kovacs,B. et. al. (2010)
MNT344	AY552914	GCTGAATGTTTCAGGCGAAA	TGACTTTTGTGTGCGAGTT	235-261	4	59 °C	PET	Knutson,T.P. et. al. (2004)

Supplementary Figure 1. Electrophoresis set up of the thirty-nine *Meleagris gallopavo gallopavo* microsatellites based on allelic range and fluorescent dye for ABI G5set. Blue=FAM; Green=VIC; Yellow=NED; Red=PET; LI= ORANGE (internal ladder).



CAPÍTULO 3

“GENETIC CHARACTERIZATION OF THE DOMESTIC TURKEY OF MEXICAN BACKYARD”

*Canales, A.M.; Landi, V.; Martínez, A.M.; Macri, M.; Delgado J. V.; Cervantes, P.; Hernández, A.;
Pizarro, G.; Camacho, E..*

Archivos de zootecnia vol. 68, núm. 264, p. 487

Abstract

The Mexican backyard turkey, is a native breed in danger of extinction, at present the habit of conserving the native genetic resources of each population has been lost, trying to cross animals with commercial lines for the production of turkey meat, damaging and losing the genetic stock of native turkeys in México. The objective of this work is to carry out the genetic characterization of the Mexican transfer turkey using microsatellites and to study the possible genetic structure of this population. A panel of 38 microsatellites is analyzed in 51 samples of transfer turkey, taken from different areas of the city of Veracruz, México. The main parameters of genetic diversity have been evaluated: expected and observed heterozygosity, number of alleles, F statistics and Correspondence Factor Analysis using the GENETIX software. Genetic distances between individuals (DSA) with which a dendrogram has been constructed using the POPULATIONS program are calculated. The tree is displayed with the TREEVIEW program. The genetic structure is studied with the STRUCTURE program. All microsatellites used polymorphic results, with a minimum of 2 alleles found on the MNT 264 microsatellite and a maximum of 14 alleles on the MNT274 and RHT024 markers, with an average number of alleles of 6.79. The average values of H_E and H_O are 0.619 and 0.620 respectively. The following F statistics show the following values in the total sample: F_{IS} 0.128 ($P < 0.05$), F_{IT} 0.152 ($P < 0.05$) and F_{ST} 0.027, ($P < 0.05$). The characterized backyard turkey population does not have genetic substructures.

Keywords:

Native breed, Microsatellites, Alleles, genetic substructure

Introducción

El pavo actual o *Meleagris gallopavo* evolucionaron de un ancestro que cruzó el estrecho de Bering cuando Alaska estaba conectada con Eurasia (Steadman 1980). Los principales descubrimientos fósiles de antecesores de los guajolotes se han hallado en el sur de los Estados Unidos y en el norte de México, los restos fósiles más antiguos que se han encontrado son de la época Pleistoceno, se menciona que el extinto pavo de California *Meleagris californica* (Cracraft 1968; Miller 1940), el cual estuvo aislado en California durante el Mioceno, posee un alto grado de similitud con *Meleagris gallopavo*, lo que sugiere que ambas especies tuvieron una presión de selección semejante. Se menciona que durante el Pleistoceno el género *Meleagris gallopavo* fue importado al suroeste de Estados Unidos desde Mesoamérica, siguiendo la misma ruta de dispersión de los cultivos y posteriormente diseminado por todo

México. Se tiene documentado que su domesticación empieza en México entre los años 200 y 700 AC, por culturas prehispánicas, fueron los mayas los primeros en domesticar al guajolote salvaje o pavo, casi dos mil años antes de los aztecas. Los pueblos mesoamericanos, los Olmecas, Chichimecas, Totonacas, Zapotecas, los Teotihuacanos, los Toltecas y por últimos los Aztecas, es con ellos donde cobro mayor importancia la cría de esta especie.

Al pavo (*Meleagris gallopavo*) en México se le denomina guajolote, ya sea silvestre o doméstico, en la península de Yucatán es conocido como pavo de monte o guajolote, que junto con el género *Meleagris* pertenecen a la familia *Meleagridae*; ambos géneros tienen su origen en territorio americano (Steadman 1980). Además del termino guajolote, en México existen más de 30 términos diferentes para denominar popularmente a los pavos, en algunos lugares todavía se usan términos como: bimbo, cóbori, cócono, conche, chumbo, chompipe, gallina de la tierra, ganso, guajolote, guanajo, guaraca, güilo, güijolote, jolote, momaco, pavo, picho, pípilo, pisco, tocayo, totole, torque, tunto, gallo de papada, gallipavo, pavipollo, gallina de la sierra, cune, total, totoli, colunos, pili, güecho, huacholo (Hernández- Sánchez 2006; Kiddle 1941), sin contar la denominación propia de cada una de las 62 lenguas indígenas que aún se conservan en México; como ejemplo, tan sólo en la región de la costa de Oaxaca, además del Castellano se usa la lengua mixteca que denomina “colo” al pavo, en idioma zapoteco “verté” y en dialecto chatino “pií”(Hernández-Sánchez 2006).

En México existen varios sistemas de producción de *Meleagris gallopavo* (MG) para abastecer el mercado nacional e internacional, pero el más común en las zonas rurales es el sistema de traspatio, que se refiere a la crianza de pavo domestico que se asocia a la explotación agrícola rural, con métodos tradicionales y en instalaciones rusticas que aprovechan el propio entorno de la vivienda y la participación de la familia (Díaz 1976; Jerez Salas, Herrera Haro & Vásquez Dávila 1994). La crianza del guajolote la realizan productores rurales y grupos indígenas, los cuales han preservado el sistema tradicional de crianza del guajolote autóctono, cuya calidad de carne y preferencia en la cocina mexicana forman parte del patrimonio cultural de la población rural del país, su explotación se ha desarrollado en perfecta armonía con las aves locales de corral, alimentándose con pequeñas cantidades de granos de maíz, desperdicios de cocina, insectos, gusanos y residuos de la alimentación de otras especies (Camacho-Escobar et al. 2014).

En México, se han realizados pocos estudios relacionados con la conservación de especies avícolas, y estos generalmente describen a los diferentes tipos de animales en forma muy general, debido a que no realizan mediciones directas al animal, sino más bien se basan en preguntas y respuestas tipo encuesta directa con el productor. Aun cuando es una especie económicamente importante, se desconocen muchos aspectos genéticos, características únicas y posible proyección a futuro

El objetivo del presente estudio es realizar la caracterización genética del guajolote autóctono criado en sistema de traspatio en varias regiones del Estado de Veracruz, mediante el uso de microsátélites con el fin de estudiar la posible estructura genética de esta población para la conservación de recursos avícolas autóctonos.

Materiales y Métodos

Para el estudio de diversidad se han analizado muestras de pavo domestico de traspatio (pavo autóctono), obtenidas de diferentes propietarios del Estado de Veracruz, México, de diversas zonas rurales. Para el estudio se incluyen 14 muestras de la zona rural de Paso de Ovejas, 2 muestras de la zona de Medellín, 2 muestras de la zona rural de Mata de Uva, 5 muestras de la zona de Pasto del Toro y 18 muestras de zonas rurales de Acayucan. Las muestras de sangre se han recogido en papel absorbente, cada muestra ha sido debidamente identificada y guardadas en el laboratorio Animal Breeding Consulting sl. Se extrajo el ADN de cada muestra de sangre incubando 3 perforaciones 2 mm² de circunferencia de papel de filtro impregnado con sangre en 100 µL de una solución de agua al 5% de resina Chelex (Bio-Rad, Hércules, California, EE. UU.), se procedió a incubar el producto a 95° C durante 10 min y luego a 99 ° C durante 3 min. El lisado se centrifugo un minuto a 2000 RCF, y el sobrenadante resultante se almacenó a -20 ° C.

Se han amplificado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 38 microsátélites, de los cuales se tomaron de referencia de un panel sometido y en revisión para el estudio de diversidad en pavos (Canales A.M et al. sometido) : MGP018, MNT011, MNT013, MNT014, MNT247, MNT258, MNT264, MNT266, MNT274, MNT282, MNT288, MNT294, MNT295, MNT297, MNT318, MNT321, MNT331, MNT344, MNT348, MNT353, MNT361, MNT374, MNT386, MNT389, MNT391, MNT393, MNT411, RHT009, RHT024, RHT216, TUM016, TUM020, TUM023, W075, W077, WT054, WT083 y WT90. Para la Reacción de cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron los protocolos de amplificación utilizados por Canales A.M et al. 2019, en el que se amplifican 3 geles diferentes (gel 1, 14

microsatélites, gel 2, 14 microsatélites y gel 3, 10 microsatélites) en reacciones de 10 μ L que contenían 2 μ L de lisado de Chelex (20 ng de ADN genómico), 1X MytaqHS 5X buffer (Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania), 0.5 U de Mytaq HS Polymerase (Bioline), 0.3 μ M de fluorescencia de la cola M13 correspondiente a cada oligo, 0.22 μ M de cada cebador marcado con cola M13 y 0.6 μ M cada cebador revers.

El protocolo de PCR consiste en dos pasos: 3 minutos a 95 ° C para la activación de la Taq polimerasa, 35 ciclos de 95 ° C durante 30 segundos seguidos de 3 minutos a la temperatura de hibridación específica de cada una de las múltiplex diseñadas, y una etapa de extensión final de 60 ° C 20 min. Para realizar la separación por tamaños de los fragmentos obtenidos mediante PCR se han sometido éstos a una electroforesis en un secuenciador capilar ABI 3130XL (Life Technologies, Foster City, CA, USA) con polímero POP7 y ocupando el estándar de tamaños GeneScan500-LIZ (Life Technology). El análisis de los fragmentos y la tipificación alélica se ha realizado mediante los programas informáticos Genescan Analysis® 3.1.2 y Genotyper® 2.5.2. Se ha calculado el número medio de alelos por locus (MNA), la heterocigosis esperada (H_e) y observada (H_o) y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) utilizando el software MICROSATELLITE TOOLKIT de Excel (Park, 2001). El número efectivo de alelos se ha calculado con el programa POPGENE v1.32 (Yeh et al. 1997). El coeficiente de diversidad genética intrapoblacional (F_{IS}) con un intervalo de confianza del 95% después de 1000 iteraciones se ha calculado utilizando el programa GENETIX v4.04 (Belkhir & Borsa) y se ha realizado una prueba de equilibrio Hardy-Weinberg con la corrección de Bonferroni con el programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski, Taper & Marshall 2007).

Se ha realizado un estudio de estructura genética para determinar si hay subpoblaciones en las zonas que se muestrearon, para ello, se ha realizado un Análisis Factorial de Correspondencia con el programa GENETIX v4.04 (Belkhir & Borsa) y se han calculado las distancias genéticas entre individuos (Bowcock et al. 1994) con las que se ha construido un dendrograma utilizando el programa POPULATIONS v1.2.28 (Langella 1999). El árbol se ha visualizado con el programa TREEVIEW (Page 1996). Se ha realizado un análisis de la estructura de las cuatro variedades utilizando un algoritmo bayesiano del programa de análisis STRUCTURE v 2.1 (Pritchard, Stephens & Donnelly 2000).

Resultados

Los resultados de los parámetros de diversidad genética de los pavos de traspatio que se recolectaron por marcador, están recogidos en la Tabla I. Todos los microsatélites han resultado polimórficos, encontrándose un mínimo de 2 alelos en el microsatélite MNT 264 y un máximo de 15 alelos en el microsatélite MNT247, con un número medio de alelos de 6.79. El número efectivo de alelos oscila entre un mínimo de 1.17 en el marcador MNT 294 y un máximo de 6.28 en el MNT 247, con valor promedio de 6.28. La heterocigosidad esperada más alta la presenta el marcador RHT024 con un valor de 0.892 y la más baja el MNT294, con un valor de 0.147 (Tabla I). Los valores de heterocigosidad observada oscilan entre un máximo de 0.740 para los marcadores MNT393 y un mínimo de 0.118 para el MNT294. De los 38 marcadores amplificados 24 son muy informativos a la hora de detectar variabilidad genética en las poblaciones de pavo de traspatio, con valores de PIC superiores a 0,50. El resto de los marcadores han resultado ser medianamente informativos en esta población y presentaron valores de PIC entre 0,25 y 0,50, solo un marcador MNT294 fue poco informativo con un valor de 0.138. Dos marcadores se desvían significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg tras la corrección de Bonferroni. El coeficiente de diversidad genética intrapoblacional (F_{IS}) muestra que 28 marcadores detectan un exceso de homocigotos significativos. El valor medio de F_{IS} de los microsatélites utilizados es de 0.166 y es significativamente diferente de cero, lo que indica que el pavo autóctono de traspatio muestra una desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. Los estadísticos F muestran los siguientes valores en el total de la muestra: F_{IS} 0.128 ($P < 0.05$) F_{IT} 0.152 ($P < 0,05$) y F_{ST} 0.027 ($P < 0.05$) como se observa en la tabla II.

