

Caracterización molecular del asno criollo colombiano *Equus asinus* en el departamento
de Sucre usando marcadores moleculares tipo RAMs

Adrian Medina Montes

Trabajo de grado presentado para optar al título de Zootecnista

Director:

Darwin Yovanny Hernández Herrera. *Zoot., M.Sc., Ph.D*

Codirector:

Donicer Eduardo Montes Vergara. *Zoot., M.Sc., Ph.D*

Grupo de Investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético Animal

Universidad de Sucre

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Zootecnia

Sincelejo - Sucre

2019

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del jurado 1

Firma del jurado 2

Dedicatoria

Les dedico a mis padres Cesar Medina Vitola y Filomena Montes Llerena por la motivación que me dan cada día para seguir formándome como profesional, por brindarme su apoyo económico durante mi formación y porque han formado a una persona íntegra y dedicada en cada labor que desempeña, a mis hermanos Cesar Medina Montes, Javier Medina Montes y Cristian Medina Montes, a mis primos Luis Montes y José Montes que a pesar de todo estamos unidos y apoyándonos para ser cada mejor y seguir adelante como familia, a mis amigos Kelly Nuñez; Estivel Valencia, Mauricio Lozano, Oscar Perez que juntos trabajamos durante nuestra formación nos apoyamos entre todos, a mi amiga Adriana Gonzales Peregrino por su motivación y consejos. Le dedico este trabajo y los logros que he alcanzado gracias a su aporte.

Adrian Medina Montes

Agradecimientos

Por medio del presente quiero manifestar mi agradecimiento a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, al programa de Zootecnia por la labor desempeñada por el cuerpo profesoral en mi formación como zootecnista.

También expreso mi agradecimiento a mi profesor y director Darwin Hernández quien me ha permitido realizar esta investigación y dejar una semilla de motivación para seguir realizando investigaciones.

A mis amigos Estivel Valencia Martínez, Kelly Nuñez Paniza, Mauricio Lozano Videz y Oscar Pérez Paternina, que de una u otra forma contribuyeron en la parte logística de recolección de muestras de esta investigación.

A todos los que con su apoyo económico y moral me motivaron a realizar y culminar este trabajo, mi eterno agradecimiento.

Tabla de contenido

Abstract	11
1. Introducción.....	13
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo general.....	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Marco teórico.....	16
3.1. Taxonomía (Álvarez y Medellín, 2005).....	16
3.2. Asno criollo colombiano <i>Equus asinus</i>	16
3.3. Diversidad genética	18
3.4. Métodos para medir la variabilidad genética.....	19
3.4.1. Número de alelos en un <i>locus</i> (A).	19
3.4.2. Número efectivo de alelos en un <i>locus</i> (A_e).	19
3.4.3. Índice de contenido polimórfico (PIC).	20
3.4.4. Heterocigocidad.	20
3.4.5. Prueba de equilibrio Hardy Weinberg.	21
3.5. Distancia y estructura genética.....	22
3.5.1. Estadísticos F de Wright.	22
3.5.2. Medidas de distancia genética.	23
3.6. Marcadores moleculares.....	24
3.6.1. Tipos de microsatélites.	25
3.6.2. Los microsatélites amplificados al azar (RAMs).	25
4. Metodología.....	27
4.1. Número de animales	27
4.2. Colecta de sangre	28
4.3. Extracción y cuantificación de ADN.....	29
4.4. Amplificación por PCR de los marcadores RAMs.....	30
4.5. Electroforesis	31
4.6. Análisis de datos moleculares	32
5. Resultados	34
5.1. Efectividad de los RAMs en la evaluación de la diversidad genética	34
5.2. Diversidad genética y estructura poblacional del asno criollo en el departamento de Sucre.....	39
6. Discusión.....	44

6.1. Efectividad de los RAMs en la evaluación de la diversidad genética	44
6.2. Diversidad genética y estructura poblacional del asno criollo en el departamento de Sucre	45
7. Conclusiones.....	58
8. Recomendaciones	59
9. Bibliografía.....	60

Lista de tablas

TABLA 1. <i>DISTRIBUCIÓN DE TOMA DE MUESTRAS EN LAS SUBREGIONES DE SUCRE</i>	28
TABLA 2. <i>CEBADORES UTILIZADOS EN LA TÉCNICA RAMs (MUÑOZ ET AL. 2008)</i>	30
TABLA 3. <i>PERFILES DE AMPLIFICACIÓN PARA CADA MARCADOR RAMs (MUÑOZ ET AL., 2008).</i>	31
TABLA 4. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CEBADOR CA EN ASNOS CRIOLLOS DE SUCRE COLOMBIA.</i>	34
TABLA 5. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CEBADOR AG EN ASNOS CRIOLLOS DE SUCRE COLOMBIA.</i>	35
TABLA 6. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CEBADOR CCA EN ASNOS CRIOLLOS DE SUCRE COLOMBIA.</i>	36
TABLA 7. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CEBADOR TG EN ASNOS CRIOLLOS DE SUCRE COLOMBIA.</i>	37
TABLA 8. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CEBADOR GT EN ASNOS CRIOLLOS DE SUCRE COLOMBIA.</i>	38
TABLA 9. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN TODOS LOS CEBADORES UTILIZADOS EN ASNOS CRIOLLOS DE SUCRE COLOMBIA.</i>	39
TABLA 10. <i>ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA PARA CADA SUBPOBLACIÓN EVALUADA.</i>	39
TABLA 11. <i>ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR EN LAS CINCO SUBPOBLACIONES DE ASNO CRIOLLO EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE.</i>	41
TABLA 12. <i>DISTANCIAS GENÉTICAS DE NEI ENTRE LAS SUBPOBLACIONES DE ASNO CRIOLLO EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE.</i>	42
TABLA 13. <i>VALORES DE DIVERSIDAD GENÉTICA USANDO MARCADORES RAMs EN ANIMALES.</i>	47
TABLA 14. <i>DIVERSIDAD GENÉTICA DE ASNOS ALREDEDOR DEL MUNDO USANDO MARCADORES MOLECULARES CODOMINANTES (MICROSATÉLITES).</i>	52

Lista de figuras

FIGURA 1. AMPLIFICACIÓN CON EL CEBADOR CCA.....	32
FIGURA 2. <i>DENDROGRAMA DE SIMILITUD CONSTRUIDO A PARTIR DEL ÍNDICE DE NEI-LI, EN LOS ASNOS CRIOLLOS COLOMBIANOS.....</i>	<i>42</i>
FIGURA 3. <i>DENDROGRAMA DE DISTANCIA GENÉTICA ENTRE SUBPOBLACIONES DE ASNO CRIOLLO REALIZADO A PARTIR DEL MÉTODO UPGMA.</i>	<i>43</i>

Resumen

El asno criollo colombiano ha contribuido con el desarrollo de algunos departamentos, estos animales se caracterizan por ser rústicos, adaptados a las condiciones climáticas, por su capacidad de ser alimentados con forrajes de baja calidad nutricional, resistencia a enfermedades, a ectoparásitos, entre otras cualidades ha sido aliadas de los campesinos en las diferentes labores agropecuarias en las son requeridos. Aun así, se encuentra en riesgo de extinción al ser sustituidos algunos de sus usos. Actualmente se desconoce el inventario asnal del país. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar genéticamente el asno criollo colombiano *Equus asinus* en el departamento de Sucre, usando microsatélites amplificados al azar. Para ello se utilizaron 100 individuos ubicados en las cinco subregiones del departamento, se extrajo el ADN y se amplificó por PCR siete cebadores RAMs, dos de los cuales fueron monomórficos y excluidos de los análisis. Se encontraron un total de 291 bandas, 11.96 ± 1.45 en promedio por cebador, el valor más alto en CCA (18 ± 2.23) y el menor en TG y GT (8.8 ± 0.44). El cebador más polimórfico ($88.09 \pm 10.91\%$) y con mayor He (0.376 ± 0.021) fue CA, mientras que el menor fue GT ($34.12 \pm 7.06\%$ y 0.101 ± 0.040 para % de *loci* polimórfico y He, respectivamente), aunque solo en este marcador se encontraron *loci* poco frecuentes. El análisis intrapoblacional mostró un promedio de 66.50 ± 1.72 bandas de las cuales el $89.86 \pm 24.04\%$ fueron polimórficas. La subpoblación GO presento el mayor número de bandas (63) y el menor se encontró en MO (48), sin embargo, el valor más alto % de *loci* polimórfico (81.16%) y He (0.335 ± 0.022) se encontró en la subpoblación MM, siendo esta la más diversa. El promedio de diversidad genética encontrado fue de 0.351 ± 0.021 para toda la población. El análisis de estructura poblacional mostró, un 10% de variación entre subpoblaciones, con un valor de F_{ST} de 0.17 ± 0.01 ($p < 0.05$). Las distancias genéticas entre subpoblaciones ubican a MO y GO como las distantes. Se concluye que los marcadores RAMs con eficientes evaluando la diversidad genética del asno, esta raza criolla tienen

medios valores de diversidad genética, además, que la estructura genética encontrada puede ser resultado de las barreras geográficas naturales en las subregiones estudiadas.

Palabras claves: *burro criollo colombiano, diversidad genética, recurso zoogenético.*

Abstract

The Colombian Creole donkey has contributed to the development of some departments, these animals are characterized by being rustic, adapted to climatic conditions, for their ability to be fed with forages of low nutritional quality, resistance to diseases, ectoparasites, among other qualities. It has been allied of the peasants in the different agricultural tasks in the required ones. Even so, it is at risk of extinction when some of its uses are replaced. The country's asan inventory is currently unknown. The objective of this investigation was to characterize genetically the Colombian Creole donkey *Equus asinus* in the department of Sucre, using random amplified microsatellites (RAM). For this purpose, 100 individuals located in the five subregions of the department were used, DNA was extracted and seven RAMs primers were amplified by PCR, two of which were monomorphic and excluded from the analyzes. A total of 291 bands were found, 11.96 ± 1.45 on average per primer, the highest value in CCA (18 ± 2.23) and the lowest in TG and GT (8.8 ± 0.44). The most polymorphic primer ($88.09 \pm 10.91\%$) and with the highest H_e (0.376 ± 0.021) was CA, while the lowest was GT ($34.12 \pm 7.06\%$ and 0.101 ± 0.040 for % of polymorphic loci and H_e , respectively), although only in this marker, rare loci were found. The intrapopulation analysis showed an average of 66.50 ± 1.72 bands of which $89.86 \pm 24.04\%$ were polymorphic. The GO subpopulation presented the highest number of bands (63) and the lowest was found in MO (48), however, the highest value % of polymorphic loci (81.16%) and H_e (0.335 ± 0.022) was found in the subpopulation MM, this being the most diverse. The average genetic diversity found was 0.351 ± 0.021 for the entire population. The population structure analysis showed a 10% variation between subpopulations, with a F_{ST} value of 0.17 ± 0.01 ($p < 0.05$). The genetic distances between subpopulations place MO and GO as distant ones. In conclusion, the RAMs markers with efficient evaluating the genetic diversity of the donkey, this Creole breed

has average values of genetic diversity, in addition, that the genetic structure found can be the result of the natural geographical barriers in the subregions studied.

