



Original

## Caracterización genética del gallo de lidia criollo cubano mediante mtDNA D-loop

Genetic characterization of the Cuban Creole fighting rooster using mtDNA D-loop

Angel Vázquez Gil \*, Guillermo E Guevara Viera \*\*, Amilcar Arenal Cruz \*\*\*, Antonio Vallecillo Maza \*\*, Odalys Uffo Reinoso \*\*\*\*, Angel Alejandro Vázquez Palacio \*

\*Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuba.

\*\*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Azuay, Ecuador.

\*\*\*Saint Nicholas University Veterinary School, Monre Daniel, Roseau, Dominica.

\*\*\*\* Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria: San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correspondencia: [angel.vazquez@reduc.edu.cu](mailto:angel.vazquez@reduc.edu.cu)

Recibido: Abril, 2026; Aceptado: Mayo, 2026; Publicado: Junio, 2026.

### RESUMEN

**Antecedentes:** Una de las mayores dificultades a nivel mundial es la extinción de especies y razas por diferentes razones, incluyendo la pérdida de recursos genéticos. Estos fenómenos son resultado de la pérdida de recursos genéticos ocasionada por explotaciones intensivas de producción, selección genética, climas hostiles y la introducción de especies ajenas a nuevos hábitats. **Objetivo.** Caracterizar genéticamente al gallo de lidia criollo cubano (*Gallus gallus*) mediante la región D-loop del ADN mitocondrial. **Materiales y métodos:** El trabajo se realizó en criaderos particulares de criadores asociados a la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna en las regiones occidental, central y oriental de Cuba. Fueron seleccionadas al azar 53 aves, a las que se les tomó muestras de plumas, para realizar la extracción, purificación y amplificación del ADN. La secuenciación se efectuó por la empresa Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas fueron de 578 pares de bases. Se realizaron alineamientos con ClustalX 1,83, se construyó un árbol UPGMA con MEGA ver.7 y se calcularon índices de diversidad con DnaSP versión 6.0. **Resultados:** Se identificaron 22 haplotipos. La diversidad haplotípica fue alta (0,78) y la diversidad nucleotídica moderada (0,00443). El índice D de Tajima fue negativo y altamente significativo (-2,354; P<0,01), lo que revela una desviación de la neutralidad y sugiere un exceso de polimorfismos de baja frecuencia. **Conclusiones:** Las aves sometidas al muestreo presentaron una variabilidad genética muy elevada. Esta investigación constituye la primera caracterización genética a nivel de ADNmt del gallo de lidia criollo cubano.

**Palabras clave:** aves, haplotipos, mitocondrial, secuenciación (*Fuente: AIMS*)

**Como citar (APA)** Vázquez Gil, A., Guevara Viera, G. E., Arenal Cruz, A., Vallecillo Maza, A., Uffo Reinoso, O., & Vázquez Palacio, A. A. (2026). Caracterización genética del gallo de lidia criollo cubano mediante mtDNA D-loop. Revista de Producción Animal, 38. <https://rpa.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e328>



## ABSTRACT

**Background:** One of the greatest challenges worldwide is the extinction of species and breeds for various reasons, including the loss of genetic resources. These phenomena result from the loss of genetic resources caused by intensive farming practices, selective breeding, harsh climates, and the introduction of non-native species into new habitats. **Objective.** To genetically characterize the Cuban Creole fighting rooster (*Gallus gallus*) using the D-loop region of mitochondrial DNA. **Materials and methods:** The study was conducted in private breeding facilities belonging to breeders associated with the National Enterprise for the Protection of Flora and Fauna in the western, central, and eastern regions of Cuba. Fifty-three birds were randomly selected, and feather samples were taken for DNA extraction, purification, and amplification. Sequencing was performed by MacroGen Inc. The resulting sequences were 578 base pairs long. Alignments were performed using ClustalX 1.83, a UPGMA tree was constructed with MEGA version 7, and diversity indices were calculated with DnaSP version 6.0. **Results:** Twenty-two haplotypes were identified. Haplotype diversity was high (0.78) and nucleotide diversity was moderate (0.00443). Tajima's D index was negative and highly significant (-2.354;  $P < 0.01$ ), revealing a deviation from neutrality and suggesting an excess of low-frequency polymorphisms. **Conclusions:** The birds sampled exhibited very high genetic variability. This research constitutes the first mtDNA genetic characterization of the Cuban Creole fighting rooster.