Estructura genética del pavo autóctono de traspatio mexicano

En el análisis factorial de correspondencia se observa que en el eje 2 y en el 3 se separan las poblaciones de Acayucan, en el eje 2 se separan las poblaciones de Medellín y Mata de uva. En el eje 2 las poblaciones de Paso de Ovejas y Mata de Uva se agrupan en un solo grupo (Figura 1).

En el árbol de distancias individuales (Figura 2) cada individuo se representa por una línea y se observa que no es posible diferenciar agrupamientos en función a las zonas rurales, aunque si se observa que los individuos de la población de Acayucan se agrupan mejor que el resto.

Los resultados del programa Structure se encuentran en la Figura 3. El análisis se ha realizado con 300000 iteraciones de Burning y con número de interacciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) de 600000. Cada zona rural se muestra en una barra vertical y cada color

representa la proporción del clúster correspondiente en forma proporcional. El $K=4$ Según Evanno, Regnaut and Goudet (2005), es el k óptimo (Figura 4) y se puede observar que las poblaciones no se encuentran estructuradas, solo la población de Acayucan está un poco uniforme.

Discusión

Los 38 marcadores obtuvieron una H_O mayor a 0.1, según Ott (1992), un locus es polimórfico cuando H_O es superior a 0.1 y altamente polimórfico si es superior a 0.7, se observa que la media de la H_O (0.620) supera a 0.1 indicando que los microsatélites que se ocuparon para este estudio son polimórficos, estudios previos en pavos han reportado H_O por locus de 0.533 en 144 individuos (López-Zavala et al. 2013), 0.09 en 94 individuos en cinco variedades de pavo domesticados en Estados Unidos (Smith et al. 2005), en otros estudios de otras especies animales como en gallinas, se han reportado valores de 0.456 en 15 poblaciones (Ceccobelli et al. 2015) y 0.460 en 64 poblaciones de gallinas (Granevitze et al. 2007). La H_E por locus que se obtuvo fue moderada (0.619), elevada en comparación a investigaciones previas realizadas en poblaciones de pavos 0.560 (López-Zavala et al. 2013) y en estudios de gallinas se han obtenido valores de 0.520 (Granevitze et al. 2007) e inferior a la reportada en gallinas nativas de Corea 0.630 (Kong et al. 2006). La población autóctona de pavos criollos de traspatio de México presento valores elevados, en investigaciones previas en poblaciones de pavo doméstico en México se reportaron valores de H_O y H_E de 0.535 y 0.606 respectivamente (López-Zavala et al. 2013). La población se encuentra en equilibrio de HW, solo se encontraron 2 marcadores en desequilibrio de HW de 38 microsatélites utilizados. Los marcadores MNT014 y WT075 se desvían del HW en toda la población. En correlación con el F_{IS} obtenido de los microsatélites fue significativamente diferente de cero, esta positiva asociación explica la deficiencia de heterocigotos en la población (Blackburn 2006; Granevitze et al. 2007; Woelders, Zuidberg & Hiemstra 2006). La media del F_{IS} poblacional (0.128) indica un moderado nivel de homocigotos en la población en promedio, valores bajos de F_{IS} se obtuvieron en México en caracterización de poblaciones domesticas con valores de 0.023 y en poblaciones salvajes 0.266 (López-Zavala et al. 2013), en gallinas 0.089 (Ceccobelli et al. 2015) 0.090 (Granevitze et al. 2007) y 0.109 (Tadano et al. 2007), indicando un leve exceso de homocigotos y un nivel de endogamia y consanguinidad moderado, por ahora son bajos estos niveles de F_{IS} , pero si no se controlan se podrían presentar diversos problemas tales como elevada incidencia de enfermedades genéticas recesivas, reducción de fertilidad femenina y viabilidad espermática, fenómenos de asimetría física, alta mortandad prenatal y de recién nacidos, lento ritmo de

crecimiento, menor talla de adulto, carencias del sistema inmunológico y alteraciones del comportamiento entre otras. El valor medio de F_{IT} (0.152) nos indica que el coeficiente de endogamia entre individuos en relación con la población total es moderado. Las diferenciaciones moderadas y elevadas tienen valores de F_{ST} que van desde 0.05 a 0.15 y 0.15 a 0.25, respectivamente (Grasso et al. 2014). De acuerdo al valor obtenido de F_{ST} (0.027) y teniendo en cuenta la escala que se describe, el F_{ST} es bajo, indicativo de que no existen subestructuras dentro de las poblaciones estudiadas, previas investigaciones en poblaciones de México con animales domésticos y salvajes se obtuvieron resultados inferiores de F_{ST} 0.167 (López-Zavala et al. 2013). Esto se puede corroborar con el análisis factorial de correspondencia (figura 1) y el árbol de distancias individuales (figura 2), en el cual se puede observar que las poblaciones no lograron separarse homogéneamente, a excepción de las muestras recolectadas en la zona de Acayucan, que en las dos figuras se puede apreciar cómo se agrupan entre sí.

Conclusión

Con los resultados encontrados se puede concluir que los pavos de las zonas estudiadas no presentaron una diversidad genética elevada, confirmándose la existencia de una sola población en las diversas zonas donde se realizó el muestreo. Los pavos autóctonos muestreados no son una población homogénea y no muestran subestructura genética, ya que ninguno se separa claramente de las demás cuando se asume que el número de poblaciones ancestrales es 4, que es el K óptimo. Estos resultados pueden ser tomados como referencia para futuros trabajos de caracterización del pavo doméstico.

Tabla I.-Microsatélites analizados, número de alelos detectados, número efectivo de alelos, heterocigosis observada y esperada, contenido de información polimórfica, FIS con su intervalo de confianza al 95% con 1000 remuestros y desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg.

Microsatélite	Nº Alelos	Ae	Ho	He	PIC	F _{IS}	F _{IS} (IC)	HW
MGP018	8	5.01	0.740	0.808	0.772	0.124	(0.063 - 0.185)	ND
MNT011	4	2.03	0.479	0.513	0.436	0.053	(-0.005 - 0.110)	NS
MNT013	8	5.27	0.714	0.818	0.785	0.164	(0.097 - 0.228)	ND
MNT014	3	2.32	0.265	0.574	0.497	0.162	(0.106 - 0.219)	***
MNT247	15	6.28	0.745	0.849	0.824	0.053	(-0.015 - 0.116)	ND
MNT258	4	2.25	0.451	0.562	0.515	0.256	(0.198 - 0.313)	NS
MNT264	2	1.54	0.373	0.353	0.288	0.193	(0.140 - 0.240)	ND
MNT266	9	3.83	0.556	0.747	0.697	0.624	(0.418 - 0.795)	NS
MNT274	14	5.31	0.429	0.820	0.793	0.081	(0.013 - 0.152)	NS
MNT282	8	3.67	0.667	0.735	0.694	0.08	(0.018 - 0.146)	NS
MNT288	4	2.61	0.549	0.623	0.546	0.065	(0.022 - 0.109)	NS
MNT294	3	1.17	0.118	0.147	0.138	0.056	(-0.009 - 0.122)	ND
MNT295	5	3.29	0.740	0.703	0.650	0.232	(0.160 - 0.298)	NS
MNT297	8	2.87	0.569	0.658	0.601	0.167	(0.089 - 0.241)	NS
MNT318	2	1.76	0.471	0.435	0.338	0.141	(0.076 - 0.208)	NS
MNT321	9	4.32	0.721	0.778	0.738	0.221	(0.169 - 0.272)	NS
MNT331	7	4.45	0.565	0.784	0.743	0.133	(0.074 - 0.189)	ND
MNT344	8	2.79	0.543	0.648	0.601	0.174	(0.080 - 0.272)	NS
MNT348	7	1.67	0.275	0.405	0.367	0.251	(0.151 - 0.349)	ND
MNT353	4	1.58	0.431	0.373	0.349	0.245	(0.187 - 0.302)	ND
MNT361	7	2.82	0.571	0.653	0.619	0.097	(0.034 - 0.163)	NS
MNT374	6	1.86	0.373	0.467	0.437	0.161	(0.093 - 0.226)	ND
MNT386	8	1.85	0.510	0.465	0.447	0.209	(0.138 - 0.273)	ND
MNT389	9	3.54	0.725	0.725	0.688	0.049	(0.001 - 0.094)	NS
MNT391	6	2.39	0.490	0.588	0.521	0.115	(0.062 - 0.174)	NS
MNT393	9	5.28	0.784	0.818	0.785	0.025	(-0.052 - 0.107)	ND
MNT411	9	3.51	0.460	0.722	0.688	0.263	(0.122 - 0.405)	NS
RHT009	4	2.69	0.673	0.635	0.553	0.164	(0.034 - 0.292)	NS
RHT024	14	8.46	0.543	0.892	0.870	0.231	(0.171 - 0.287)	ND
RHT216	9	3.22	0.673	0.696	0.639	0.280	(0.214 - 0.351)	NS
TUM016	4	1.47	0.327	0.322	0.298	0.015	(-0.179-0.216)	ND
TUM020	14	4.93	0.723	0.806	0.783	0.102	(-0.010 - 0.208)	NS
TUM023	5	2.96	0.733	0.670	0.595	0.096	(-0.299 - 0.073)	NS
W075	4	2.1	0.356	0.531	0.473	0.332	(0.112 - 0.532)	*
W077	4	2.51	0.596	0.608	0.524	0.019	(-0.204 - 0.241)	NS
WT054	6	2.62	0.608	0.625	0.587	0.027	(-0.126 - 0.165)	NS
WT083	3	1.82	0.314	0.456	0.390	0.314	(-0.001 - 0.565)	ND
WT90	5	2.11	0.314	0.534	0.496	0.327	(0.076 - 0.533)	NS
Media	6.79	3.16	0.620	0.619	0.572	0.166	(0.091 - 0.175)	

Tabla II.- Resultados de los estadísticos F obtenidos en las poblaciones de pavo autóctono de traspatio de la zona de Veracruz, con su intervalo de confianza.

Estadísticos F	Valor con intervalo de confianza
F_{IS}	0.128 (0.077 - 0.179)
F_{IT}	0.152 (0.100 - 0.205)
F_{ST}	0.027 (0.014 - 0.039)

Figura 1.- Análisis Factorial de Correspondencia de las 5 poblaciones autóctonas de traspatio de las zonas rurales de Veracruz.