Keywords: *colombian creole donkey, genetic diversity, zoogenetic resource.*

1. Introducción

El asno criollo colombiano ha sido un animal que ha contribuido con el desarrollo de algunos departamentos como es el caso del departamento de Sucre, estos animales por su rusticidad, adaptación a las condiciones climáticas, su capacidad para ser alimentados con forrajes de baja calidad nutricional, resistencia a enfermedades, a ectoparásitos, las escasas prácticas de manejo que requiere la especie, bajo costo en su mantenimiento y docilidad, han sido un aliado en el trabajo agropecuario de los campesinos del departamento. Posee una gran fuerza desarrolla entre 20-30Nw en animales de 80Kg a 120Kg, lo que lo hace aprovechable para el trabajo y así sacar los productos obtenidos en los sistemas de producción tradicional como la yuca, el ñame, aguacate, entre otros productos agrícolas (Silva, Rodríguez, Hernández, Zaragoza, 2017).

La llegada de estos animales a estas tierras, data de la época de la colonización, donde según la historia tanto asnales como caballares realizaron la misma travesía para poblar el nuevo mundo (Cardona, 2006).

El asno Criollo está en riesgo de extinción al igual que otras especies criollas de Colombia. En la encuesta nacional agropecuaria de 1995 se estableció que en el país había 319.316 asnos, pero en 2013, dieciocho años después, solo quedaban 63.000, sobrevivieron el 20% (Gossaín, 2016), actualmente, no se conoce el inventario asnal. Una razón que explica esta alarmante disminución en el número de asnos, está asociada al poco uso actual que hacen los campesinos de este animal de trabajo. Medios alternativos de transporte como la motocicleta han incrementado su uso, provocando la disminución del inventario asnal y posiblemente poniendo en alto riesgo el patrimonio genético del país. Situación similar es presentada por Silva-Gómez et al. (2017) con asnales de México.

Al no ser usados los asnos para trabajo, se están usando para otros fines, tales como el comercio y el sacrificio ilegal con el fin de obtener su piel, como se ha venido registrando en los últimos años. Según el periódico El Universal (2016) se registró la matanza ilegal de al menos 91 asnos con el fin de obtener y comercializar su piel, donde 50 de estos casos fueron registrados en el departamento de Sucre, otra práctica comúnmente registrada en los departamentos de la región caribe es el traslado de estos animales al departamento de Antioquia, con el fin de ser sacrificados y aprovechar de su carne y piel. A nivel mundial se reporta que su decremento es de 20% en el censo asnal, debido a la exquisitez de su carne y a la producción con su piel de medicina tradicional china (Salinas, 2017)

Lo anterior denota el gran peligro al que está sometido este recurso genético. En el departamento de Sucre no se registran ningún tipo de estudios genéticos en esta especie por lo que se desconoce su estado actual de diversidad genética. Adicionalmente, solo existe un reporte de un estudio de este tipo en Colombia, donde, con 30 animales usando microsatélites, se encontró una media diversidad genética ($H_e = 0.563$) y ausencia del equilibrio de Hardy Weinberg ($F_{IS} = 0.071$ $p < 0.05$) (Jordana et al., 2016).

Un estudio de caracterización genética en poblaciones de asnos criollos en el departamento de Sucre, permitirá conocer su diversidad y estructura genética, además, será útil como base para investigaciones más usando otros métodos moleculares en esta especie, así como en programas de conservación y utilización del recurso genético local, tal como lo expone Martínez (2010), quién recalca que, se hace importante conocer la diversidad genética de los animales criollos en Colombia con el fin de mantenerla en el transcurso del tiempo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Caracterizar genéticamente el asno criollo colombiano *Equus asinus* en el departamento de Sucre, usando microsátélites amplificados al azar.

2.2. Objetivos específicos

1. Estimar la diversidad genética del asno criollo colombiano usando marcadores moleculares dominantes.

2. Conocer la estructura genética del asno criollo de las cinco subregiones del departamento de Sucre.

3. Marco teórico

3.1. Taxonomía (Álvarez y Medellín, 2005)

Los asnos son la especie de equinos, amoldados a diversas regiones ecológicas, mejor adaptados para vivir en condiciones de alta temperatura; con sus grandes orejas, detectan frecuencias de audio imperceptibles para el humano y disipan su calor corporal; con su olfato, detectan olores a 10 kilómetros de distancia y su aparato digestivo es más resistente que el de los caballos, permitiéndoles consumir más variedades de plantas y extraer de forma más eficiente el agua de los alimentos a diferencia de sus parientes équidos (Silva-Gómez et al., 2017).

- Reino: Animalia
- Phylum: Chordata
- Clase: Mammalia
- Orden: Perissodactyla
- Familia: Equidae
- Nombre científico: *Equus asinus*, Linnaeus (1758).

3.2. Asno criollo colombiano *Equus asinus*.

La llegada de estos animales a estas tierras, está dada en la época de la colonización, donde según la historia tanto asnales como caballares realizaron la misma travesía para poblar el terreno que ahora es Colombia (Cardona, 2006). En Colombia se pueden distinguir las razas de asnos según su origen en Europea, Africana, Norte Americana y la Criolla, esta última producto del cruce sin control de los animales traídos por los españoles durante la conquista, posiblemente formada a partir de las razas Ibéricas: Andaluz-Cordobés (en su

variante de Canarias), la Catalán (la raza mallorquina es una variante de Baleares), el de las encartaciones (en el País Vasco) y el zamorano-leonés (Jumbo et al., 2015).

Los aspectos culturales, el medio ambiente y la selección genética durante todo el transcurrir de los tiempos han fijado características cuya, alzada, conformación, color, temperamento y paso, son muy conocidos nuestro medio (Cardona, 2006). El asno criollo colombiano presenta una talla más pequeña a diferencia de razas africanas, la constitución y pelaje presenta diferencias a la del caballo. El asno criollo se caracteriza por la gran longitud de orejas y el desarrollo de la cabeza, posee inteligencia comparable con la del caballo siendo los asnales son menos efectivos, es un animal terco, astuto y manso. Algunas de sus características fenotípicas son: cabeza grande, orejas largas y caídas, patas cortas, pelaje oscuro o gris. Dentro del comportamiento de estos animales se caracterizan por ser animales ágiles, sobrios y vigorosos (Alzate, 1978).

Si bien es bueno notar que, a lo largo y ancho de todo el país se pueden encontrar asnales, solo algunos son criados teniendo en cuenta parámetros zootécnicos y con esquemas de mejoramiento genética, como lo hace el criadero Villa Luz, del municipio de Girardota Antioquia, que produce asnales como reproductores para la producción de mulares. En el resto de los casos los asnales se crían en condiciones tradicionales por campesinas que los utilizan para los trabajos pesados sin tener en cuenta los respectivos parámetros zootécnicos para el buen mantenimiento de estos animales.

Según ICA (2016), en su censo población, donde son registrados todos lo équidos de trabajo, exposición de ferias conocidos en Colombia, la población actual de asnales podría estar decreciendo, dado que no se tienen datos precisos del número total de la población de esta especie y se dificulta estimar con exactitud el estado de esta población. Si se maneja el estado general de los equinos en Colombia, donde se tiene un total 1.451.085 equinos, el

departamento de Sucre tiene una participación de 3.91% con 56.879 animales. Los principales departamentos con mayor participación en el inventario de equinos son los departamentos de Antioquia con 153.970 (10.61%), seguido por el departamento del Tolima con 118.214 (8.14%), Cundinamarca con una población equina de 109.077 (7.51%) y el departamento de Córdoba con 106.829 (7.36%).

El asno criollo presenta características morfológicas que permiten su fácil identificación, en el caso de asnos criollos de Cuba presentan una altura a la cruz entre 107-110cm, al dorso 106-108cm, esternón 64-66cm, grupa 106.8-109.9cm y a la pelvis 108-112 cm. Dentro de las medidas cefálicas presentan una longitud de 43.8-44.3 cm, ancho 14.0-14.1cm, profundidad 23.6-24.8cm y longitud de las orejas varía entre 22.9-23.5cm. Para las medidas de las extremidades tienen un perímetro del carpo de 21.2-21.4cm, caña 13.6-13.1cm, cuartilla 13.6-13.2cm, corona 19.4-19.6cm y del corvejón 25.5-25.6cm (Jiménez et al., 2016).

3.3. Diversidad genética

La diversidad genética se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. Es el resultado de las diferencias que existen entre las distintas versiones o alelos de las unidades de herencia o genes de los individuos de una especie. Las diferencias heredables constituyen la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas y moldean la variada complejidad de los seres vivos. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. La diversidad genética se considera clave en la conservación de los recursos genéticos y constituye la base de procesos de selección y mejoramiento genético (Bejarano et al., 2012).

3.4. Métodos para medir la variabilidad genética

La diversidad genética representa las variaciones en la secuencia de DNA, lo que a su vez podría resultar en diferencias en las secuencias de proteínas, y esto a su vez reflejarse en diferencias en caracteres físicos (Acuña, 2016). La diversidad genética puede ser evaluada por una serie de índices, tales como; número de alelos y número efectivo de alelos en un *locus*, el índice de contenido polimórfico y heterocigocidad observada y esperada.