**Keywords:** fowl, haplotypes, mitochondrial, sequencing (*Source: AIMS*)

## INTRODUCCIÓN

Una de las dificultades más grandes que se presentan a nivel mundial es la extinción de especies y razas por diferentes razones. Entre las causas más importantes se encuentran las de carácter natural, como la pérdida de resistencia a enfermedades y la incapacidad de adaptación a ciertos climas. Estos fenómenos son debidos a la pérdida de recursos genéticos, provocada por explotaciones intensivas, selección genética, climas hostiles y la introducción de especies ajenas a nuevos hábitats (Kullan *et al.*, 2026). Además, los costos de criopreservación de material genético y de análisis genético son muy elevados, lo que dificulta la preservación del material genético y la realización de estudios respectivos, como lo menciona la FAO (2019). Las aves domésticas, productoras de huevo, carne, plumas, decorativas y de combate, también se ven afectadas por estos elementos, reduciéndose las razas y disminuyendo la diversidad de genes.

En los últimos años, los científicos han usado marcadores genéticos con el fin de conocer la estructura genética de las poblaciones. Las secuencias polimórficas del ADN mitocondrial en la región D-loop han sido frecuentemente usadas para describir líneas maternas en animales, mayoritariamente en aves (Hasan *et al.*, 2016; Meydan *et al.*, 2016; Kenchaiwong *et al.*, 2025). A diferencia de los microsátélites, la herencia del ADN mitocondrial no se transmite de forma mendeliana, sino exclusivamente por vía materna, lo que proporciona una gran ayuda para la construcción de filogenias, además de su elevada tasa de mutación, la cual ayuda a la identificación del origen y la distribución poblacional (Abuabara *et al.*, 2021).

No conocer las características genéticas de los gallos de combate cubanos implica enfrentar riesgos de pérdida de genes valiosos con impacto sociocultural y económico. Por tanto, el objetivo de este

trabajo fue caracterizar genéticamente al gallo de lidia criollo cubano (*Gallus gallus*) mediante la región D-loop del ADN mitocondrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización y duración

El trabajo se realizó en criaderos particulares de criadores asociados a la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna en las regiones occidental, central y oriental de Cuba; durante el año 2021.

### Animales y muestreo

Se tomaron muestras de plumas con folículo a 53 aves (Tabla 1). Los animales seleccionados en cada criadero fueron elegidos al azar. Se extrajeron dos plumas de la región dorsal y dos de la región ventral de cada ave, las cuales fueron colectadas en bolsas ziploc y transportadas en un termo según lo indicado por Tauros (2019). Las cuales fueron enviadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Ecuador.

**Tabla 1. Procedencia y cantidad de aves sometidos a estudio de ADNmt.**

Zona	Provincia	Municipio	N
Occidental	Pinar del Río	Pinar del Río	2
		Mantua	1
		San Luis	1
	La Habana	Cerro	2
		Marianao	2
		Guanabacoa	1
		Guanajay	2
	Artemisa	Güira de Melena	2
		Artemisa	1
	Mayabeque	San José	1
		Güines	2
	Las Villas	Santa Clara	2
		Caibarien	1
		Manicaragua	1
		Santi Spíritus	2
Santi Spiritus		Trinidad	1
		Taguasco	2
Central	Ciego de Ávila	Ciego de Ávila	1
		Morón	2
		Majagua	1
	Camagüey	Camagüey	2
		Esmeralda	1
		Guáimaro	1
		Florida	2
Granma	Bayamo	2	
	Guisa	2	
	Buey Arriba	1	
Oriental	Santiago de Cuba	Santiago de Cuba	1
		El Caney	1
	Palma Soriano	2	
Holguín	Holguín	2	

	Biran	2
	Sagua de Tánamo	1
	Guantánamo	1
Guantánamo	Maisí	1
	Baracoa	1

### Extracción y purificación del ADN

El ADN mitocondrial se extrajo siguiendo un protocolo estandarizado que incluyó: fragmentación de folículos, incubación con etanol al 70%, centrifugación, lisis con Tris-HCl, EDTA, NaCl y SDS, digestión con proteinasa K y DTT, extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, precipitación con etanol absoluto, lavado con etanol al 70% y resuspensión en agua grado biología molecular. La cuantificación se realizó mediante espectrofotómetro.

### Amplificación por PCR

La amplificación de la región D-loop se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos OligoL 16750-For y OligoCR16-Rev. La mezcla de reacción (25  $\mu$ l) contenía buffer de amplificación 1X, solución enhancer 1X, dNTPs (0,2 mM cada uno), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), oligonucleótidos (0,8  $\mu$ M cada uno), enzima Pfx ADN polimerasa (0,04 U/ $\mu$ l) y ADN total (2 ng/ $\mu$ l). El perfil de temperatura incluyó una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a temperatura gradiente y extensión a 68°C por 45 segundos, con una extensión final a 68°C por 5 minutos (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2. Reactivos para amplificación de ADN.**