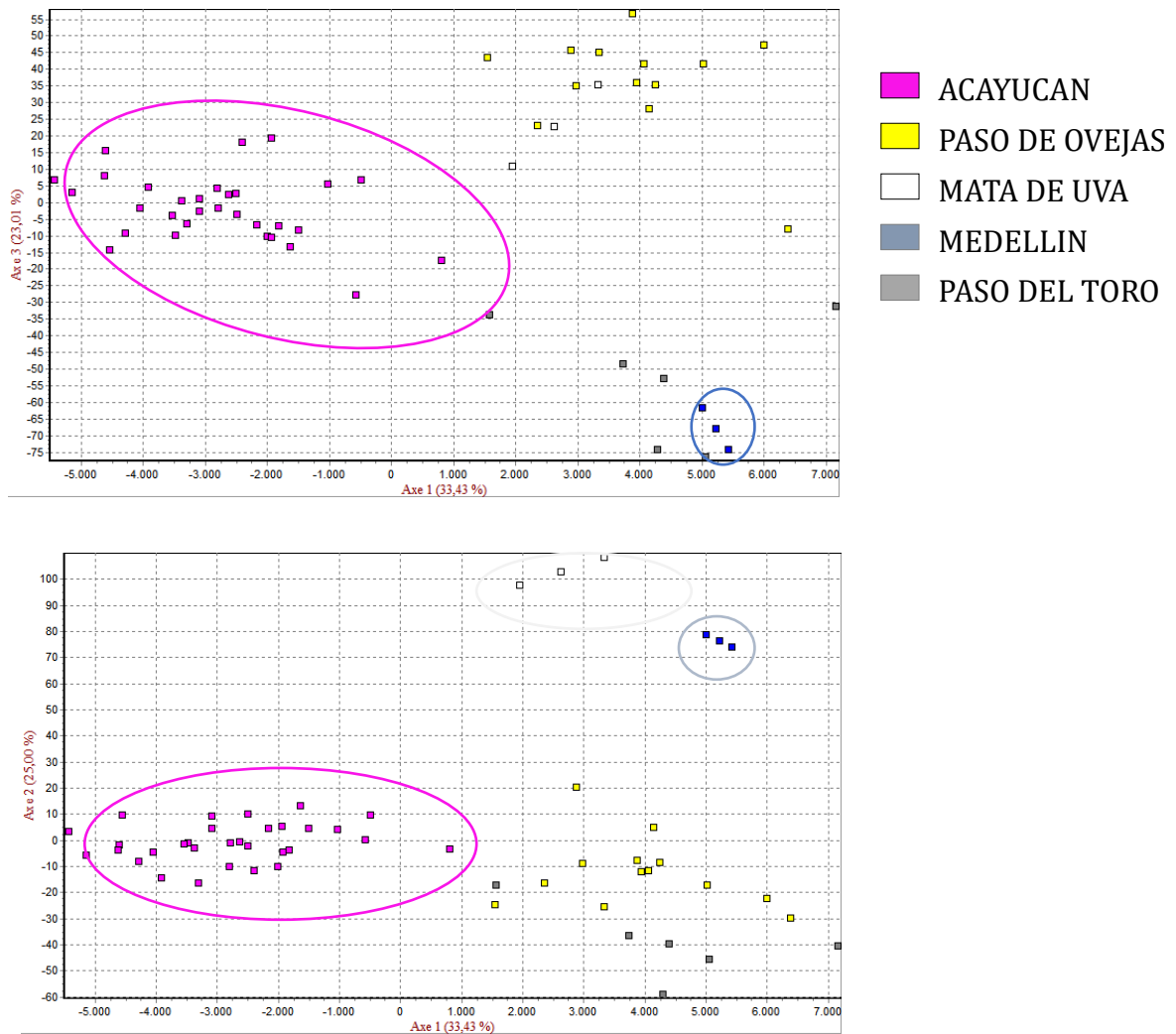


Figura 2.-Árbol de distancias individuales D_{SA} de las 5 poblaciones de las zonas rurales de pavo autóctono de traspatio mexicano.

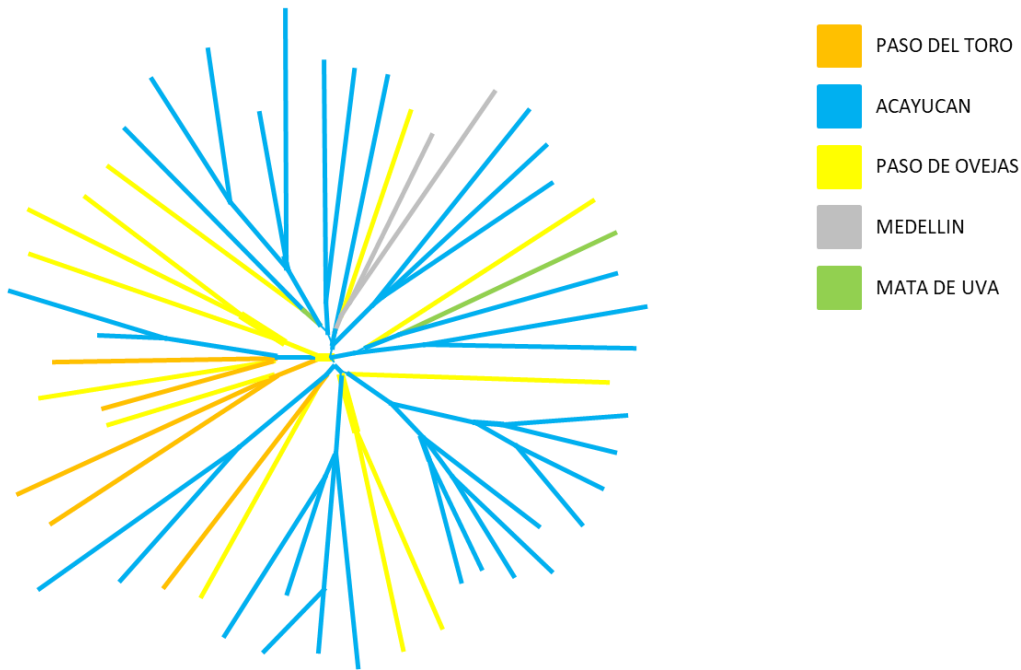


Figura 3.- Representación gráfica de los resultados del análisis de la estructura genética 5 poblaciones de las zonas rurales de pavo autóctono de traspatio mexicano. (K=2 A K=5)

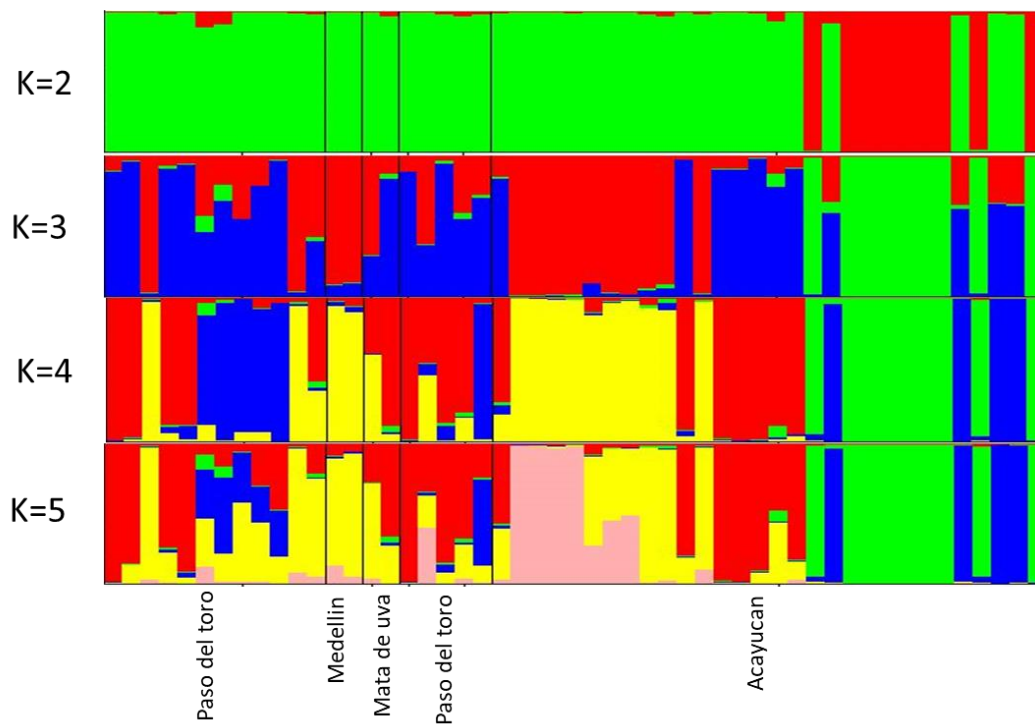
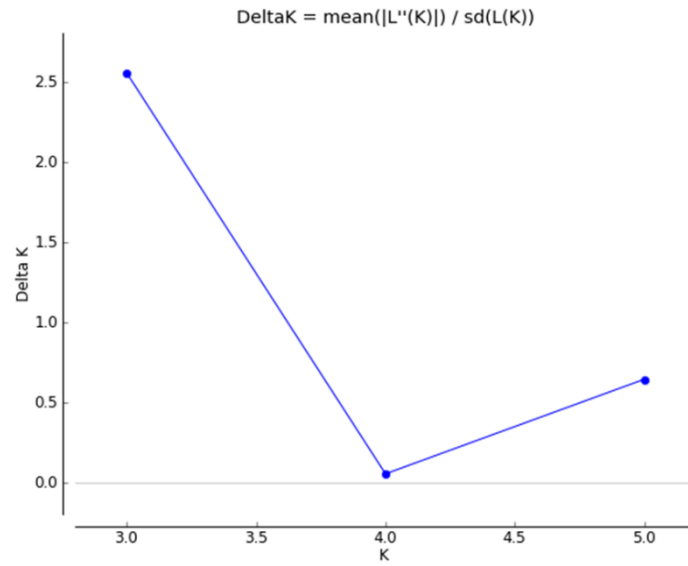


Figura 4.- Valores de ΔK calculados con el programa Structure Harvester siguiendo el método de Evanno et al., 2005, de 5 poblaciones de zonas rurales de pavo autóctono de traspatio mexicano.



CAPÍTULO 4

“The biodiversity and genetic structure of different populations of native turkey”

Amado Manuel Canales Vergara, Vincenzo Landi, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martínez Martínez, Patricia Cervantes Acosta, Agueda Pons Barros, Daniele Bigi, Phillip Sponenberg, Mostafa Helal, Mohammad Hossein Banabazi, María Esperanza Camacho Vallejo

(EN PREPARACIÓN)

1. Introduction

The principal fossil discoveries of turkey ancestors have been found in the south of United States and north of Mexico (Cracraft, 1968; Miller, 1940); the ancestors of the present turkey *Meleagris gallopavo* (MG) evolved from an ancestor that crossed the Straits of Bering when Alaska was connected to Eurasia (Steadman, 1980; Camacho-Escobar et al., 2011). In the Miocene age it is when the real turkeys evolved to the genus *Meleagris* and in the Pleistocene age it possessed at least four species: *M. gallopavo* (present wild turkey), *M. acellata*, *M. californica* and *M. Crassipes*; these last three are already become extinct (Camacho-Escobar 2011). The genus MG migrated to the southwest of the United States from Mesoamerica following the route of the great farmlands and later disseminated in their corresponding areas of distribution (Rea, 1980). It has been documented that its domestication began in Mexico between 200 and 700 BC (Lopez-Zavala, 2013), by pre-Hispanic cultures, the Mayas were the first to domesticate the wild turkey, almost two thousand years before the Aztecs. The turkey was taken to Europe at the beginning of sixteenth century; Cortes mentions that thousands of these birds were raised in the backyard of the palaces of Moctezuma (Hernandez-Resendiz, 2006); this is where the Spanish take and carry to different parts of America such as Peru, Chile and the Antilles (SAGARPA, 2010). This is how its mobilization began throughout Europe in the 16th century. Currently the genus MG has two uses: commercial and backyard where people raise it freely for self-consumption (SAGARPA, 2016). They are found in villages and suburban areas with a low production system and are characterized by poor sanitary practices, factors that adapt to different ecological conditions. Although the turkey varieties are considered a single breed (American Poultry Association, 2001), evidence is emerging about significant strain differences among the populations (Hartman et al., 2006, Kamara, 2007). The genetic resources currently available from *Meleagris gallopavo* is possible to obtain from native birds in wild life, domesticated and domestic natives specialized in Mexico and the United States mainly (Sponenberg et al., 2000). By the fact of expansion of industrial poultry production there is an indiscriminate substitution of native genotypes for improved genotypes (Ceccobelli et al., 2015), causing a loss of diversity and provoking crosses of absorption of Creole genotypes by improved breeds to generate a larger quantity of meat at a lower price (FAO 2007). The breeding of domestic turkey is associated with the rural farm, using traditional methods, in rustic facilities that take advantage of the environment of the house and the participation of the family (Diaz, 1975, Jerez et al., 1994). Conservation of local poultry genetic resources in developing countries should be a priority, as some breeds have sharply deteriorated and even

disappeared in recent decades (Cigarroa, 2012).FAO defines biodiversity as the genetic variability of different types of animal genetic resources at the level of breeds, species and genes, from which as many alleles or variants should be kept as possible (FAO 1996).These factors indicate that the genetics of the turkey is native and constitutes a true genetic background, more than 500 years after having been exported from Mexico, have reconformed their genetic constitution, originating different populations in countries where the MG is not native (Mock et al., 2002, Lopez-Zavala, 2013). The animal biodiversity includes the diversity of species that are living in a site, its genetic variability and the evolutionary ecological processes that occur at the level of ecosystems and landscapes of which these species interact (Pariacote, 2000).The study of the biodiversity of the MG, its genetic structure and the relationship with other turkey populations is essential to understand the evolutionary potential, health and sustainability (Fernández and Barba, 2005; Chassin-Noria,2005; González et al., 2009; Santellano et al., 2011). Presently the interest of the characterization of native turkey populations has begun, some researches has been centered in the external morphology (Adeyeni and Oseni, 2018) by mean of Canonical Discriminant Analysis. But most of the interest has been dedicated to the genetic characterization based on DNA markers, mainly microsatellites.