3.4.1. Número de alelos en un *locus* (A).

Se considera al número de alelos (a_j) como la cantidad de alelos diferentes expresados en un locus j , variando en un intervalo de $1 < k < a_j$. Y el número total de alelos (A) se expresa como la suma de los n *loci* estudiados en una población i .

$$A = \sum a_j$$

Debe tomarse en consideración que el estadístico depende mucho del tamaño poblacional ya que cuando mayor sea éste, mayor será la probabilidad de detectar alelos raros (AR, frecuencia < 0.05) o alelos muy raros (AmR, frecuencia < 0.01) (Acuña, 2016).

3.4.2. Número efectivo de alelos en un locus (A_e).

Se considera una segunda medida del número de alelos y se define como la probabilidad de que dos alelos de un *locus* elegido al azar en la población sean idénticos por descendencia. Esta probabilidad es igual al inverso de la frecuencia esperada de individuos homocigotos en la población, donde p_i es la frecuencia del i -ésimo alelo en un locus y H_e es la heterocigocidad esperada en un *locus*.

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}$$

Si todos los alelos tuvieran la misma frecuencia, A_e sería proporcional a la heterocigocidad. El valor de A es apoyado por A_e , ya que esta última está menos influenciada por alelos raros y es menos sensible a los tamaños muestrales (Acuña, 2016).

3.4.3. Índice de contenido polimórfico (PIC).

Según Aranguren et al. (2005) es similar al valor de heterocigocidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo.

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum (2p_i^2 p_j^2)$$

3.4.4. Heterocigocidad.

La heterocigocidad esperada (H_e) es la probabilidad de que, en un *locus* único, cualquier par de alelos escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. Representa una mejor medida de la variación genética, ya que es precisa y no arbitraria. La heterocigocidad la podemos estudiar como H_o y H_e . El H_o se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra, para cualquiera de los *loci* y se calcula por cómputo directo. Mientras que, la H_e , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Aranguren et al., 2005).

Este parámetro es distinguido por representar el grado de diversidad genética e un determinado *locus* (H_i) y su promedio en N *loci* dentro de una población es la mejor medida general de la diversidad genética (Acuña, 2016).

$$H_e = \frac{1}{N} \left[\sum_{i=1}^N H_i \right]$$

3.4.5. Prueba de equilibrio Hardy Weinberg.

Representa a una población grande de individuos diploides, con apareamiento al azar y libre de los efectos de mutación, migración y selección natural. Cuando estas condiciones se cumplen, las frecuencias alélicas no cambian y las frecuencias genotípicas se estabilizan después de una generación y son constantes de generación en generación y además existe una relación entre ambas en las proporciones. Así, una población con frecuencias alélicas y genotípicas constantes, se dice que está en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Acuña, 2016). Cuando la población se desvía de manera significativa de estas proporciones se habla de desequilibrio y se puede medir mediante el índice de fijación F (Aranguren et al., 2005), el cual se expresa para un *locus* cualquiera.

$$F = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$$

Siendo H_e y H_o la heterocigocidad esperada y observada respectivamente para ese *locus*. Cuando el F es igual a cero se indica que la población está en equilibrio, mientras que, si F es diferente de cero, ya sea en forma positiva o negativa, indicara que existe exceso o falta de heterocigotos.

3.5. Distancia y estructura genética

Las distancias genéticas pueden ser divididas en dos grandes grupos. El primero incluye las llamadas distancias geométricas, que solo reflejan el parecido entre poblaciones con respecto a las frecuencias alélicas presentes en determinados sistemas genéticos y el segundo grupo se basa en las distancias en los modelos de evolución donde la variación se atribuye principalmente a la acción de mutaciones, asumiendo que los marcadores utilizados no están sujetos a la selección natural (Aranguren et al., 2005; Demarchi, 2009; Acuña, 2016).

3.5.1. Estadísticos F de Wright.

Es el utilizado con mayor frecuencia. Este método introducido por Wright, (1951) se basa en la idea de que la subdivisión de una población lleva un efecto similar a la endogamia y con esto se hace posible medir el efecto en términos de reducción en la proporción de genotipos heterocigotos. La población subdividida tiene tres niveles de complejidad, siendo estos el individuo (I), subpoblaciones (S), población total (T). La siguiente terminología evita confusiones y con estas se admite también la posibilidad de cruzamientos no al azar dentro de cada subpoblación). Dónde: H_I es heterocigocidad de un individuo en una subpoblación. Se interpreta como la heterocigocidad promedio de todos los genes de un individuo o la probabilidad de heterocigocidad de cualquiera de los genes, es el promedio de heterocigocidad observada considerando todas las subpoblaciones. H_S es la heterocigocidad esperada de un individuo en una subpoblación equivalente, con las mismas frecuencias alélicas que presentara cruzamientos al azar (equilibrio Hardy-Weinberg), esta representa el nivel de heterocigocidad que se encontraría en una subpoblación si se dieran cruzamientos al azar. H_T es la heterocigocidad esperada de un individuo en la población total equivalente (suma de todas las subpoblaciones) con cruzamientos al azar (equilibrio Hardy-Weinberg).

Representa la heterocigocidad que se hallaría si se agruparan todas las subpoblaciones y se dieran cruzamientos al azar en la población total (Solarte et al., 2009).

Así, es posible calcular la deficiencia o exceso de heterocigotos a nivel intrapoblacional (F_{IS}) o entre poblaciones (F_{IT}) al igual que el flujo de genes entre las subpoblaciones (F_{ST}).

El efecto de la subdivisión de la población se mide por un parámetro denominado índice de fijación, que es la reducción promedio en la heterocigocidad de una subpoblación debido a la deriva genética por azar. F_{ST} es siempre mayor o igual a cero, debido al efecto Wahlund que asegura que $H_T > H_S$ media. Si todas las subpoblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg con las mismas frecuencias alélicas, entonces $F_{ST}=0$ (Engels, 2004).

3.5.2. Medidas de distancia genética.

Para las distancias genéticas se tienen una división establecidas en dos grupos, en uno de ellos se es incluida las distancias geométricas que solo reflejan la semejanza que se tiene entre poblaciones, en el otro grupo se encuentran las frecuencias alélicas que están en un determinado sistema genético sin asumir un supuesto evolutivo.

Se puede decir que cuanto más parecidas las frecuencias alélicas de dos poblaciones, el grado de diferencia es menor entre ellas, esto se debe a que un único *locus* proporciona una información limitada sobre las igualdades entre poblaciones por lo que se utiliza la información de varios de estos sistemas genéticos. Con el fin de procesar esta información se han desarrollado una serie de parámetros matemáticos (índices de distancia genética) que permiten combinar las frecuencias alélicas de distintos sistemas genéticos en una sola medida, que pretende ser indicativa de la diferencia que existe entre dos poblaciones desde el punto de vista genético. Para datos de electroforesis de proteínas o de ADN, las medidas más empleadas de distancia genética son las de Rogers (1972) y las de Nei (1972).

Distancia de Roger. Para un determinado *locus* con k alelos, si x_i e y_i son las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y , respectivamente, la D de Roger se define como:

$$D = \sqrt{0,5 \sum_{i=1}^k (X_i - Y_i)^2}$$

Donde, la sumatoria es para todos los alelos. Cuando se consideran los datos de varios *loci*, la estima de la distancia genética promedio se calcula como la media aritmética de los valores calculados para cada uno de los *loci*, la distancia genética de Roger puede tomar valores entre cero y uno, la similitud de Roger está dada por: $S=1-D$.

Distancia genética normalizada de Nei. Para un determinado *locus* con k alelos, si x_i e y_i son las frecuencias del alelo i en las poblaciones X e Y , identidad genética (similitud) es:

$$I = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

El valor de I de Nei va de cero a uno. La distancia genética normalizada de Nei se calcula como $D=-\ln I$, y puede adquirir valores entre cero e infinito.

3.6. Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares son una herramienta que permite conocer cómo se encuentran establecidos los genes de una población, realizando un estudio de manera indirecta, que se puede hacer por análisis de proteínas, otra forma de hacer este estudio es de forma directa realizado con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores empleados en estudios poblacionales o estudios evolutivos se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Acuña, 2016). Entre algunas técnicas disponibles para estudiar la diversidad genética a nivel del ADN se

encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) polimorfismo amplificado al azar, AFLP (amplified fragment length polymorphism) polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados, microsatélites y los microsatélites amplificados al azar RAMs (Random Amplified Microsatellites) (Muñoz et al., 2008).

3.6.1. Tipos de microsatélites.

Según Acuña (2016) los microsatélites pueden clasificarse por la longitud de las unidades de repetición o por el patrón que estos puedan presentar. En el caso de la longitud de unidades dentro de las secuencias repetitivas se pueden encontrar dinucleótidos (dos nucleótidos en cada unidad de repetición), trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos. Para estos tipos de microsatélites existen desde 4, 16, 64, 256, 1024 y 4096 motivos respectivamente, donde las repeticiones penta y hexanucleótidos son los menos comunes y los tetranucleótidos los más populares y recomendables.

3.6.2. Los microsatélites amplificados al azar (RAMs).

Los RAMs combinan los beneficios de los RAPD seleccionando cebadores con una longitud aproximada de 18 pares de bases que incluyen un extremo 5' degenerado de tres nucleótidos, el cual es utilizado para asegurar el anclaje del cebador al microsatélite y un motivo repetido de entre dos y tres nucleótidos. Los RAMs se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método es ampliamente reproducible y permite detectar polimorfismos de ADN intra e inter específico (Muñoz et al., 2008).

La técnica solo utiliza un cebador de secuencia arbitraria, por lo que la secuencia blanco también lo es. Solo amplifica un alelo por *locus*, por lo que son de naturaleza dominante, sin embargo, como el rango evolutivo de los microsatélites es más alto que cualquier otro tipo de ADN, hay gran probabilidad de encontrar polimorfismos mediante los RAMs (Muñoz et al., 2008). Los RAMs son altamente variables, permiten evaluar similitudes entre poblaciones

relacionadas, son de fácil implementación y de bajo costo pues no usan enzimas ni múltiples PCR.

Los RAMs has sido empleados para evaluar la diversidad genética en cerdos (Oslinger et al., 2006), bovinos (Piedrahíta et al., 2008), peces (Caetano et al., 2012; Hernández et al., 2017), patos (Hernandez et al., 2007; Acuña, 2016) varios tipos de plantas (Muñoz et al., 2008) y hongos (Hantula et al., 1996).