Analysis with microsatellites will provide molecular information necessary to study the genetic structure and relationship between these populations (Giovambattista, 2001, Aranguren-Méndez, 2005). The genetic markers are loci that have detectable characteristics that can differ between individuals microsatellites were used in studies of phylogenetic analysis, genetic variability and differentiation between populations or individuals (Dodgson et al., 1997; Groeneveld et al., 2010; Ceccobelliet al., 2015).In genetics, from the point of view of improvement and conservation, the principal objective is to study, determine and measure the existing variation between and within the members of a population. From the molecular point of view, this variation also called polymorphism, is originated from spontaneous DNA changes (Aranguren et al., 2005). The study of the domestic turkey (MG) have a progressed rapidly in the past few years, using modern molecular biology and new genetic markers (Reed et al., 2007) to study the structure of the turkey population outside Mexico and the United States like in the present investigation. The populations of domesticated turkeys represent a reservoir of genetic variability and phenotypes that must be explored; the information obtained in this research will be useful for the purposes of conservation and better management of traditional production systems. The aim of the present study was to evaluate the genetic diversity in 9 populations of

domestic turkeys from Spain, Mexico, United State, Italy, Brazil and Egypt using a panel of 38 microsatellite markers designed by our own team.

2. Materials and methods

Samples collection

Nine local populations of domestic turkey from different countries were included in this study and grouped according to their geographic origin. A total of 475 individuals samples of both sexes were collected from the following countries: 48 from Egypt, 174 from Spain, 54 from Mexico, 63 from Italy (Romagnolo and Parma), 99 USA (*Meleagris gallopavo gallopavo*) and 64 Brazil. Blood samples were taken from the wing vein (1 ml for each animal, collected with Vacutainer® tubes containing EDTA as anticoagulant) and stored at -20 °C in FTA Card. Genomic DNA was extracted following the technique proposed from Walsh (Walsh et al., 1991), and stored at -20 °C until genotyping and sequencing.

Microsatellite analysis

A total of 38 microsatellites markers (table 4) for biodiversity studies in turkey were evaluated. The primer sequence (table 5) was taken from different reported literature and from the Gen Bank, but were redesigned by our team, by using the software Primer 3 version 4.1.0 to obtain an optimal annealing temperature and amplification product size compatibility. In this study the M13-tailed primer method was used (Boutin-Ganache et al., 2001) to label amplicons for visualization on the capillary sequencer allowing allocation of all loci in a unique electrophoresis set using Applied Biosystem G5 dye set. Analyses of the fragments was performed using an automated DNA sequencer (ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the software package GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analyses

Allele frequencies for each locus, mean number of alleles per locus and population (MNA) observed (HO) and expected (HE) heterozygosity estimates were calculated with EXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT 3.11. (Park, 2001). Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) at each locus within populations was tested with GENEPOP 4.0 software (Raymond and Rousset, 1995), applying the “Fisher's exact test” and using the “Markov chain algorithm” with default setting. P-values (Guo and Thompson, 1992) were calculated and corrected for multiple tests using the Bonferroni method (Rice, 1989). The FSTAT 2.9.3.2 software (Goudet, 2002) was used to calculate the coefficients for inbreeding within

populations (FIS), and for differentiation among populations (FST) as proposed by Weir and Cockerham (1984) utilising corresponding P-values based on 1000 randomizations. The same software calculated mean allelic richness (Rt), as a measure of the number of alleles independent of samples size, hence allowing comparison among different sample size (Goudet, 2002). Reynolds genetic distance (Reynolds et al., 1983) between pairs of breeds were estimated, and based on these values a Neighbor-Net was visualised using the SplitsTree4 SOFTWARE (Huson and Bryant, 2006). STRUCTURE software version 2.2 (Pritchard et al., 2000) was used to cluster individuals based on multilocus genotypes to assess population structures. The analysis involved an admixture model with correlated allele frequencies. One hundred independent runs were carried out with 300,000 iterations during the burn-in phase and 600,000 iterations for sampling from $2 \leq K \leq 10$ (K=number of clusters) to estimate the most likely number of cluster present in the dataset. The average and the standard deviation (SD) of the logarithmic likelihood [L(K)] of the data were estimated across 100 runs for each K value. The most plausible number of population cluster was determined by calculating the distribution of the ΔK statistic as described by Evanno et al. (2005). The correct detection of the most appropriate number of cluster present in the dataset was confirmed by plotting L(k) over the one hundred runs for each K, as suggested by Pritchard et al. (2000). The clustering pattern was visualised using the software DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004).

3. Results and discussions

Microsatellite polymorphism

A total of 607 alleles were detected across the 39 *loci* investigated, in this study presented a mean number of 15.56 alleles that was higher to reported by Lopez-Zavala et. al. (2013) who used seven markers that showed a mean number of allele of 9.28, TUM20 exhibited the highest number of alleles observed (30) in all 10 studied populations, that is discordant with the results of Burt et. al. (2003) in which these markers showed only 7 alleles in Large White breed, the markers W75 and W77 showed respectively 15 and 8 alleles that were higher than those data reported by Lopez-Zavala et. al. (2013) who used these markers to perform a genetics characterization of domestic and wild turkey population in Mexico finding 8 and 3 alleles respectively, whereas WT83 and MNT353 had only 4 (table 4). Anyway, both studies were limited in number of markers and sampling, so far of our research involving ten populations from seven countries representing three continents.

From 38 out of 39 markers analyzed here, results delivered an H_O higher to 0.1 and stretched from 0.080 (MNT 360) to 0.686 (MNT393), according to Ott et al. (1992), a locus is polyphomic when H_O is higher to 0.1 and highly polymorphic if is higher than 0.7, the table 4 shown that the average of H_O (0.458 ± 0.052) exceeds the 0.1 indicated in that the panel is polymorphic and extremely efficient in genetic diversity studies, showing the same accuracy than other more evolved tools such as the SNPs. Previous turkey's studies based on microsatellites have reported mean H_O locus of 0.533 in 144 examples (Lopez-Zavala et al. 2013), Smith et al. (2005) reported a H_O of 0.09 in 94 samples in five varieties of domestic turkeys in the United States, as shows a diverse behavior on the used panels. As the references on turkeys are limited we add some mentions to chickens, where Ceccobelli et al. (2015) in 15 European population and Granetvitze et al. (2007) in 64 population of chickens estimates a value of H_O 0.456 and 0.460 respectively, very close to our findings in turkeys. The expected frequencies of heterozygotes (table 4) per locus range from 0.173 (MNT264) to 0.742 (TUM20) and the mean H_E was generally moderated (0.593 ± 0.048), but high if compared to previous research in turkey breeds: for example Lopez-Zavala et al. (2013) reported a value of 0.560 and in chickens 0.520, as presented by Granetvitze et al. (2007), but lower than natives' chickens from Korea 0.630 (Kong HS et al. 2006).

The polymorphic information content (PIC) of investigated single *loci* ranged from 0.155 (MNT264) to 0.712 (mnt361), marker showing values higher than 0.50 are considered as very informative, marker with values between 0.25 and 0.50 are mainly informative while marker falling below 0.25 are fairly informative. In this study 66% of the microsatellites can be considered, based on PIC value, as very informative, while 30% are mainly informative and only a 2% was fairly informative; following this information we can considerate that the 38 markers are sufficiently polymorphic to be used in a genetic characterization study and absolutely recommendable in genetic diversity studies in this species. The values on the mean number of alleles per population, expected and observed heterozygosity's, mean allelic richness, mean private allelic richness, the number of loci deviating from HWE in each population and inbreeding coefficients per breed are presented in table 1. The MNA per population covers from 3.54 in the Parma to 9.87 in USAGA, and has an average value of at the breeds of 6.04 ± 2.64 alleles per locus. The turkey population in the United States presented the higher number of alleles per locus, being a very polymorphic population, as second place the population from Andalusia in Spain (AND) includes a variety of animals and populations of a diversified areas of the region, the populations with the lowest MNA compared to the average

population and less polymorphic were the populations from Parma (Italy), Mallorca, Egypt, Brazil and Romagnolo (Italy). This is a first approach to the difference of genetic management among populations; while the United States and Spanish populations advice of an open breeding without intensive selection; the other breeds shows the effect of a close breeding together with some genetic drift (bottle neck effect)

The observed heterocigosity indicates how heterogeneous the analyzed population is, the expected and observed heterozygote frequencies within populations across loci were 0.593 (ranging from 0.484 to 0.770) and 0.457 (ranging from 0.343 to 0.583) respectively, the majority of populations drop high heterozygosity with the exceptions of IR and BR; these two populations presented individual moderately low of heterocigosity in comparison with the average, it means that these populations are under an inbreeding management. Low rate of heterocigosity was presented in populations of chickens of BergischeKraeher (H_O 0.320 and H_E 0.440 Granetvitze et. al. 2007), or the New Hampshire Red H_O 0.295 and H_E 0.290 (Tadano et. al. 2007), chicken of Sobrarbe H_O 0.370 and H_E 0.500 (Ceccobelli et. al. 2015). Two populations drop the highest heterocigosity observed, the first one was the wild turkey population which coming from the United States (USA) heterocigosity observed 0.583 while expected 0.770, these values are superior compared to other populations likely because they are wild animals and , their reproduction is random, therefore their higher genetic variability compared to domestic turkeys, comparing these results to another wild turkey populations in Mexico shown a H_O 0.701 and H_E 0.633 (Lopez-Zavala et. al. 2013) the second population what shown high values was Mexico (H_O 0.544 and H_E 0.642) similar values were delivered in previous investigations in domestic turkey populations in Mexico were H_O and H_E was 0.535 and 0.606 respectively (Lopez-Zavala et. al. 2013), All these turkey studies have been developed with an small panel of microsattalites, so their findings must be considered preliminary reports, only our results could be compared with the chicken researches at the same level.

The R_A from the evolutionary point of view, is an important parameter indicative of genetic variability and diversity, this fact is determined by the initial number of alleles R_A means values (4.65 ± 1.39) varying within a range, from 3.26 PARM to 7.38 in USA, assuming a minimum sample size of 13 individuals, the populations studied have a high degree of allelic richness and these results show us the evolutionary potential of adaptability of the populations (Vargas J et al., 2016) (Ceccobelli et al., 2015) (Greenbaum G et al., 2014). Privated allelic richness (P_{AR}) is a parameter corrected for sample size and indicate the number of private alleles in a determined

population that are allelic variants not shared between group of individuals, so it could be a good indication of geneflow or genetic uniqueness (Vargas. J et. al. 2016)(Kalinowski, ST 2004), the P_{AR} per population extended from 0.10 PARM to 1.76 in USA and a whole average value of 0.25, the USA population is the one that more private allelic richness showed probably due to its close location to the original focal point of the specie, secondly, the population from Mexico that presented 0.66 standing out the differences with respect other populations, but being also near of the origen of the specie. The calculated inbreeding coefficients were peeking in the turkey from USA (0.355) and lowest value in the ROM (0.079) in concordance with the allelic richness results. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), following Bonferroni correction showed 16 markers of 39 loci in disequilibrium, and oscillate from three to 34 unbalanced markers in each populations, the populations of AND and USA were the ones that more disequilibrium presented, some populations presented only 3 of 39 loci in disequilibrium (a mean value in the total sample), see table 1, the MNT360 and MNT348 markers deviate from the HWE in all populations possible for some linkage to functional genes. Deviations are expected if individual populations when sub-structured in flocks within populations that are isolated from each other, or, if the inbreeding has occurred in populations as a whole. It was in correlation with the F_{IS} , which was significantly different from zero, this positive association explains the deficiency of heterozygotes in those populations that are in HWE imbalance, however it is possible that other factors independently of those previously described are also affecting the deviation (Granevitze et. al. 2007) (Blackburn 2006) (Woelders et al., 2006). For example, it is probable that some of the studied populations are substructured, which violates the basic assumptions of HWE, including random sampling in some of them (Jacqueline K. et al. 2005). The populations studied in the present research were sampled as described in the Table 1, however, this deviation of substructures cannot be proven to all populations because there are populations that don't have many loci in HWE deviation. The coefficient of inbreeding (F_{IS}) presents a mean of 0.226, these value indicates a high excess of homozygotes in the whole sampling, but individually the Italian (ROM and PAR), Egypt and Mexico populations presented lower F_{IS} , in this case they have low levels of inbreeding compared to the other populations in this research (AND, MALL, USA, BR,) that present values higher than the average, indicating a excess of homozygotes and moderate level of inbreeding, for now these levels of F_{IS} are lower and need to be controlled because it can present several problems such as high incidence of recessive genetics diseases in the future, in other reports lower F_{IS} were found, as the characterization of domestic turkey populations in Mexico with 0.023 in domestic and 0.266 in wild populations (Lopez-Zavala et al. 2013) and in other animals like in hens, data as

0.089 (Ceccobelli et al., 2015) 0.090 (Granevitze et al., 2007) and 0.109 (Tadano et al., 2007). The genetic differentiation index (F_{ST}), (table 2) ranged from 0.046 (turkey USAW vs. USAGA) to 0.343 (ROM vs. IR); overall breed average F_{st} value was 0.208, according to these value obtained and taking the scale that is described, the interpopulation F_{ST} is high, because they are populations coming from different countries indicating a high genetic differentiation between them, previous investigations in domestic and wild animals in Mexican populations, showed inferior results of F_{ST} 0.167 (Lopez-Zavala et. al 2013). In a general description, the populations with high genetic differentiation were the ROM populations, moderate genetic differentiation was observed in the populations of USA because they come from the same countries and they have ancestors in common, but the populations of MEX, ESAN and USAGA have a moderate distancing, this moderate distance between these two populations it's due to the focus of domestication of *Meleagris gallopavo* occurred in Mexico, the conquerors brought the turkey to Europe in the XIV century to Spain like a exotic bird and distribute them in Europe and later the British re-introduced them where now it is the southwest of the United States and the American indigenous communities used as domestic birds (Cracraft J 1968), (FAO, 2005) (Camacho-Escobar et al., 2011) the description in table 2 shows that all populations except those described previously were very differentiated genetically. This can be corroborated with the Reynolds Distances (Table 2), it is possible to observe the nearest populations are USAW and USAGA and the three populations that can share ancestor in common (MEX, ESAN and USGA) they repeat the same short distance, but the most different genetically and distantly are the Romagnola and Iran population, probably due to the genetic drift in their origin.

Nei pairwise genetic distance (table 2) ranged from 0.288 (AND vs. MALL) to 0.559 (PARM vs. COM). The Neighbor-Net dendrogram is presented in the Figure 1, the populations were separated in six clusters: MEX-ROM-PAR these three populations have a moderate diversity and distance, share the same cluster demonstrating some common genetics basis. MALL-AND, it was expected that these two populations were reunited since they have the minimum distance and diversity among all the studied populations, having as these two populations the same genetic base, and individual EGYPT, AND and BRS, these three populations are separated because the population of AND had formed a closed nucleus in the same population, forming autochthonous turkeys though with the same genetic base of domestication origin, the F_{ST} of the population BRS and EGYPT is high when compared in all the populations forming independent clusters, except for the EGYPT with USA in the dendrogram his approximation can

be appreciated. In the individual tree, it's possible to appreciate how the populations MEX, PAR, ROM, BRS, MALL, are grouped all their individuals on their corresponding population cluster, the population of ESAN is divided in two groups, one shares it with USA and another is a compact group with some BRS animals. USA is divided in three groups, one compact group and two groups it shares with some USA animals. USA is compact in all the individuals and very close to the compact group from USA, and four animals share a group with the before mentioned group. The EGYPT group is compact but there are three MALL individuals inside its cluster. In the totality the majority of the populations have all their individuals in the same group except for the ones described above, distinguishing that the different populations of turkeys that were studied in this research are consolidated Fig. 2.

At this part of the research, we observe as the studied populations are genetically well defined, but some of them presented internal structure, so they must be deeply studied in order to their genetic characterization and official recognition as differentiated breeds. In the present status these populations are under genetic erosion, losing diversity even before to know their productive characteristics and adaptation capacities to the climate changes.

The STRUCTURE clustering solution (Fig 2) indicate that, for $K=10$ to 9 the following breeds clusters were identified: cluster K2 included only the population of EGYPT, cluster II is conformed for AND populations with some highest levels of admixture, cluster III separate in a integrated MALL population, cluster IV a complete cluster of population of MEX with some genetic mixture, cluster V and VI were integrated by the breeds from Italy and are completely divided in PAR and ROM, cluster VII are integrated by the USA populations and is possible to observe a lot off genetic admixture in these clusters, cluster VIII included only the population of USA, cluster X are breeds from BRS.

These findings are mainly in concordance with our previous comments. Egyptian and Brazilian populations show a similar formation, they are local populations created from isolated importations which produced a genetic drift reducing the diversity parameters in respect the original population, these breeds reach a genetic equilibrium maintained till now. Spanish and Italian population present a richer origin with a bigger base in their foundation, and probably with several importations distributed along the time, so its diversity is bigger but also their disequilibrium. Only the Mallorcan population because its natural isolation has reach a bigger definition and stability.

In the United States population stand out the close relations between domestic and wild populations, what it is normal because the coexist in close ecosystems. Finally, we have to do a special comment on the Mexican population, because they are the most extended and socially recognized, we are certainly disappointed because the signals of exotic introgressions are clear and urgent measurement must be implemented to avoid the Mexican local turkey populations destruction.

4. Conclusions

The complex history of the domestic turkey makes very difficult the interpretation of our findings in respect the phylogenetic structure of the studied populations. United States domestic population still maintain its linkages with the wild turkey, but the Mexican local population proposes an admixture between two origins, the first in the domesticated wild representatives, as in USA, and the second in those animals which returned from Europe with a slight improvement.

Spanish local populations are mainly related to the USA population but showing signs of recent introgressions of genes from the modern industrial breeds. Only the Mallorcan population maintain a closed structure due its location in a island.

All the studied breeds showed a clear genetic definition, sufficient to propose its official recognition as independent breeds, in the same terms than in other species. Some of them (Mexican and Andalusian) showing some internal structure what could mean the existence of separate breeds, what it is possible due to the wide sampled territories inhabited by these animals.

This study remarks that in most of these populations the evidences of recent erosions produced by indiscriminate crossbreeding with cosmopolite industrial breeds are a reality, so we must recommend an urgent program of characterization, conservation and valuation of the turkey local population in all countries in order to avoid the extinction of this important resource with capacity to produce in sustainable systems in all the world

Table 1: Turkey breeds studied. country of origin. Acronym (ID) sample size of each breed. Mean observed (HO) and expected (HE) heterozygosity with the standard deviations (SD). Mean number of observed alleles (MNA). Mean allelic richness per locus corrected for sample size breed (RA). Number of locus deviated from Hardy-Weinberg equilibrium per breed (dHWE) and inbreeding coefficient (FIS) per breed.

Population	ID	Sample size	Loci typed	H _E (SD)	H ₀ (SD)	MNA (SD)	R _A	dHWE	FIS (C.I)
EGIPTO	EG	47	38	0.509 (0.032)	0.451 (0.012)	3.68 (1.91)	2.39	11	0.115 (0.06233 - 0.14259)
ANDALUCIA	AND	130	38	0.616 (0.025)	0.420 (0.007)	6.61 (2.71)	2.86	37	0.318 (0.28878 - 0.34261)
MALLORQUIN	MALL	37	38	0.516 (0.032)	0.449 (0.013)	3.76 (1.63)	2.41	13	0.132 (0.06596 - 0.16645)
MEXICO	MEX	51	38	0.619 (0.027)	0.532(0.011)	6.79 (3.39)	2.96	14	0.142 (0.08799 - 0.17682)
PARMA	PAR	25	38	0.496 (0.026)	0.487 (0.016)	3.24 (1.17)	2.28	6	0.018 (-0.09294 - 0.08749)
ROMAGNOLO	ROM	38	38	0.529 (0.031)	0.479(0.013)	4.08 (1.71)	2.49	11	0.095 (0.03200 - 0.13326)
USA	USA	84	38	0.672 (0.024)	0.478 (0.009)	9.82 (3.74)	3.23	34	0.290 (0.24787 - 0.31883)
BRAZIL	BRA	62	38	0.472 (0.036)	0.342 (0.009)	4.45 (1.91)	2.31	25	0.275 (0.21944 - 0.31092)
MEAN				0.554 ±0.029	0.455±0.011	5.30±2.22	2.61±1.39		

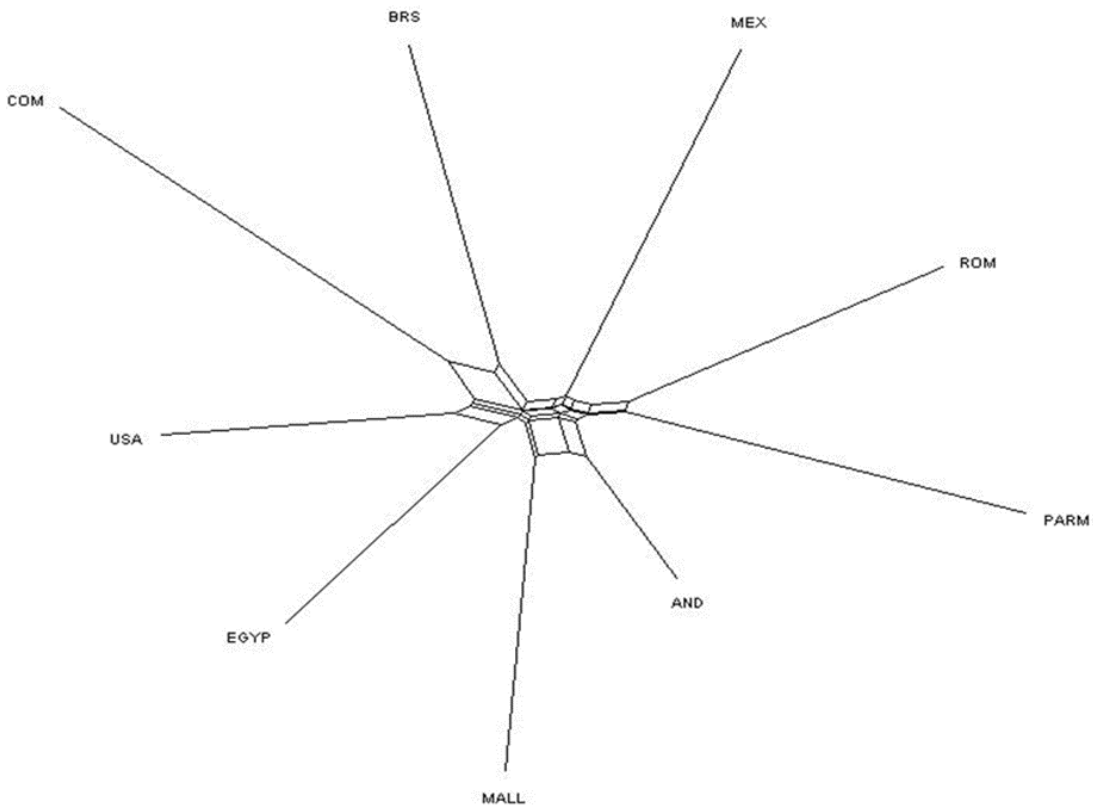
TABLE 2: Genetic distance of Nei below of the diagonal and Number of migrants above the diagonal

	MEX	BRAS	USA	AND	MALL	PARM	ROM	EGYP	COM
MEX	0	0.95	2.39	2.63	1.27	1.14	1.40	1.53	0.98
BRAS	0.457	0	1.25	1.24	0.80	0.66	0.88	0.99	0.72
USA	0.413	0.416	0	3.18	2.23	1.36	1.34	2.64	1.51
AND	0.346	0.360	0.308	0	2.31	1.77	2.15	2.09	1.26
MALL	0.458	0.414	0.375	0.288	0	0.86	0.93	1.15	0.77
PARM	0.471	0.505	0.490	0.356	0.468	0	1.09	0.96	0.69
ROM	0.430	0.436	0.460	0.310	0.441	0.404	0	1.09	0.76
EGYP	0.409	0.373	0.336	0.321	0.387	0.417	0.411	0	0.79
COM	0.548	0.465	0.442	0.430	0.508	0.559	0.535	0.491	0

TABLE 4: Locus studied. Allele number of each locus (All. Num). Mean observed (HO) and expected (HE) heterozygosity with the standard deviations (SD). Polymorphic information content (PIC). Allelic richness per locus (RA). Inbreeding coefficient (FIS) per locus and Alleles effective number (Ne).