4. Metodología

4.1. Número de animales

Debido a que no existen datos confiables del número de asnales en el departamento de Sucre el número de individuos fue establecido en 20 individuos por cada subregión así:

- Montes de María (MM)=20
- Sabanas (SA)=20
- Golfo de Morrosquillo (GO)=20
- San Jorge (SJ)=20
- Mojana (MO)=20

Para un total de 100 individuos. Los criterios de inclusión de los individuos fueron:

- Animales mayores de 2 años de edad.
- Sin importar el sexo.
- Sin evidencia de padecer alguna enfermedad.
- Si fueron muestreados en una misma finca, lo menos emparentado posible, según información dada por el propietario.
- Presentar las características morfológicas de asnales criollos, según lo reportado por (Jiménez et al., 2016).

La distribución del tamaño de muestra por cada subregión del departamento se muestra en la Tabla 1. Adicionalmente, se colectaron dos muestras de caballo para ser utilizadas como testigos, estos individuos se colectaron en la subregión Golfo de Morrosquillo.

Tabla 1.
Distribución de toma de muestras en las subregiones de Sucre

Subregión	Municipio/Localidad	N
Montes de María (MM)	Chinulito	8
	El parejo/Coloso)	4
	Arenita/Coloso)	8
Sabanas (SA)	Vélez	3
	Patillal	1
	Callejón	9
	Palmital	5
	La Aventura	2
Golfo de Morrosquillo (GO)	Berlín	7
	Palito Monte	4
	Palito	8
	Chorro	1
San Jorge (SJ)	Belén	7
	Palo Alto	5
	Candelaria	3
	Buena Vista	5
La Mojana (MO)	Majagual	20
Total		100

Fuente: autor de la investigación. N= el número de animales muestreados en cada localidad de las regiones en estudio.

4.2. Colecta de sangre

Se tomaron muestras de sangre de 100 asnos criollos y los dos individuos controles se realizó mediante venipunción de la vena yugular usando tubos con anticoagulante (EDTA 7,2mg) previa desinfección del área.

Las muestras de sangre fueron transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de Genética y Reproducción Animal de la Universidad de Sucre y conservadas a 4°C hasta su uso.

4.3. Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo ADN de la sangre de los animales usando el kit de extracción comercial QIAamp DNA Mini Kit 250, según las instrucciones del fabricante, rápidamente:

1. Preparación de Buffers: Buffer AW1 y AW2 según recomendación del fabricante.
2. Se prepararon dos juegos de tubos eppendorf de 1.5 ml marcándolos en la tapa y en el cuerpo del tubo con la numeración asignada a cada individuo.
3. En un tubo eppendorf se agregó 20 μ l de proteinasa K, 200 μ l de la muestra de sangre y 200 μ l del buffer AL. Se mezcló usando vórtex por 15 segundos.
4. Se incubó en baño María a 56°C durante 10 minutos.
5. Se agregó 200 μ l de etanol al 96% y se mezcló usando el vórtex por 15 segundos, después se centrifugó en spin-short.
6. Se pasó cuidadosamente la mezcla obtenida en el paso anterior a la columna provista por el kit y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, posterior a esto se pasó la columna al tubo nuevo de colecta.
7. Se agregaron 500 μ l del buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.
8. Se adicionaron 500 μ l del buffer AW2 y se centrifugó a 13400 rpm durante 5 minutos, asegurando de que todo el buffer AW2 pasara por la columna, se pasó la columna al tubo nuevo de colecta y se eliminó el tubo con el filtrado anterior.
9. Por último, se agregó a la columna 150 μ l del buffer AE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos.
10. Se eliminó la columna del proceso anterior y el ADN fue almacenado a temperatura de -20°C hasta su uso.

El ADN fue cuantificado cuantitativa y cualitativamente usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000TM (Thermo Fisher Scientific). En promedio la concentración del ADN

extraído fue de 56 ng/μl y una relación de absorbancia 260/280 de 1.82 lo que muestra una adecuada calidad del mismo. El ADN fue diluido a 10ng/μl para las reacciones de amplificación de los cebadores RAMs.

4.4. Amplificación por PCR de los marcadores RAMs

Se amplificaron cinco de siete marcadores RAMs que se describen en la Tabla 2, en razón a que los cebadores CGA y CT fueron monomórficos. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 12.5μl que contenían entre 20 y 40ng/μl de ADN, 250mM de cada cebador y 1X del súper mix MangoMix™ (Bioline©). Los programas de termociclado se detallan en la Tabla 3. En cada ronda de amplificación se utilizaron los testigos positivos (caballos) y testigos negativos (mix sin ADN molde).

Tabla 2.

Cebadores utilizados en la técnica RAMs (Muñoz et al. 2008)

Cebador	Secuencia 5'-3'	ng/ADN
CCA	*DDB(CCA) ₅	20
GT	VHV(GT) ₇ G	30
AG	HBB(AG) ₇ A	20
TG	VHV(TG) ₇ T	20
CA	DBDA(CA) ₇	25

Fuente: autor de la investigación. *Designación de sitios degenerados: H (A o T o C), B (G o T o C), V (G o A o C) y D (G o A o T).

4.5. Electroforesis

Los productos de PCR fueron mezclados en una proporción de 3:1 con EZ-VISION I DNA dye (ambresco®) como buffer de carga y sometidos a electroforesis vertical en una cámara marca Cleaver con geles de tamaño 170mm x 86mm x 1,2mm. Los geles de poliacrilamida se hicieron al 8% con una relación 37:1 de acrilamida: bisacrilamida al 38%. Se corrieron a 160 voltios durante 60 minutos.

Los geles fueron observados y foto documentados bajo luz ultra violeta en un transiluminador UVP Benchtop UV Transilluminators: Single UV de intensidad variable. Se usó un marcador de peso molecular de 100bp (GelPilot 100 bp Plus Ladder, Quiagen®) como guía para la lectura de las bandas al igual que los testigos (Figura 1).

Tabla 3.

Perfiles de amplificación para cada marcador RAMs (Muñoz et al., 2008).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 minutos
Ciclos de amplificación: 37		
Desnaturalización	95	30 segundos
CA	54	
AG		
Hibridación	50	45 segundos
CCA		
TG		
GT		
Extensión	72	2 minutos
Extensión final	72	7 minutos

Fuente: autor de la investigación.

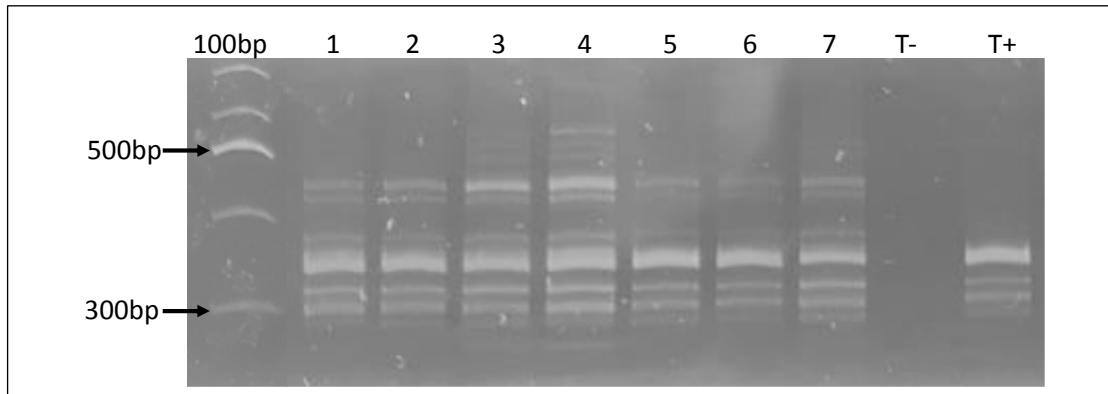


Figura 1. Amplificación con el cebador CCA.

Fuente: autor de la investigación. Marcador de 100pb, carriles 1-7 asnos criollos colombianos; T-, testigo negativo; T+, testigo positivo (Caballo)

4.6. Análisis de datos moleculares

Para el análisis de datos se realizó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0) de banda por cada cebador y subpoblación.

Los análisis se desarrollaron en dos sentidos, primero para conocer la efectividad de cada uno de los cebadores RAMs en evaluar de la diversidad genética de toda la población y segundo para conocer la diversidad y estructura genética de las subpoblaciones y de toda la población utilizando todo el conjunto de datos generados por los RAMs.

En cada uno de los análisis se determinó: el número de *loci*, el porcentaje de *loci* polimórfico, el número de *loci* con alelos pocos frecuentes (<1%) y la heterocigocidad esperada (H_e), usando el programa GenAlex ver 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

Se calculó y graficó mediante un dendrograma de similitud genética entre todos los individuos utilizando el coeficiente de Nei-Li (DICE) con el programa NTSYS ver 2.0 (Leung et al., 1993).

Se realizó un análisis de varianza molecular entre las poblaciones para estimar el F_{ST} con el programa GenAlex ver 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) y las distancias genéticas de Nei entre las subpoblaciones fue calculada usando el programa TFPGA ver 1.3 y se graficó con el método UPGMA usando el programa MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

5. Resultados

5.1. Efectividad de los RAMs en la evaluación de la diversidad genética

En la Tabla 4, se presentan los índices de diversidad genética para el cebador CA en cada subpoblación de asno criollo. Un igual número de *loci* y % de *loci* polimórfico se encontró en las poblaciones MM, SA, GO y SJ, pero, con valores diferentes de He, donde el mayor valor fue de 0.460 ± 0.015 para la subpoblación GO. La subpoblación MO presentó los menores índices con este marcador. No se encontraron *loci* poco frecuente en este marcador.

Tabla 4.

Índices de diversidad genética para cebador CA en asnos criollos de Sucre Colombia.

Población	No. <i>loci</i>	% <i>loci</i> polimórfico	<i>loci</i> poco frecuentes	He
MM	11	100%	0	0.449 ± 0.014
SA	11	100%	0	0.402 ± 0.023
GO	11	100%	0	0.460 ± 0.015
SJ	11	100%	0	0.379 ± 0.041
MO	8	45.45%	0	0.188 ± 0.065
Promedio	10.4 ± 1.34	$88.09 \pm 10.91\%$	0	0.376 ± 0.021

Fuente: autor de la investigación. He= valor de heterocigocidad; MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

Para el cebador GA, se observó un mayor número de bandas se en las subpoblaciones MM, SA y GO, teniendo 13 *loci* para cada una. En cuanto al porcentaje de *loci* polimórfico se encontró un 84.62% en la subpoblación SA siendo esta la de mayor porcentaje con respecto a las otras subpoblaciones, para la He el valor más alto fue de 0.348 ± 0.051 en la subpoblación SA, al contrario, la subpoblación GO presentó el menor valor (0.215 ± 0.058) como se indica en la Tabla 5. No se encontraron *loci* poco frecuente en este marcador.

El número de *loci* encontrado en el marcador CCA, fue el mismo en las subpoblaciones MM, SA, GO y SJ, sin embargo, en las subpoblaciones MM y SA todos los *loci* encontrados fueron polimórficos y en las subpoblaciones SJ y GO fueron de 94.74% y 89.47% respectivamente. De otro lado, el valor He en la subpoblación MM fue la más alta. En contraste a lo anterior, en la subpoblación MO las 14 bandas encontradas fueron monomórficas (Tabla 6).

Tabla 5.
Índices de diversidad genética para cebador AG en asnos criollos de Sucre Colombia.

Población	No. <i>loci</i>	% <i>loci</i> polimórfico	<i>loci</i> poco frecuentes	He
MM	13	76.92%	0	0.338±0.055
SA	13	84.62%	0	0.348±0.051
GO	13	61.54%	0	0.215±0.058
SJ	11	61.54%	0	0.239±0.061
MO	11	53.85%	0	0.223±0.060
Promedio	12.2±1.09	67.69±5.65%	0	0.273±0.057

Fuente: autor de la investigación. He= valor de heterocigocidad; MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

Tabla 6.

Índices de diversidad genética para cebador CCA en asnos criollos de Sucre Colombia.

Población	No. <i>loci</i>	% <i>loci</i> polimórfico	<i>loci</i> poco frecuentes	He
MM	19	100%	0	0.435±0.016
SA	19	100%	0	0.398±0.021
GO	19	89.47%	0	0.349±0.039
SJ	19	94.74%	0	0.345±0.034
MO	14	0.00%	0	0.000±0.00
Promedio	18±2.23	76.84±19.31%	0	0.305±0.022

Fuente: autor de la investigación. He= valor de heterocigocidad; MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

En la Tabla 7 se presentan los índices de diversidad genética para el cebador TG en cada subpoblación de asno criollo, en las subpoblaciones MM, SA, GO y SJ se encontraron 9 bandas, todas polimórficas en las últimas tres subpoblaciones y con un valor de 88.89% en MM. El de valor de He de 0.405±0.033 para la subpoblación GO fue el mayor valor entre las subpoblaciones. Un comportamiento diferente es observado en la subpoblación MO dado que en esta se tienen valores inferiores a los antes mencionados, con un He de 0.138±0.069, 33.33% de *loci* polimórficos y solo ocho *loci*. En cuanto a los *loci* poco frecuentes en este cebador, al igual que los anteriores no se evidenciaron.

Tabla 7.

Índices de diversidad genética para cebador TG en asnos criollos de Sucre Colombia.

Población	No. <i>loci</i>	% <i>loci</i>		He
		polimórfico	<i>loci</i> poco frecuentes	
MM	9	88.89%	0	0.358±0.057
SA	9	100%	0	0.378±0.047
GO	9	100%	0	0.405±0.033
SJ	9	100%	0	0.396±0.035
MO	8	33.33%	0	0.138±0.069
Promedio	8.8±0.447	84.44±12.96%	0	0.335±0.0482

Fuente: autor de la investigación. He= valor de heterocigocidad; MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

Para el marcador GT (Tabla 8), en las subpoblaciones GO y SJ se encontraron los únicos *loci* poco frecuentes, diferenciando a este marcador de los demás. Se observó el mayor % de *loci* polimórfico en las subpoblaciones MM y GO, pero un mayor número de *loci* en la última. La subpoblación con menor número de *loci* para este marcador es SA, pero es la subpoblación MO con un He de 0.049±0.033 la de menor valor de diversidad.

Tabla 8.
Índices de diversidad genética para cebador GT en asnos criollos de Sucre Colombia.

Población	No. <i>loci</i>	% <i>loci</i>		
		polimórfico	<i>loci</i> poco frecuentes	He
MM	10	47.06%	0	0.133±0.041
SA	6	23.53%	0	0.095±0.045
GO	11	47.06%	2	0.134±0.045
SJ	10	41.18%	1	0.095±0.036
MO	7	11.76%	0	0.049±0.033
Promedio	8.8±2.16	34.12±7.06%	0,6	0.101±0.040

Fuente: autor de la investigación. He= valor de heterocigocidad; MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

El resumen de los promedios de las Tablas 4 a la 8, se presentan en la Tabla 9.

Se encontraron un total de 69 bandas, totalizando todos los cebadores RAMs utilizados. El número promedio de *loci* encontrado fue 11.96±1.45 con mayor valor en el cebador CCA con 18±2.23 *loci* y menor en TG y GT (8.8±0.44), para él % de *loci* polimórfico se observa que GT también es el cebador con menor valor con (34.12±7.06%), pero es el único cebador que presenta *loci* poco frecuentes (0.6) y el menor promedio de He (0.101±0.040). De otro lado, los valores mayores de He (0.376±0.021) y % de *loci* polimórfico (88.09±10.91%) se encontraron en el marcador CA.

Tabla 9.
Índices de diversidad genética en todos los cebadores utilizados en asnos criollos de Sucre Colombia.

Cebador	No. Loci	%loci polimorfo	Loci poco frecuentes	He
CA	10.4±1.34	88.09±10.91%	0	0.376±0.021
AG	12.2±1.09	67.69±5.65%	0	0.273±0.057
CCA	18±2.23	76.84±19.31%	0	0.305±0.022
GT	8.8±2.16	34.12±7.06%	0.6	0.101±0.040
TG	8.8±0.447	84.44±12.96%	0	0.335±0.0482
Promedio	11.96±1.45	70.24±11.18%	0	0.278±0.0376

Fuente: autor de la investigación He= valor de heterocigidad

5.2. Diversidad genética y estructura poblacional del asno criollo en el departamento de Sucre.

El número de total de *loci* encontrados fue de 291, en promedio se encontraron 66.50±1.72 *loci* por subpoblación, siendo GO la de mayor número de bandas y MO la de menor (Tabla 10).

Tabla 10.
Índices de diversidad genética para cada subpoblación evaluada.

Población	No. <i>loci</i>	% <i>loci</i> polimórfico	<i>loci</i> poco frecuentes	He
MM	62	81.16%	0	0.335±0.022
SA	58	78.26%	0	0.312±0.023
GO	63	76.81%	2	0.296±0.024
SJ	60	76.81%	1	0.276±0.023
MO	48	24.64%	0	0.102±0.022
Toda la población	66.50±1. 72	89.86±24.04%	0.12	0.351±0.021

Nota: He= valor de heterocigidad; MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

El 89.86% de los *loci* encontrados fueron polimórficos, para este indicador de diversidad genética la subpoblación MM presentó el mayor valor, seguido por SA, GO y SJ. La subpoblación MO presentó solo un 24.64% de *loci* polimórficos.

En tres de las cinco subpoblaciones evaluadas no se encontraron *loci* poco frecuentes, estos solo se encontraron en las subpoblaciones GO con dos *loci* y en SJ con un solo *loci*, para un total de 3 *loci* correspondientes al 1.03% del total de *loci* encontrados.

La He promedio estimada fue de 0.351 ± 0.021 , la subpoblación MM presentó el mayor valor (0.335 ± 0.022) y la subpoblación MO el menor valor (0.102 ± 0.022). En las otras tres subpoblaciones los valores variaron entre 0.276 y 0.312.

El dendrograma construido a partir del índice de similitud de Nei-Li se presenta en la figura 2. Los animales usados como Out group se separan de los asnos criollos a un valor aproximado de 0.5 de similitud. No se encontró una asignación precisa de los individuos en cada subpoblación. Con una similitud cercana al 60% la mayoría de los individuos se separan en dos grupos, norte y sur del departamento. A 0.70 de similitud la mayoría de los individuos de las subpoblaciones MM, SA y GO se agrupan, los individuos de las subregiones SJ y MO se ven relacionados con animales provenientes de las subregiones MM y SA con diferentes valores de similitud.

El análisis de varianza molecular mostró una variación entre subpoblaciones del 10% y al interior de las subpoblaciones de 90% (Tabla 11), obteniendo un valor de F_{ST} de 0.17 ± 0.01 .

Tabla 11.
Análisis de varianza molecular en las cinco subpoblaciones de asno criollo en el departamento de Sucre.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	% de Varianza molecular
Entre subpoblaciones	4	42.66	10%
Dentro de subpoblaciones	95	16.03	90%
Total	99		100%

Fuente: autor de la investigación.

El análisis de relación entre las subpoblaciones indica que la mayor distancia genética se encontró entre la subpoblación MO y las otras subpoblaciones, siendo la más alta la distancia con GO. De otro lado, los valores de distancia variaron entre 0.0745 y 0.1594 (Tabla 12). En la Figura 3 se puede observar un dendrograma de distancia genética entre subpoblaciones realizado a partir del método UPGMA.