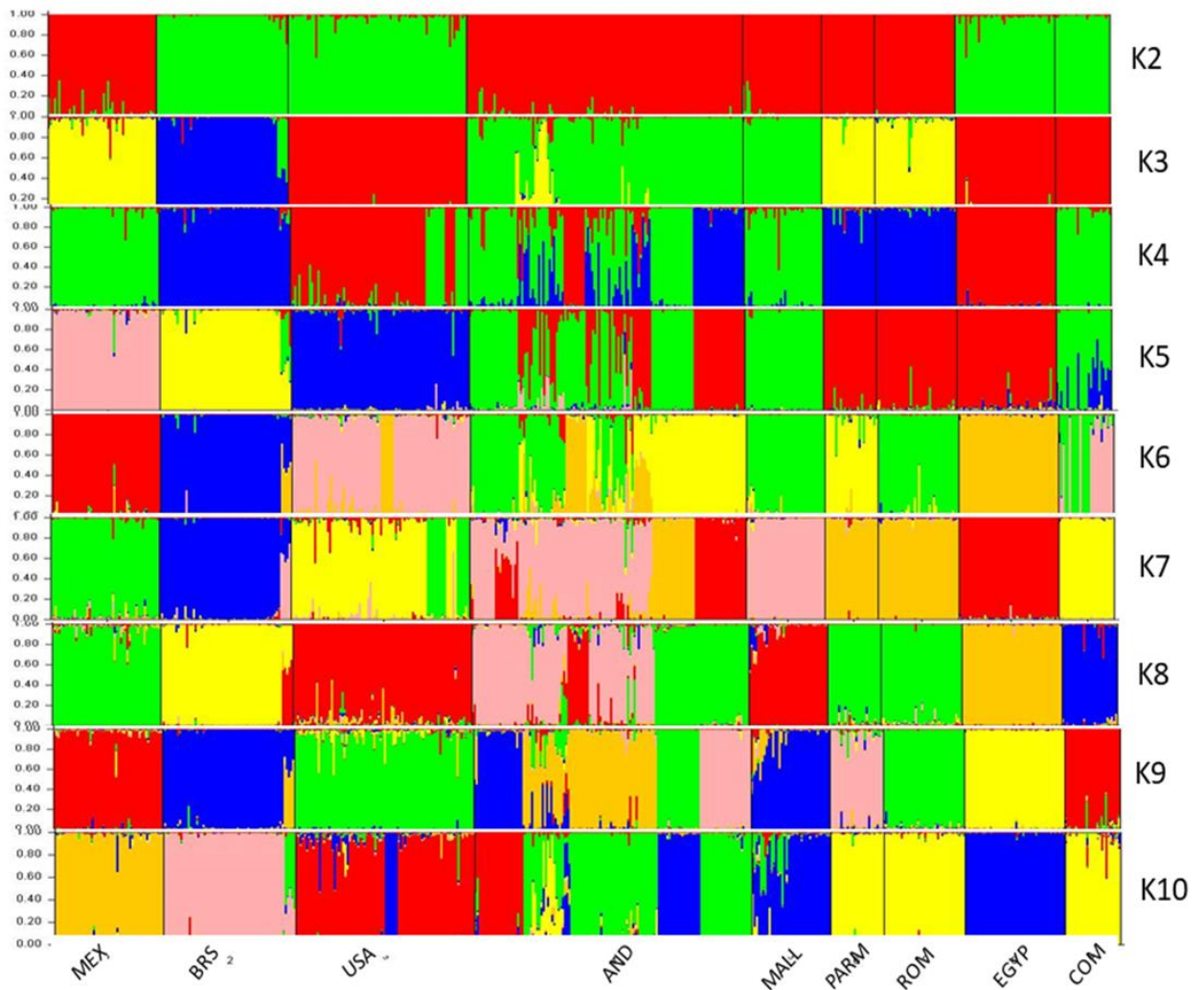
Locus	All.Num.	H _O ± SD	H _E ± SD	PIC	R _A	FIS	Ne
MGP018	14	0.463±0.173	0.664±0.145	0.779	7.399	0.294	5.173
MNT011	16	0.493±0.202	0.550±0.201	0.628	5.982	0.093	3.128
MNT013	14	0.526±0.166	0.602±0.176	0.767	8.706	0.116	4.797
MNT014	4	0.293±0.222	0.489±0.195	0.530	3.118	0.393	2.563
MNT247	21	0.694±0.155	0.738±0.111	0.858	11.258	0.048	7.694
MNT258	9	0.386±0.190	0.485±0.226	0.564	5.533	0.194	2.554
MNT264	5	0.170±0.235	0.193±0.211	0.207	3.391	0.104	1.274
MNT266	23	0.415±0.160	0.544±0.159	0.612	7.457	0.228	2.993
MNT274	28	0.462±0.177	0.547±0.181	0.570	7.460	0.145	2.618
MNT282	12	0.396±0.216	0.431±0.239	0.465	5.420	0.070	2.037
MNT288	6	0.525±0.139	0.566±0.066	0.574	3.392	0.062	2.801
MNT294	7	0.507±0.224	0.556±0.170	0.688	5.342	0.077	3.705
MNT295	12	0.494±0.201	0.590±0.154	0.661	5.865	0.153	3.344
MNT297	15	0.444±0.230	0.481±0.218	0.509	6.432	0.066	2.135
MNT318	7	0.331±0.164	0.390±0.147	0.419	4.206	0.142	1.815
MNT321	14	0.483±0.183	0.578±0.175	0.739	8.123	0.153	4.355
MNT331	18	0.543±0.171	0.655±0.147	0.837	10.742	0.161	6.779
MNT344	18	0.553±0.172	0.651±0.123	0.749	8.845	0.140	4.460
MNT348	14	0.208±0.084	0.655±0.114	0.773	8.196	0.678	4.973
MNT353	4	0.308±0.228	0.317±0.217	0.329	3.392	0.017	1.569
MNT361	15	0.604±0.102	0.693±0.101	0.774	7.440	0.116	5.021
MNT374	11	0.408±0.086	0.527±0.108	0.546	6.274	0.215	2.447
MNT386	16	0.572±0.128	0.591±0.108	0.704	9.918	0.020	3.553
MNT389	17	0.451±0.184	0.548±0.192	0.596	7.096	0.169	2.852
MNT391	14	0.449±0.210	0.525±0.187	0.527	5.906	0.135	2.456
MNT393	19	0.621±0.206	0.653±0.173	0.711	8.286	0.037	3.912
MNT411	16	0.560±0.117	0.673±0.109	0.774	9.136	0.158	4.875
RHT009	12	0.566±0.148	0.594±0.159	0.700	5.862	0.035	3.912
RHT024	23	0.429±0.191	0.699±0.159	0.853	12.074	0.378	7.389
RHT216	15	0.520±0.217	0.579±0.209	0.661	7.236	0.091	3.242
TUM016	10	0.211±0.156	0.240±0.184	0.302	4.218	0.109	1.467
TUM020	27	0.680±0.101	0.756±0.047	0.795	10.318	0.089	5.439
TUM023	9	0.556±0.163	0.549±0.115	0.643	4.319	0.025	3.317
W075	11	0.448±0.104	0.531±0.136	0.614	3.800	0.147	3.072
W077	6	0.395±0.163	0.491±0.160	0.540	2.719	0.185	2.530
WT054	12	0.578±0.210	0.593±0.166	0.607	4.953	0.012	2.871
WT083	4	0.437±0.178	0.457±0.081	0.465	3.175	0.033	2.128
WT90	13	0.367±0.191	0.440±0.179	0.428	5.453	0.157	1.850
MEAN	13.44	0.462±0.172	0.548±0.156	0.618	6.538	0.1483	3.503

Figure 1: Neighbor-Net dendrogram.



COM: Comercial; USA: EE. UU.; EGY: Egypt; MALL: Majorca; AND: Andalucia; PARM: Parmalag; ROM: Romagnolo; MEX: Mexico; BRS: Brasil.

Figure 2: Graphical representation of the estimated membership fractions of individuals of the populations analyzed in each of the K inferred cluster, K=2 to K=10 (Burn-in 3000000; interactions:1000000).



CONCLUSIONES

DEL CAPÍTULO 1: Tracing worldwide turkey biodiversity using D-loop sequence mitochondrial DNA analysis.

- I. Se observó que la mayoría de las poblaciones domésticas de pavo en Brasil, Egipto, Andalucía, Mallorca, Italia, México y los Estados Unidos compartían el mismo haplotipo y línea materna y el valor negativo del estadístico D de Tajima indica una expansión demográfica reciente. Nuestros resultados sugieren que las poblaciones de pavos de México y EE. UU. fueron poblaciones históricamente grandes y estables que ocuparon una amplia distribución geográfica que abarca desde el norte hasta el centro de América. Las poblaciones no reportaron una elevada distancia genética entre sí, solo la población de Irán que reporta la mayor distancia entre las poblaciones domésticas y más cerca de las líneas comerciales. Las poblaciones de pavo de las comunidades rurales de Andalucía, Mallorca, Egipto, Irán, Italia y EE. UU. están agrupadas en seis haplotipos, que no se han reportado previamente para las poblaciones de *M. gallopavo*.

DEL CAPÍTULO 2: Multiplex microsatellite panel for the genetic characterization and diversity assessment of domestic turkey (Meleagris gallopavo gallopavo).

- I. Un panel de marcadores de microsatélites fue desarrollado y confirmado para su uso en estudios de biodiversidad de pavos. El panel consta de 39 loci polimórficos, que fueron seleccionados por una distribución óptima en el genoma de *M. gallopavo* y para un uso eficiente en el laboratorio. El análisis estadístico indicó un alto grado de polimorfismo y un grado moderado de desequilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indicó que el panel era adecuado para estudios de biodiversidad y estructura de la población.
- II. Por primera vez, una herramienta estandarizada está disponible para el metanálisis internacional de la subestructura genética del pavo a nivel internacional. Además, los resultados de PEC mostraron que se necesita un número relativamente bajo de marcadores para el estudio de paternidad e identificación.

DEL CAPÍTULO 3: Genetic Characterization of The Domestic Turkey Of Mexican Backyard.

- I. En el estudio de caracterización de la población de México, se ocupó el panel de microsatélites diseñados para estudios de biodiversidad en pavos y todos los marcadores fueron polimórficos. Se puede concluir, que el panel nos indicó que los pavos de las zonas estudiadas no presentaron una diversidad genética, pero si una elevada

variabilidad genética, confirmando la existencia de una sola población en las diversas zonas del muestreo. Los pavos autóctonos muestreados, no son una población homogénea y no muestran subestructura genética, ya que ninguna de las poblaciones se separa claramente. Estos resultados pueden ser tomados como referencia para futuros trabajos de caracterización de poblaciones de pavos domésticos.

DEL CAPÍTULO 4: The biodiversity and genetic structure of different populations of native turkey (EN PREPARACIÓN).

- I. La compleja historia del pavo doméstico dificulta mucho la interpretación de nuestros hallazgos con respecto a la estructura filogenética de las poblaciones estudiadas. La población doméstica de los Estados Unidos aún mantiene sus vínculos con el pavo salvaje, pero la población local mexicana propone una mezcla entre dos orígenes, el primero en los representantes salvajes domesticados, como en EE. UU., y el segundo en aquellos animales que regresaron de Europa con un ligero mejora.
- II. Las poblaciones locales españolas están relacionadas principalmente con la población de EE. UU., pero muestran signos de introgresión reciente de genes de las razas industriales modernas. Solo la población mallorquina mantiene una estructura cerrada debido a su ubicación en una isla.
- III. Las razas estudiadas mostraron una definición genética clara, suficiente para proponer su reconocimiento oficial como razas independientes, en los mismos términos que en otras especies. Algunos de ellos (mexicanos y andaluces) muestran alguna estructura interna que podría significar la existencia de razas separadas, lo que es posible debido a los amplios territorios muestreados habitados por estos. Este estudio señala que en la mayoría de estas poblaciones las evidencias de erosiones recientes producidas por el cruzamiento indiscriminado con razas industriales es una realidad, por lo que debemos recomendar un programa urgente de caracterización, conservación y valoración de la población local de pavo en todos los países para evitar la extinción de este importante recurso con capacidad para producir en todos los sistemas sostenibles el mundo.

CONCLUSIONS

OF THE CHAPTER 1: Tracing worldwide turkey biodiversity using D-loop sequence mitochondrial DNA analysis.