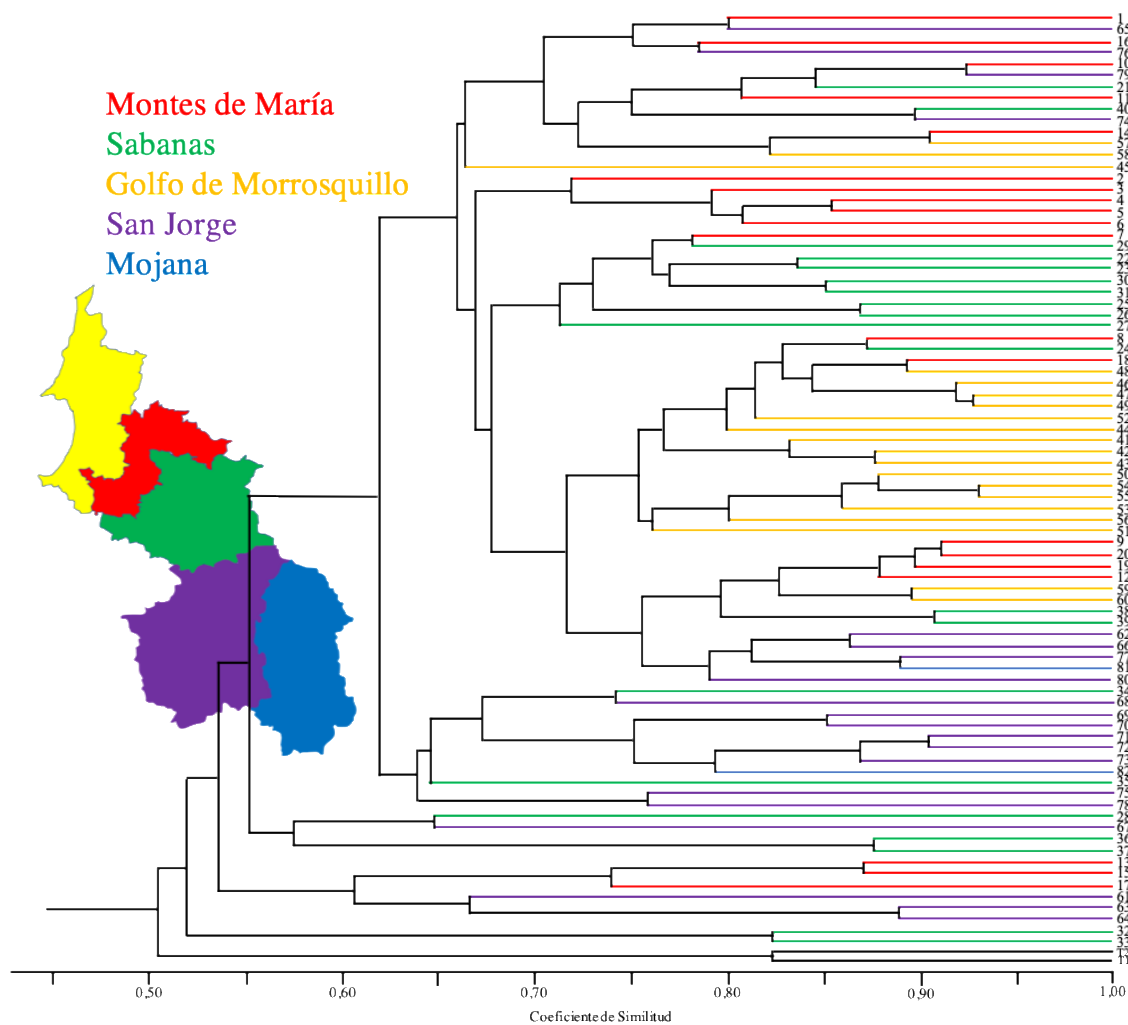


Figura 2. Dendrograma de similitud construido a partir del índice de Nei-Li, en los asnos criollos colombianos.

Fuente: autor de la investigación. T1 y T2 caballos usados como testigos (Out group) Mapa del departamento de Sucre, los colores corresponden a cada una de las subregiones (Amarillo: GO, Rojo: MM, Verde: SA, Morado: SJ y Azul: MO)

Tabla 12.
Distancias genéticas de Nei entre las subpoblaciones de asno criollo en el departamento de Sucre.

	MM	SA	GO	SJ	MO
MM	xxxx				
SA	0.0745	xxxx			
GO	0.0916	0.1367	xxxx		
SJ	0.0991	0.0980	0.1594	xxxx	
MO	0.2306	0.2409	0.2698	0.1782	xxxx

Nota: MM= Montes de María; SA= Sabanas; GO= Golfo de Morrosquillo; SJ= San Jorge; MO= Mojana

Con un valor de certeza de 100% la subpoblación de MO se separa de las otras, la subpoblación GO es intermedia entre MO y un grupo formado por las subpoblaciones MM, SA y SJ que se agrupan con un valor de certeza de 60% a una distancia aproximada de 11.25%. Las subpoblaciones de SA y MM son las cercanas genéticamente.

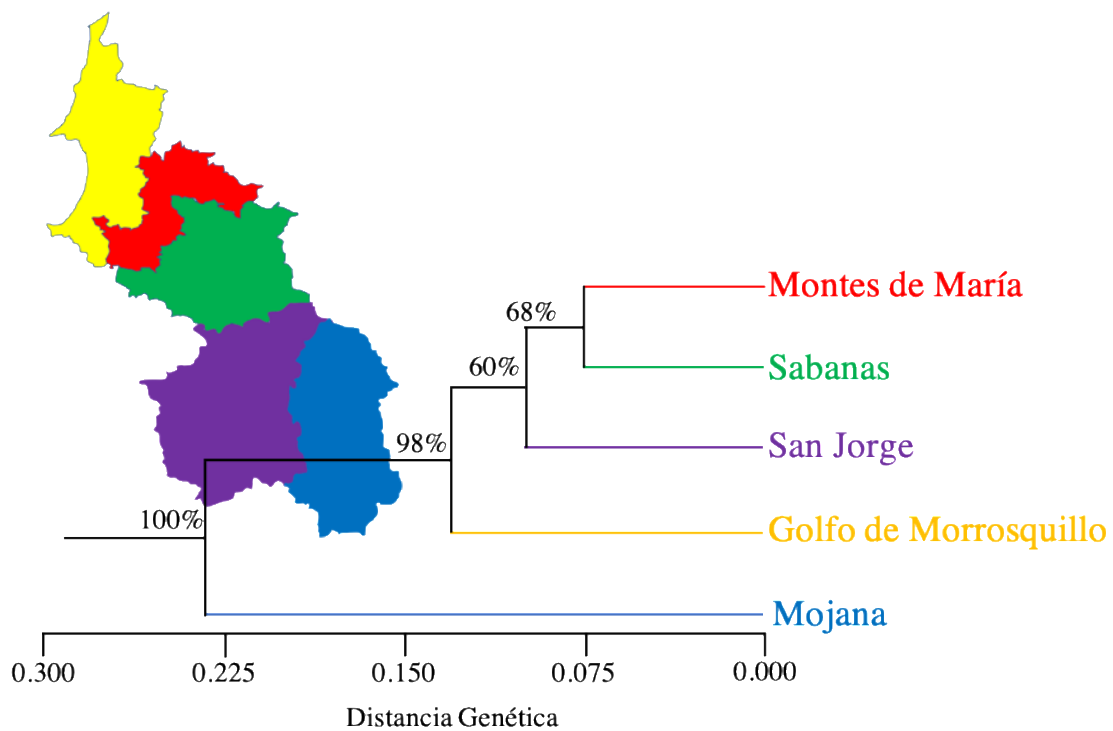


Figura 3. Dendrograma de distancia genética entre subpoblaciones de asno criollo realizado a partir del método UPGMA.

Fuente: autor de la investigación. Mapa del departamento de Sucre, los colores corresponden a cada una de las subregiones (Amarillo: GO, Rojo: MM, Verde: SA, Morado: SJ y Azul: MO)

6. Discusión

6.1. Efectividad de los RAMs en la evaluación de la diversidad genética

Los microsatélites amplificados al azar (RAMs, por sus siglas en inglés) se desarrollaron para evaluar la diversidad genética en hongos (Hantuala et al., 1996), sin embargo, su utilización se ha ampliado a especies animales y vegetales, en estos últimos Muñoz et al. (2008) hace un buen resumen de diversos trabajos.

Es necesario recalcar que no existen reportes de la utilización de marcadores tipo RAMs para el estudio de la diversidad genética en el asno criollo de Colombia, convirtiendo a este trabajo en el primer reporte.

Sin embargo, en otras especies, en bovinos, Piedrahíta et al. (2008) encontraron que los marcadores CGA y CT eran monomórficos, lo cual concuerda con esta investigación, los marcadores restantes CCA, GT, AG, TG y CA, generaron 52 bandas. En cerdos, 46 *loci* se encontraron con los cebadores CCA, CT y CGA y reportan como monomórficos a los marcadores AG y CA (Oslinger et al., 2006). En el bocachico (*Prochilodus magdalenae*), los siete marcadores aquí descritos fueron polimórficos, reportando 106 bandas y al marcador CCA como el mayor aportante a este indicador (Hernández et al., 2017), esto concuerda con nuestros resultados. En patos criollos (*Cairina moschata*), solo tres cebadores se reportan como polimórficos (CA, CCA y CGA), pero con 116 *loci* encontrados (Hernandez et al., 2007), un valor más alto al aquí presentado.

El porcentaje de *loci* polimórfico encontrado en el bocachico (95.40%) fue superior al encontrado en el asno criollo. En el bocachico el marcador AG presentó el mayor valor (99.17%) de porcentaje de *loci* polimórfico y CA el menor (93.33%) (Hernández et al., 2017). De otro lado, el El porcentaje de *loci* polimórfico encontrado en el pato criollo (61.20%) fue menor al aquí reportado, teniendo al marcador CA (76.19%) como el que más

aporta a este indicador y al marcador CCA (50%) como el que menos aporta (Hernandez et al., 2007). Nuestros resultados concuerdan con este último trabajo en que el marcador CA tiene el mayor valor.

Respecto al valor de heterocigocidad esperada (H_e), en bovinos el mayor valor se encontró con el cebador GT (0.35) y el menor con CA (0.20) (Piedrahíta et al., 2008) esto último difiere a lo aquí presentado, pues en la población de asnos estudiada el marcador GT fue el de menor valor de H_e . En cerdos el mayor valor de H_e fue para CCA (0.22 ± 0.07) y el menor para CT (0.19 ± 0.07) (Oslinger et al., 2006), en esta investigación CT fue monomórfico. En el bocachico el marcador AG presentó el mayor de H_e (0.469 ± 0.005) y CCA el menor valor (0.321 ± 0.01) (Hernández et al. 2017). El marcador CGA en patos criollos presentó el mayor valor de H_e (0.23) y el menor se encontró en CCA (0.16) (Hernandez et al., 2007), de los anteriores CGA fue monomórfico en la población de asnos criollos estudiada.

6.2. Diversidad genética y estructura poblacional del asno criollo en el departamento de Sucre

Este es el primer estudio de investigación que se ha realizado en Colombia sobre la diversidad y estructura genética de los asnos criollos, utilizando marcadores moleculares dominantes.