- I. The majority of domestic turkey breeds in Brazil, Egypt, Andalusia, Mallorca, Italy, Mexico, and the USA were seen to share the same haplotype and maternal line and the negative value of Tajima's D-value statistic indicate a recent demographic expansion. Our results suggest that turkey populations from Mexico and the USA were historically large and stable populations that occupied a wide geographical distribution ranging from the north to the center of the American territories. The populations do not report a high genetic distance from each other, only the population of Iran that reports the highest distance from domestic populations and closer to commercial lines. Turkey populations from rural communities in Andalusia, Majorca, Egypt, Iran, Italy, and the USA consisted of six haplotypes, which has not previously been reported for *M. gallopavo* populations.

OF THE CHAPTER 2: Multiplex microsatellite panel for the genetic characterization and diversity assessment of domestic turkey (Meleagris gallopavo gallopavo).

- I. A large panel of microsatellite markers was developed and confirmed for use in turkey diversity studies. The panel consists of 39 polymorphic loci, which were selected for optimal distribution in the *M. gallopavo* genome and for efficient reproducibility in the laboratory. Statistical analysis indicated a high degree of polymorphism and moderate degree of Hardy-Weinberg disequilibrium, which indicated that the panel was suitable for biodiversity and population structure studies.
- II. For the first time, a standardized tool is available for the international meta-analysis of the turkey's genetic substructure at the international level. Also, the PEC results showed shows that a relatively low number of markers is needed for parentage and identification study.

OF THE CHAPTER 3: Genetic Characterization of The Domestic Turkey Of Mexican Backyard.

- I. We used the panel of microsatellites designed for biodiversity studies in turkeys and all markers were polymorphic. The turkeys in the areas studied did not have a genetic diversity, but if a high genetic variability, confirming the existence of a single population in the all areas of sampling. Sampled indigenous turkeys are not a homogeneous population and do not show genetic substructure, as none of the populations are clearly separated. These results can be taken as a reference for future work of characterizing domestic turkey populations.

OF THE CHAPTER 4: The biodiversity and genetic structure of different populations of native turkey (UNDER PREPARATION).

- I. The complex history of the domestic turkey makes very difficult the interpretation of our findings in respect the phylogenetic structure of the studied populations. United States domestic population still maintain its linkages with the wild turkey, but the Mexican local population proposes an admixture between two origins, the first in the domesticated wild representatives, as in USA, and the second in those animals which returned from Europe with a slight improvement.
- II. Spanish local populations are mainly related to the USA population but showing signs of recent introgressions of genes from the modern industrial breeds. Only the Mallorcan population maintain a closed structure due its location in a island.
- III. All the studied breeds showed a clear genetic definition, sufficient to propose its official recognition as independent breeds, in the same terms than in other species. Some of them (Mexican and Andalusian) showing some internal structure what could mean the existence of separate breeds, what it is possible due to the wide sampled territories inhabited by these animals.
- IV. This study remarks that in most of these populations the evidences of recent erosions produced by indiscriminate crossbreeding with cosmopolite industrial breeds are a reality, so we must recommend an urgent program of characterization, conservation and valuation of the turkey local population in all countries in order to avoid the extinction of this important resource with capacity to produce in sustainable systems in all the world.

RESUMEN

En la actualidad existen muchas variedades de pavo doméstico, todas ellas derivan del hoy extinto *Meleagris gallopavo gallopavo* que es originario de México. El pavo (*Meleagris gallopavo gallopavo*) es un ave que se domesticó en México, era utilizada por las antiguas civilizaciones para satisfacer sus necesidades alimenticias y para algunos rituales, fue la única especie doméstica que los colonos europeos trasladaron de México a Europa. En la actualidad esta ave no dispone de un programa de conservación y a través de más de 500 años de adaptación en el continente europeo, africano y asiático, han surgido diversas variedades de pavo doméstico que son un recurso genético importante para preservar en la actualidad. Dada la situación de la introducción de variedades industriales y el desplazamiento de las razas autóctonas, estas están en peligro de desaparecer, se considera necesario realizar un estudio de caracterización genética y mitocondrial para el reconocimiento oficial de estas poblaciones y con ello favorecer la implantación de programas de conservación que garanticen su supervivencia. En la actualidad, ningún estudio importante se ha desarrollado hasta el momento en España y México. Sólo comunidades españolas como la Extremeña y la Balear han mencionado entre sus recursos genéticos a esta especie. Los Objetivos del presente trabajo fue el diseño de un panel de microsatélites para estudios de biodiversidad en poblaciones de *Meleagris gallopavo*, la caracterización genética, el análisis de la diversidad y estructura intrapoblacional de las poblaciones de *Meleagris gallopavo*; el análisis de la diversidad interpoblacional entre poblaciones de diversos países (México, España, Italia, Estados Unidos, Brasil, Egipto e Irán) y su foco de domesticación (México y Estados Unidos); además de un análisis mitocondrial para comprender mejor el proceso de domesticación e identificar conexiones inter o intraespecíficas entre poblaciones de pavos, para determinar sus orígenes, rastrear su expansión global y definir el valor genético de la especie. Se rediseñaron un total de 39 microsatélites para el diseño de un panel de biodiversidad, se contó con un total de 7 poblaciones de pavo doméstico de España, Italia, México, Brasil, Egipto, Irán y Estados Unidos, y se diseñó un primer para el estudio de ADN mitocondrial. Como resultados del análisis mitocondrial, se analizaron Noventa y tres pavos domésticos de poblaciones de Brasil, México, Estados Unidos, España, Italia, Irán y Egipto. También se incluyeron secuencias disponibles públicamente de estudios anteriores. Se identificaron sesenta y seis sitios polimórficos. Los pavos de México mostraron la mayor cantidad de sitios polimórficos (40), mientras que los pavos de Italia y Brasil reportaron solo un sitio cada uno. La diversidad de nucleótidos también fue más alta en México y Estados Unidos ($\pi = 0.0175$ y 0.0102 , respectivamente) y más baja en Brasil e Italia. De los seis haplogrupos principales definidos, la población mexicana y estadounidense son más estables y diversas que las otras poblaciones. De

los 39 microsatélites que se analizaron para el diseño del panel de Biodiversidad, todos los microsatélites eran polimórficos, con al menos 4 alelos y no más de 19 alelos. Además, la riqueza alélica varió de 3.810 a 17.985, la heterocigosidad media varió de 0.452 ± 0.229 a 0.667 ± 0.265 , los valores de PIC variaron de 0.213 (MNT264) a 0.850 (RHT0024), y el valor medio de Fis fue 0.322. En general, el panel fue altamente polimórfico. En el estudio de la población de México todos los microsatélites utilizados han resultado polimórficos, los estadísticos F muestran los siguientes valores en el total de la muestra: FIS 0.128 ($P < 0.05$), FIT 0.152 ($P < 0.05$) y FST 0.027, ($P < 0.05$), lo que señala que la población de pavo de traspatio caracterizada no presenta subestructuras genéticas. Este trabajo podría aportar información de base científica para el reconocimiento oficial de estas poblaciones, y con ello favorecer la implementación de programas de rescate y conservación que garanticen su supervivencia en el mundo actual mediante el uso de marcadores microsatélites.

SUMMARY

There are currently many varieties of domestic turkey, all of them derived from the now extinct *Meleagris gallopavo gallopavo* that is originally from Mexico. A turkey (*Meleagris gallopavo gallopavo*) is a bird that was domesticated in Mexico, was used by ancient civilizations to meet their nutritional needs and for some rituals. It was the only domestic species that European settlers moved from Mexico to Europe. Nowadays, this bird does not have a conservation program and through more than 500 years of adaptation in the European, African and Asian continents. Several varieties of domestic turkey have emerged that are an important genetic resource to preserve today. Given the situation of the introduction of industrial varieties and the displacement of native breeds, these are in danger of disappearing. It is considered necessary to carry out a study of genetic and mitochondrial characterization for the official recognition of these populations and thereby favor the implementation of programs of conservation that guarantee their survival.

At present, no major study has been developed so far in Spain or Mexico. Only Spanish communities such as Extremeña and Balearic have mentioned this species among their genetic resources. The objectives of this work were to design a microsatellite panel for biodiversity to study the genetic characterization and to analyze the diversity and intrapopulation structure of *Meleagris gallopavo* populations; to analyze the interpopulation diversity among populations of different countries (Mexico, Spain, Italy, United States, Brazil, Egypt and Iran) and with the focus of domestication (Mexico and the United States). A mitochondrial analysis was also carried out to understand the process of domestication and to identify inter- or intraspecific connections among turkey populations and to determine their origins, track their global expansion and define the genetic value of these species.

A total of 39 microsatellites were redesigned for the design a biodiversity panels. A total of 7 domestic turkey populations were used from Spain, Italy, Mexico, Brazil, Egypt, Iran and the United States, and a primer was designed for the study of mitochondrial DNA. As part of the mitochondrial analysis, ninety-three domestic turkeys from populations in Brazil, Mexico, the United States, Spain, Italy, Iran and Egypt were analyzed. Publicly available sequences from previous studies were also included. Sixty-six polymorphic sites were identified.

The turkeys of Mexico reported the largest number of polymorphic sites (40), while the turkeys in Italy and Brazil reported only one site each. Nucleotide diversity is also higher in Mexico and the United States ($\pi = 0.0175$ and 0.0102 , respectively) and lower in Brazil and Italy. Of the six principal haplogroups, the Mexican and American populations were more stable and diverse than the other populations. Of the 39 microsatellites that were analyzed for the design

of the Biodiversity panel, all microsatellites were polymorphic, with at least 4 alleles and no more than 19 alleles. In addition, allelic richness ranged from 3.810 to 17.985, mean heterozygosity ranged from 0.452 ± 0.229 to 0.667 ± 0.265 , PIC values ranged from 0.213 (MNT264) to 0.850 (RHT0024), and mean Fis value was 0.322. In general, the panel was highly polymorphic. In the study of the population of Mexico, all microsatellites used have been polymorphic, the statistics F show the following values in the total samples: FIS 0.128 ($P < 0.05$), FIT 0.152 ($P < 0.05$) and FST 0.027, ($P < 0.05$), which indicates that the native population of backyard turkey characterized from Mexico does not present genetic substructures. This work could provide scientifically based information for the official recognition of these populations, helping with the implementation of rescue and conservation programs that guarantee their survival in the actuality using microsatellite markers.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeyemi, M., & Oseni, S. (2018). Canonical discriminant analysis applied to biometric data of Nigerian indigenous turkeys. *Archivos de zootecnia*, 67, 7-12.

Alderson, G. (2018). Conservation of breeds and maintenance of biodiversity: justification and methodology for the conservation of Animal Genetic Resources. *Archivos de zootecnia*, 67(258).

Alderson, G. Conservation of breeds and maintenance of biodiversity: Justification and methodology for the conservation of Animal Genetic Resources. *Arch. Zootec.* 2018, 67 300-309.

Avice, J.C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 2000.

Bandelt, H.-J.; Forster, P.; Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 1999, 16, 37–48.

Belkhir, K & Borsa, LC 'N. Raufaste, and F. Bonhomme. 1996–2004. GENETIX 405, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UMR 5000', Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Belkhir, K. (1999). GENETIX, version 4.02 a windows program for population genetic analysis. Laboratoire genome, populations, interactions. UPR, 9060.

Blackburn, H 2006, 'The national animal germplasm program: challenges and opportunities for poultry genetic resources', *Poultry science*, vol. 85, no. 2, pp. 210-5.

Blackburn, H. D., Paiva, S. R., Wildeus, S., Getz, W., Waldron, D., Stobart, R., et al. (2011). Genetic structure and diversity among sheep breeds in the United States: Identification of the major gene pools. *Journal of Animal Science*, 89(8), 2336-2348. doi: 10.2527/jas.2010-3354

Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., & Deschepper, C. F. (2001). M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 31(1), 24-26, 28.

Bowcock, AM, Ruiz-Linares, A, Tomfohrde, J, Minch, E, Kidd, JR & Cavalli-Sforza, LL 1994, 'High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites', *Nature*, vol. 368, no. 6470, p. 455.