La técnica RAMs ha sido ampliamente utilizada en la caracterización genética, de diversas especies (Tabla 12). El valor de la diversidad genética en esta investigación fue de $H_e=0.351$, valor más alto que los reportados en estudios realizados en las diferentes razas de Cerdos (Oslinger et al., 2006), en bovinos (Piedrahíta et al., 2008), en aves (Hernández et al., 2007) y en peces (Caetano et al., 2012; Lopez-García, 2012), el único valor que estuvo por encima al reportado por este estudio fue el del pez *Prochilodus magdalenae* con valor $H_e=0.394$ (Hernández et al 2017).

Tabla 13.

Valores de diversidad genética usando marcadores RAMs en animales.

Especie	Raza/Nombre Científico	N	Diversidad Genética		Referencia
			He	% loci polimórfico	
Asno	Asno criollo	100	0.351	89.89	Presente estudio
	San Pedreño	14	0.1071	41.30	
	Zungo (Turipaná)	11	0.1670	45.65	
Porcinos	Casco Mula	5	0.1739	50.09	Oslinger et al., 2006
	Comercial	13	0.203	54.34	
	Zungo (CLEM)	5	0.234	56.52	
Bovinos	Harton del Valle	33	0.260	100	Piedrahíta et al., 2008
	Prochilodus magdalenae	140	0.394	95.40	
	Coryphaena hippurus	56	0.223	62.63	
Peces	Lutjanus guttatus	39	0.290	86.80	Lopez-García, 2012
	Lutjanus argentiventris.	40	0.260	85.10	
Aves	Pato criollo	30	0.190	61.20	Hernández et al., 2007

Fuente: autor de la investigación.

En cuanto al porcentaje de *loci* polimórfico en este estudio se reporta un valor de 89.86%, valor que no se iguala a ninguno de los valores reportados en la técnica aplicada a las diferentes especies presentadas en la tabla 12. Solo es superado solo por lo obtenido en Bovinos (Piedrahíta et al., 2008) y en el bocachico *Prochilodus magdalenae* (Hernández et al., 2017).

Al observar los índices de diversidad genética se encontró que la subpoblación Montes de María (MM) presentó los valores más altos de *loci* polimórfico y de heterocigocidad esperada, convirtiendo a esta la subpoblación más diversa de, mientras que, la subpoblación Mojana (MO) fue la menos diversa. En la subpoblación MM esta alta diversidad puede deberse, al nivel de utilización del asno y a la ubicación geográfica de la subregión. Los Montes de María se caracterizan por su vocación agrícola, es aquí donde los productores utilizan el asno criollo para sacar sus productos de la zona en la que se encuentran, al igual que para el transporte de alimentos, insumos y como medio de transporte propio. En cuanto a su ubicación geográfica, la subregión MM por estar al centro del departamento de Sucre, permite la interconexión, con las ciudades más importantes del departamento y con otras subregiones como Sabanas y Golfo de Morrosquillo. También, se conecta con el departamento de Bolívar. Lo anterior justifica un gran inventario de animales al igual que un gran movimiento de los mismos, por lo cual, se esperarían mayores tasas de cruzamientos entre individuos de diferentes regiones y los altos valores de diversidad genética aquí encontrados.

De otro lado, la subregión MO se caracteriza por producir arroz a escala industrializada y por la pesca en su mayoría marítima. Estas actividades económicas hacen que el nivel de utilización del asno criollo en esta zona sea menor y con ello también se tiene una población menor de asnos. En cuanto a la geografía es una subregión bañada por ciénagas, bosques

inundados (zápales), playones que hacen que el flujo de genes sea menor lo que explicaría la baja diversidad genética la subpoblación MO.

En la tabla 13 se pueden observar datos de diferentes investigaciones de caracterización genética en asnos en todo el mundo, utilizando marcadores moleculares codominantes (microsatélites), aunque las técnicas no son metodológicamente comparables ya que los RAMs con dominantes, son los únicos valores con los que se pueden contrastar, debido a la ausencia de información del uso de marcadores RAMs en asnos. Los valores de He (Tabla 13) varían desde 0.712 en la raza catalana de España, hasta 0.452 en la raza criolla de Uruguay. Todos por encima del valor de He aquí reportado (He= 0.351).

El único reporte que aparece en asnos de colombiana (Jordana et al., 2016) reporta un valor de 0.563, que casi dobla el valor aquí encontrado (0.351). Lo anterior puede ser explicado en parte por el uso de métodos de genotipaje diferentes, y por un tamaño de muestra y origen de animales diferente. En el trabajo de Jordana et al. (2016) los animales provienen del sur-occidente de país principalmente Valle del Cauca, Cauca y Nariño (región pacífico), mientras que, los animales de esta investigación pertenecen a otra región (región caribe) en solo el departamento de Sucre.

El valor de F_{ST} (0.17 ± 0.01) mostró una gran diferenciación genética entre las subpoblaciones estudiadas (Wright 1951). Esto implica un bajo flujo de genes (cruzamiento entre individuos de diferentes regiones) entre las regiones que comprenden el departamento. Así, la mayor diversidad genética es debida a la variación dentro de la subpoblación, afirmación que se soporta con el análisis de varianza molecular (Tabla 10) donde del total de la variación, el 90% de la misma se debe al efecto intra-subpoblacional. El aislamiento geográfico contribuye a que no se presenten alta frecuencia de cruzamiento de estos animales entre las diferentes subpoblaciones.

Tabla 14. *Diversidad genética de asnos alrededor del mundo usando marcadores moleculares codominantes (Microsatélites).*

País	Raza	N	Diversidad Genética		F _{ST}	Referencia
			He	NA		
Brasil	Marchador Brasileiro	58	0.698	8.47	0.271	Lara et al., 2015
	Jumento Nordesteño PB	39	0.592	6.33	0.125	
	Jumento Nordesteño CE	34	0.605	6.53	0.015	
	Burro de Miranda	41	0.661	6.73	0.106	
España	Andaluza	87	0.679	7.0	----	Aranguren et al., 2001
	Catalana	140	0.663	7.1	----	
	Mallorquina	104	0.637	7.5	----	
	Encartaciones	74	0.646	7.4	----	
Croacia	Zamorano-Leonesa	108	0.684	7.3	----	Ivankovic et al., 2002
	Istría	23	0.680	----	0.003	
	Adriático Norte	25	0.660	----	0.026	
	Litoral	27	0.700	----	0.021	

España	Catalana	111	0.712	7.7	0.154	Jordana et al., 2001
Argentina		25	0.523	4.86	0.059	
Bolivia		30	0.549	4.07	0.074	
Brasil		25	0.592	5.14	0.017	
Chile		20	0.501	3.79	0.002	
Colombia		30	0.563	5.00	0.071	
Cuba		70	0.566	5.71	0.004	
Ecuador	Criolla de cada país	21	0.511	3.93	0.009	Jordana et al., 2016
Guatemala		15	0.573	4.64	0.074	
México		14	0.597	4.43	----	
Paraguay		29	0.497	3.86	0.061	
Perú		20	0.539	4.21	0.109	
Uruguay		24	0.452	3.57	0.196	
Venezuela		27	0.505	4.00	0.079	

Los valores de F_{ST} que se reportan en la tabla 13, evidencia una variación que va desde 0.271 en la raza Marchador Brasileiro, hasta un mínimo de 0.003 en la raza Istría de Croacia. Por su parte Jordana et al. (2016) en el asno criollo colombiano reporta un valor más bajo (0.071) que el aquí encontrado (0.17) indicando una moderada diferenciación genética.

El dendrograma presentado en la figura 2 no muestra una agrupación precisa de individuos, sin embargo, la cercanía geográfica de las subpoblaciones MM y SA y el similar uso del asno en sus diversos quehaceres, los agrupa en la parte superior del diagrama. Esto también se logra evidenciar la tabla 11 y figura 3, en donde estas regiones son las más cercanas (distancia genética de Nei 0.0745). La subpoblación SJ (color morado en los dendrogramas y mapas) se encontró intermedia entre las subpoblaciones del centro del departamento (distancia genética de Nei 0.09) y MO (distancia genética de Nei 0.159). La subregión SJ presenta zonas de vida de bosque húmedo tropical /bh-T), bosque seco tropical (bs-T), bosque muy seco tropical (bms-T) y sabanas naturales. El bosque húmedo tropical corresponde a los humedales (caños, ríos y ciénagas), el comportamiento de las variables climáticas guarda estrecha relación con las de la Subregión Mojana. La precipitación promedio anual es de 2.300 mm; la temperatura promedio mensual es de 28°C y presenta humedad relativa del 85%. El bosque seco tropical hace relación a las sabanas antrópicas en los límites de los municipios de San Marcos y La Unión con el departamento de Córdoba. Las variables climáticas se correlacionan con las que dominan en la subregión Sabanas. El bosque muy seco tropical representa las extensiones de terreno con suelos ácidos, presencia de grava y baja fertilidad. La vegetación corresponde a matorrales de *Curatella americana* (Peralejo) y *Birsonima crassifolia* (Mantequero). El comportamiento del clima se aproxima a las condiciones que prevalecen en la subregión Sabanas. Sin embargo, las condiciones edáficas y escasa cobertura vegetal crean condiciones muy particulares que permiten conformar enclaves de bosque muy seco tropical. Las sabanas naturales son extensiones

localizadas en terrenos planos no inundables a la margen derecha del río San Jorge, en el sentido San Benito Abad - San Marcos. Las praderas generalmente están descubiertas con la presencia de *Scheelea magdalenica* (Palma de vino), bosquetes abiertos de *Byrsonima crassifolia* (Mantequero) y *Tetracera* sp (Martín Moreno). Para este sistema ambiental la precipitación promedio anual supera los 1.300 mm, la temperatura promedio mensual es de 28°C y la humedad relativa es del 80% (Martinez, 2016).