- Bowen, B.; Grant, W.S. Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): Assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution* 1997, 51, 1601–1610.
- Breitburg, E. The evolution of turkey domestication in the greater Southwest and Mesoamerica. *Cult.Contac Charles C. Di Peso's Gran Chichimeca*, 1993, pp. 153-172
- Burt, D. W., Morrice, D. R., Sewalem, A., Smith, J., Paton, I. R., Smith, E. J., et al. (2003). Preliminary linkage map of the turkey (*Meleagris gallopavo*) based on microsatellite markers. *Anim Genet*, 34(6), 399-409.
- Camacho-Escobar, M.A.; Jiménez-Hidalgo, E.; Arroyo-Ledezma, J.; Sánchez-Bernal, E.I.; Pérez-Lara, E. Historia natural, domesticación y distribución del guajolote (*Meleagris gallopavo*) en México. *Univ. y Cienc.* 2011, 27, 351–360.
- Camacho-Escobar, MA, Arroyo-Ledezma, J, García-Bautista, Y & Pérez-Lara, E 2014, 'Medicina Alternativa aplicada al guajolote nativo (*Meleagris gallopavo*) en la costa de Oaxaca', *Memorias del 5to. Foro Interinstitucional Avances de la Investigación en Homeopatía Humana, Veterinaria y Agrohhomeopatía.*
- Casquet, J.; Thebaud, C.; Gillespie, R.G. Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Mol. Ecol. Resour.* 2012, 12, 136–141.
- Ceccobelli, S., Di Lorenzo, P., Lancioni, H., Ibanez, L. V. M., Tejedor, M. T., Castellini, C., et al. (2015). Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. *Livestock Science*, 175, 27-36. doi: 10.1016/j.livsci.2015.03.003
- Chaves, L. D., Rowe, J. A., & Reed, K. M. (2005). Survey of a cDNA library from the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Genome*, 48(1), 12-17. doi: 10.1139/g04-088
- Cho, C. J., & Cho, B. W. (2004). Microsatellite DNA typing using 16 markers for parentage verification of the Korean native horse. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(6), 750-754. doi: DOI 10.5713/ajas.2004.750
- Colombo, E., Strillacci, M. G., Cozzi, M. C., Madeddu, M., Mangiagalli, M. G., Mosca, F., et al. (2014). Feasibility Study on the FAO Chicken Microsatellite Panel to Assess Genetic Variability in the Turkey (*Meleagris gallopavo*). *Italian Journal of Animal Science*, 13(4), 3334. doi: 10.4081/ijas.2014.3334

Cracraft, J 1968, 'First record of the turkey *Meleagris gallopavo* from the Pleistocene of México', *The Condor*, vol. 70, no. 3, p. 274.

Crawford, R. (1992). Introduction to Europe and diffusion of domesticated turkeys from the America. *Archivos de zootecnia*, 41(154), 2.

Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F.; Dufayard, J.-F.; Guindon, S.; Lefort, V.; Lescot, M. Phylogeny. fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, W465–W469.

Díaz, G 1976, 'Producción de guajolotes en México', *Memoria de la*, vol. 2, pp. 115-9.

Evanno, G, Regnaut, S & Goudet, J 2005, 'Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study', *Molecular ecology*, vol. 14, no. 8, pp. 2611-20.

Flannery, K. Vertebrate fauna and hunting practices. In *Prehistory of the Tehuacan Valley, Environment and Subsistence*; Byers, D.S., Ed.; University of Texas Press: Austin, TX, USA, 1967; Volume 1.

Gholizadeh, M.; Mianji, G.R. Use of microsatellite markers in poultry research. *Int. J. Poult. Sci.* 2007, 6, 145–153.

Granevitze, Z., Hillel, J., Chen, G. H., Cuc, N. T. K., Feldman, M., Eding, H., et al. (2007). Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Animal Genetics*, 38(6), 576-583. doi: 10.1111/j.1365-2052.2007.01650.x

Grant, W.; Bowen, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.* 1998, 89, 415–426.

Grasso, N, Aguilar, I, Clariget, J, Lema, M, Brito, G & Navajas, E 2014, 'Genomics of carcass and meat quality traits in Hereford—preliminary results', in *Proceedings of 60th International Congress of Meat Science and Technology*.

Groeneveld, L.; Lenstra, J.; Eding, H.; Toro, M.; Scherf, B.; Pilling, D.; Negrini, R.; Finlay, E.; Jianlin, H.; Groeneveld, E. Genetic diversity in farm animals—A review. *Anim. Genet.* 2010, 41, 6–31.

Guan, X.; Silva, P.; Gyenai, K.; Xu, J.; Geng, T.; Smith, E. Mitochondrial DNA-based analyses of relatedness among Turkeys, *Meleagris gallopavo*. *Biochem. Genet.* 2015, 53, 29–41.

- Guan, X.; Silva, P.; Gyenai, K.B.; Xu, J.; Geng, T.; Tu, Z.; Samuels, D.C.; Smith, E.J. The mitochondrial genome sequence and molecular phylogeny of the turkey, *Meleagris gallopavo*. Anim. Genet. 2009, 40, 134–141.
- Hernández-Sánchez, V 2006, 'Evaluación de los factores socioculturales, económicos y productivos de la crianza del guajolote doméstico en la región costa de Oaxaca', Informe final de servicio social legal de licenciatura. México, DF Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
- Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, Molecular Biology and Evolution, User Manual for SplitsTree4 V4. 13.1; 23(2):254-267, 2006. software available from www.splitsree.org,
- Jerez Salas, MP, Herrera Haro, J & Vásquez Dávila, MA 1994, La gallina criolla en los valles centrales de Oaxaca.
- Jombart, T 2008, 'adeigenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers', Bioinformatics, vol. 24, no. 11, pp. 1403-5.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol Ecol, 16(5), 1099-1106. doi: MEC3089 [pii]
- Kamara, D.; Gyenai, K.; Geng, T.; Hammade, H.; Smith, E. Microsatellite marker-based genetic analysis of relatedness between commercial and heritage turkeys (*Meleagris gallopavo*). Poultry Sci. 2007, 86, 46–49.
- Kong, H. S., Oh, J. D., Lee, J. H., Jo, K. J., Sang, B. D., Choi, C. H., et al. (2006). Genetic Variation and Relationships of Korean Native Chickens and Foreign Breeds Using 15 Microsatellite Markers. Asian-Australas J Anim Sci, 19(11), 1546-1550. doi: 10.5713/ajas.2006.1546
- Kumar, S.; Nei, M.; Dudley, J.; Tamura, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief. Bioinform. 2008, 9, 299–306.
- Langella, O 1999, 'Populations, 1.2. 30', <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Larson, G.; Fuller, D.Q. The evolution of animal domestication. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2014, 45, 115–136.

Leopold, A.S. Wildlife of Mexico: The Game Birds and Mammals, 2nd ed.; University of California Press: London,UK, 1959; pp. 276–280.

Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009, 25, 1451–1452.

Liu, X. H., & Yao, Y. G. (2013). Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*). *Dongwuxue Yanjiu*, 34(E2), E62-68. doi: 10.3724/sp.j.1141.2013.e02e62

Lopez-Zavala, R., Cano-Camacho, H., Chassin-Noria, O., Oyama, K., Vazquez-Marrufo, G., & Zavala-Paramo, M. G. (2013). Genetic diversity and population structure of Mexican domesticated turkeys. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 4(4), 417-434.

Miller, L 1940, 'A new Pleistocene turkey from Mexico', *The Condor*, vol. 42, no. 3, pp. 154-6.

Mock, K.E.; Theimer, T.; Rhodes, O., Jr.; Greenberg, D.; Keim, P. Genetic variation across the historical range of the wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *Mol. Ecol.* 2002, 11, 643–657.

Mock, K.E.; Theimer, T.C.; Wakeling, B.F.; Rhodes, O.E., Jr.; Greenberg, D.L.; Keim, P. Verifying the origins of a reintroduced population of Gould's wild turkey. *J. Wildl. Manag.* 2001, 871–879.

Montenegro, M., Llambi, S., Castro, G., Barlocco, N., Vadell, A., Landi, V., et al. (2015). Genetic characterization of Uruguayan Pampa Rocha pigs with microsatellite markers. *Genet Mol Biol*, 38(1), 48-54. doi: 10.1590/S1415-475738120140146

Okada, A., & Tamate, H. B. (2000). Pedigree Analysis of the Sika Deer (*Cervus nippon*) using Microsatellite Markers (Vol. 17): BIOONE.

Olowofeso, O., Wheto, M., Durosaro, S. O., Bankole, K. O., Adepoju, D. A., & Folarin, O. V. (2016). Combined Exclusion Probabilities of Ten Microsatellite Markers used with Nigerian Chicken Populations

Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. [Article]. *American Journal of Human Genetics*, 51(2), 283-290.

Padilla-Jacobo, G.; Cano-Camacho, H.; López-Zavala, R.; Cornejo-Pérez, M.E.; Zavala-Paramo, M.G. Evolutionary history of Mexican domesticated and wild *Meleagris gallopavo*. *Genet. Sel. Evol.* 2018, 50, 19.

- Page, RD 1996, 'Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers', *Bioinformatics*, vol. 12, no. 4, pp. 357-8.
- Park, S. D. E. (2001). Trypanotolerance in west african cattle and the population genetics effects of selection. Ph.D. dissertation, University of Dublin, Dublin, Ireland.
- Pritchard, JK, Stephens, M & Donnelly, P 2000, 'Inference of population structure using multilocus genotype data', *Genetics*, vol. 155, no. 2, pp. 945-59.
- Reed, K. M., Roberts, M. C., Murtaugh, J., Beattie, C. W., & Alexander, L. J. (2000). Eight new dinucleotide microsatellite loci in turkey (*Meleagris gallopavo*). *Anim Genet*, 31(2), 140.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386): Springer.
- Schnabel, R. D., Ward, T. J., & Derr, J. N. (2000). Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, *Bison bison* and domestic cattle. *Animal Genetics*, 31(6), 360-366. doi: DOI 10.1046/j.1365-2052.2000.00685.x
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. Arlequin: A software for population genetics data analysis. *User Man. Ver 2000*, 2, 2496–2497.
- Schorger, A.W. *The Wild Turkey: Its History and Domestication*; University of Oklahoma: Norman, OK, USA, 1966; Volume 12, p. 41.
- Seidel, S. A., Comer, C. E., Conway, W. C., Deyoung, R. W., Hardin, J. B., & Calkins, G. E. (2013). Influence of Translocations on Eastern Wild Turkey Population Genetics in Texas. *Journal of Wildlife Management*, 77(6), 1221-1231. doi: 10.1002/jwmg.575
- Smith, E. J., Geng, T. Y., Long, E., Pierson, F. W., Sponenberg, D. P., Larson, C., et al. (2005). Molecular analysis of the relatedness of five domesticated turkey strains. *Biochemical Genetics*, 43(1-2), 35-47. doi: 10.1007/s10528-005-1065-5
- Speller, C. F., Kemp, B. M., Wyatt, S. D., Monroe, C., Lipe, W. D., Arndt, U. M., et al. (2010). Ancient mitochondrial DNA analysis reveals complexity of indigenous North American turkey domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 2807-2812.

Steadman, DW 1980, 'A review of the osteology and paleontology of turkeys (Aves: Meleagridinae)', Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County, vol. 330, pp. 131-207.

Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Dimitrijevic, V., & Maletic, M. (2010). Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). Czech Journal of Animal Science, 55(6), 221-226. doi: 10.17221/183/2009-CJAS

Tadano, R, Nishibori, M, Nagasaka, N & Tsudzuki, M 2007, 'Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses', Poultry science, vol. 86, no. 11, pp. 2301-8.

Terwilliger, JD & Ott, J 1992, 'A haplotype-based haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations', Human heredity, vol. 42, no. 6, pp. 337-46.

Thornton, E. K., Emery, K. F., Steadman, D. W., Speller, C., Matheny, R., & Yang, D. (2012). Earliest Mexican Turkeys (*Meleagris gallopavo*) in the Maya region: implications for pre-hispanic animal trade and the timing of Turkey domestication. PLoS One, 7(8), e42630.

Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012, 40, e115–e115.

Vawter, L.; Brown, W.M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. Science 1986, 234, 194–196.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. d. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics and molecular biology, 39(3), 312-328.

Woelders, H, Zuidberg, C & Hiemstra, S 2006, 'Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective', Poultry science, vol. 85, no. 2, pp. 216-22.

Yeh, FC, Yang, R, Boyle, TB, Ye, Z & Mao, JX 1997, 'POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis', Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada, vol. 10, pp. 295-301.

Zhang, Y.; Lu, Y.; Yindee, M.; Li, K.Y.; Kuo, H.Y.; Ju, Y.T.; Ye, S.; Faruque, M.O.; Li, Q.; Wang, Y. Strong and stable geographic differentiation of swamp buffalo maternal and paternal lineages indicates domestication in the China/Indochina border region. Mol. Ecol. 2016, 25, 1530–1550.