Las subpoblaciones de GO y MO, fueron las alejadas genéticamente. Esto se podría explicar en parte por su ubicación geográfica, sus condiciones agroclimáticas y el uso particular que en cada región hacen del asno. Así, la subregion MO se caracteriza por ser una zona de vida de bosque seco tropical (bs-T), la fuerte intervención humana ha favorecido la formación de las sabanas antrópicas de llanura. En el municipio de San Onofre se localiza un enclave de bosque muy seco tropical (bms-T) y porciones de sabanas antrópicas de lomerío y de montaña. Además, se localizan en el litoral costero los ecosistemas de manglar y lagunas costeras. La Subregión presenta diferencias marcadas en sus variables climáticas; las lluvias anuales en algunos casos son inferiores a 900 mm, pero pueden caer más de 1.200 mm al año. La temperatura media mensual es superior a los 27°C. La estación seca puede durar hasta cinco meses o más. La humedad relativa promedio es del 77%. Debido a su condición de llanura costera, mantiene niveles freáticos altos que conservan el estado aprovechable de las pasturas y condiciones favorables para el sostenimiento del hato ganadero durante la estación seca (Martinez, 2016). Mientras que por otro lado, la subregion MO las variables climáticas dominantes, clasifican a la Mojana en la zona de vida bosque húmedo tropical (bh-T). La mayor parte de su territorio corresponde a los humedales que son ecosistemas conformados por un complejo de caños, ríos, ciénagas y zapales, que hacen parte de la zona de amortiguación conocida como depresión Momposina, la cual regula la avenida de los ríos Magdalena, Cauca y San Jorge. La precipitación promedio anual es de 2.800 mm; la

temperatura promedio mensual es de 28°C; la humedad relativa promedio es del 85% y la altitud sobre el nivel del mar no supera a los 30 metros (Martinez, 2016).

7. Conclusiones

Los marcadores moleculares tipo RAMs fueron eficientes al evaluar la diversidad genética y estructura de la población en el asno criollo colombiano, ya que presentaron valores de H_e más altos que otros estudios reportados en diferentes especies.

Los marcadores CA y TG, fueron los mejores para evaluar la diversidad genética en la población en estudio.

El mayor valor de diversidad genética fue encontrado en la subpoblación MM, contrario a esto la subpoblación MO presento la menor diversidad genética.

Solo en dos subpoblaciones se encontraron *loci* pocos frecuentes siendo estas la subpoblación GO y SJ con dos y un *loci* poco frecuente respectivamente. Ambos con el marcador GT.

Los dendrogramas mostraron cercanía genética entre las subregiones del centro del departamento (MM, SA y SJ) y mayor distancia a las subregiones GO y MO.

Se encontró una moderada pero significativa diferenciación genética entre las subpoblaciones en objeto de estudio. Que indica un moderado flujo genético entre las regiones. Esta estructura genética reflejada puede deberse a las barreras geográficas que hacen parte de las características de las subregiones del departamento.

8. Recomendaciones

Este es el primer estudio realizado en Colombia usando este tipo de marcadores por lo que se recomienda:

Realizar el estudio a una escala mayor en la que se incluyan individuos de diferentes lugares del país.

Utilizar una técnica de genotipado tipo codominante como los microsatélites. Que además servirá para determinar el grado de endogamia y el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Complementar este estudio con un análisis de linajes maternos usando ADN mitocondrial, el cual no ha realizado en el país.

9. Bibliografía

Acuña, W. 2016. “Determinación de la diversidad y estructura genética de patos criollos (*Cairina moschata* L. 1758) de los departamentos de Lambayeque y San Martín mediante el uso de microsatélites”. Grado, Lima, Perú: Universidad Mayor de San Marcos.
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5208>.

Alzate M, Luis Angel. 1978. “Nuestros equinos: caballos, asnos y mulas :: Acción Cultural Popular - Radio Sutatenza”. 1978.
<http://babel.banrepcultural.org/cdm/ref/collection/p17054coll24/id/174>.

Aranguren, J, J Jordana, y M Gomez. 2001. “Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers”. *Genet Sel Evol* 33 (4): 433–42.

Aranguren, J, R Roman, W Isea, Y Villasmil, y J Jordana. 2005. “Los Microsatélites (STR’s), Marcadores Moleculares de ADN Por Excelencia Para Programas de Conservación: Una Revisión”. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13 (1): 1–6.

Bejarano, D, R Martínez, L Pedraza, y J Rocha. 2012. “Variabilidad genética en subpoblaciones comerciales de la raza criolla colombiana Romosinuano”. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 1 (13): 97–107.

Caetano, B, A Guzmán, J Selvaraj, A Posso, y M Ordoñez. 2012. “Caracterización molecular del pez dorado (*Coryphaena hippurus*) en el Pacífico colombiano utilizando marcadores moleculares RAMs”. *Acta Agronómica* 61 (5): 30–31.

Cardona, J. 2006. “Asnales Colombianos”. *Despertar Lechero* 6: 105–8.

Demarchi, Darío A. 2009. “Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas”. *Revista Argentina de Antropología Biológica* 11 (1): 73–88.

El Universal. 2016. “Policía decomisó cinco burros que iban con destino al interior del país”. *El Universal-Cartagena*, 2016. <http://www.eluniversal.com.co/sucesos/policia-decomiso-cinco-burros-que-iban-con-destino-al-interior-del-pais-228828>.

Engels, Jan. 2004. “Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares.”, 2004. https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_es.pdf.

Gossain. 2016. “QUÉ NOTICIA TAN TRISTE: EL BURRO SE ESTÁ EXTINGUIENDO.” *EL TIEMPO*, 2016. <https://www.eltiempo.com/vida/ciencia/cronica-de-juan-gossain-sobre-los-burros-33698>.

Hantula, J., M. Dusabenyagasani, y R. C. Hamelin. 1996. “Random amplified microsatellites (RAMS) — a novel method for characterizing genetic variation within fungi”. *European Journal of Forest Pathology* 26 (3): 159–66. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1996.tb00720.x>.

Hernandez, D, D Muñoz, A Posso, Valencia, y J Muñoz. 2007. “Molecular characterization of th Colombian creole dunk in four departments.” *ACTA AGRON (COLOMBIA)*, 2007.

Hernández, D, O Navarro, y J Muñoz. 2017. “Genetic diversity of bocachico *Prochilodus magdalenae* in the department of Sucre”. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 9 (Supl): 99–106.

ICA. 2016. “Equinos por Municipio y departamentos de Colombi. Instituto Colombiano Agropecuario.” 2016. <https://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2012.aspx>.

Ivankovic, A., T. Kavar, P. Caput, B. Mioc, V. Pavic, y P. Dovc. 2002. “Genetic Diversity of Three Donkey Populations in the Croatian Coastal Region”. *Animal Genetics* 33 (3): 169–77.

Jiménez, F, I Cedeño Molina, Pérez Pineda E, Rodríguez Valera Y, Martínez Aguilar Y, Cos Domínguez Y, y Chacón Marcheco E. 2016. “Zoometric Characterization of the Cuban Creole Donkey (*Equus Asinus Asinus*) of Granma Province, Cuba | Request PDF”. *REDVET* 17 (3): 1–11.

Jordana. 2016. “Genetic relationships among American donkey populations: insights into the process of colonization”. 2016.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jbg.12180>.

Jordana, J., A. Ferrando, J. Miró, F. Goyache, A. Loarca, O. R. Martínez López, J. L. Canelón, et al. 2016. “Genetic Relationships among American Donkey Populations: Insights into the Process of Colonization”. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 133 (2): 155–64.
<https://doi.org/10.1111/jbg.12180>.

Jordana, J, P Folch J, y A Aranguren. 2001. “Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalanian donkey breed”. *J. Anim. Breed. Genet.* 118: 57–63.

Jumbo, N, M Mejía, P Fernandez, E Benitez, D Jumbo, y J Vargas. 2015. “Caracterización fenotípica y zoométrica del asno Criollo (*Equus asinus*), cantón Gonzanamá, provincia de Loja”. *Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara* 14 (2): 1–7.

Kumar, Sudhir, Glen Stecher, y Koichiro Tamura. 2016. “MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets”. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

Lara, J., C. Fonseca, J.V. Oliveira, J.B. Melo, A.Z. Barroso Sousa, G. Gutmanis, M. Nóvoa, et al. 2015. “Diversidad Genética de Cinco Poblaciones Asnales Mediante El Empleo de Marcadores Microsatélites.” *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 23 (3–4): 85–88.

Leung, H, R. J. Nelson, y J. E. Leach. 1993. “Population Structure of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria.” *Advances in Plant Pathology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301483447>.

Lopez Garcia, Vivy Johanna. 2012. “ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE DOS ESPECIES DE PARGO”, 107.

Martínez, E. 2016. *Plan de desarrollo de Sucre 2016-2019*. Gobernación de Sucre. Vol. 5. Sucre Progresiva en Paz. Sincelejo, Colombia.

Martinez, G. 2010. *Plan nacional de acción para la conservación, mejoramiento y utilización sostenible de los recursos genéticos animales de colombia*. Primera. Vol. 1. FAO MARD. <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4772/3/PLAN-NACIONAL-DE-ACCION-PARA-LA-CONSERVACIONMEJORAMIEN%20%282%29.pdf>.

Muñoz, J, A Morillo, y Y Morillo. 2008. “Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal”. *Acta Agronómica* 57 (4). <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=169914224001>.

Nei, Masatoshi. 1972. “Genetic Distance between Populations”. *The American Naturalist* 106 (949): 283–92. <https://doi.org/10.1086/282771>.

Oslinger, A, J Muñoz, y L Álvarez. 2006. “Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs | Oslinger | Acta Agronómica”. *Acta Agronómica* 55 (4): 45–50.

Peakall, Rod, y Peter E. Smouse. 2012. "GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research--an Update". *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (19): 2537–39. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.

Piedrahita, Ana Maria, Jaime Eduardo Muñoz Flórez, Angela Alvarez, y Andrés Mauricio Passo. 2005. "Caracterización molecular de ganado hartón del valle usando marcadores moleculares rams". *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA* 3 (1): 19–31.

Rogers, JS. 1972. "Measures of genetic similarity and genetic distance." *Studies in Genet VII*, 1972.

Salinas, C. 2017. "Población de burros desciende 20 % a nivel global". 2017. La Jornada. 09-05-2017. <http://www.jornada.unam.mx/ultimas/2017/05/09/poblacion-de-burros-desciende-20-a-nivel-global>.

Silva-Gómez, S, G Rodríguez-Galván, J Hernández-Zepeda, L Zaragoza-Martínez, y M Palestina-González. 2017. "El asno para transporte y carga". *AICA* 10 (1): 83–87.

Solarte, E, J Rosero, J Eraso, G Zambrano, H Cárdenas, y W Burgos. 2009. "Allelic frequencies of Kappa casein gene in Holstein breed in Nariño - Colombia". *Livestock Research for Rural Development* 21 (1): Art 3.

Wright, S. 1951. "The genetical structure of populations." *Annals of Eugenics*, n° 15: 323-54.