Reactivo	Concentración	Volumen	Concentración final
Agua grado biología molecular	No aplica	12,9 $\mu$ l	No aplica
Buffer de amplificación 10X	10 X	2,5 $\mu$ l	1X
Solución de enhancer 10X	10 X	2,25 $\mu$ l	1X
dNTP's	10 mM c/u	0,5 $\mu$ l	0,2mM c/u
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	1 $\mu$ l	2 mM
OligoL 16750-For	100 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l	0,8 $\mu$ M
OligoCR16-Rev	100 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l	0,8 $\mu$ M
Enzima PfxADN polimerasa	2,5 U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	0,04 U/ $\mu$ l
Muestra de ADN total	10 ng/ $\mu$ l	5 $\mu$ l	2 ng/ $\mu$ l
Volumen final	-	25 $\mu$ l	-

**Tabla 3. Perfil de temperatura de amplificación.**

Paso	Desnaturalización inicial	Número de ciclos: 35			Extensión final	Almacenamiento
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión		
Tiempo (min', seg'')	5'	45''	25''	45''	5'	
Temperatura (°C)	94,0°C	94,0°C		68,0°C	68,0°C	4,0°C

### Secuenciación

La secuenciación se realizó por la empresa Macrogen Inc. (Macrogen, 2019) utilizando el kit BigDyeTerminator versión 3.1 y el analizador de ADN ABI3730XL. Se enviaron 53 muestras y se

logró secuenciar la totalidad de ellas. Las mismas, fueron filtradas y repetidas cuatro veces (dos en el laboratorio de biología molecular y dos por Macrogen).

### Análisis estadísticos

Las secuencias obtenidas fueron de 578 pares de bases. Los archivos en formato "fasta" se editaron con BioEdit (Hall, 1999) y se realizaron alineamientos múltiples con ClustalX 1.83. Se construyó un árbol filogenético tradicional mediante el método UPGMA con el software MEGA ver.7. Los índices de diversidad genética incluyeron: número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), número promedio de diferencias nucleotídicas (k) y la prueba D de Tajima de neutralidad. Los análisis se realizaron utilizando DnaSP versión 6.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Haplotipos y diversidad genética

Se identificaron 22 haplotipos en las 53 secuencias analizadas (Tabla 4). El haplotipo más frecuente (Hap\_2) agrupó a 26 individuos, mientras que 15 individuos presentaron haplotipos únicos. El número de sitios polimórficos fue de 35, valor superior al reportado en la mayoría de los estudios consultados (Do *et al.*, 2019; Yussif y Kugonza, 2023; Oni *et al.*, 2025). Eltanany *et al.* (2016); Meydan *et al.* (2016); Zhuang *et al.* (2023); Kullan *et al.* (2026), reportaron entre 12 y 49 sitios polimórficos. No se encontraron deleciones ni inserciones. El número total de mutaciones fue de 39, de las cuales 27 fueron mutaciones singleton.

**Tabla 4. Haplotipos obtenidos para el gallo de lidia criollo cubano (*Gallus gallus domesticus*).**

Haplotipos	N	Animales que lo comparten
Hap_1	1	[1]
Hap_2	26	[2-3, 6-7, 12-14, 20, 22, 27-28, 31, 33-34, 40-41, 43-49, 51, 53]
Hap_3	1	[4]
Hap_4	1	[5]
Hap_5	2	[8, 17]
Hap_6	2	[9, 11]
Hap_7	1	[10]
Hap_8	1	[15]
Hap_9	2	[16, 21]
Hap_10	1	[18]
Hap_11	1	[19]
Hap_12	1	[23]
Hap_13	4	[24, 26, 32, 42]
Hap_14	1	[25]
Hap_15	2	[29, 50]
Hap_16	1	[30]
Hap_17	1	[35]
Hap_18	1	[36]
Hap_19	1	[37]
Hap_20	1	[38]
Hap_21	1	[39]
Hap_22	1	[52]

**N: número de muestras.**

La diversidad haplotípica (Hd) fue de 0,78 ( $\pm 0,062$ ), valor considerado alto y superior a 0,7. Este resultado es similar a lo reportado por Zhuang *et al.* (2023) en Guangxi, China (0,83) y por Kullan *et al.* (2026) en cuatro razas nativas de China (0,92), pero superior a los hallados por Meydan *et al.* (2016) en Turquía (0,33) y por Eltanany *et al.* (2016) en Egipto (entre 0,56 y 0,71). La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue de 0,00443, un valor de bajo a moderado, inferior al reportado por Do *et al.* (2019) en Indonesia (0,0099) pero superior a los valores de Zhuang *et al.* (2023), Meydan *et al.* (2016), Eltanany *et al.* (2016) y Kullan *et al.* (2026), los cuales no superaron 0,003.

El número promedio de diferencias nucleotídicas (k) fue de 2,56, valor que duplica al informado por Eltanany *et al.* (2016) (1,24) y triplica al hallado por Meydan *et al.* (2016). El índice D de Tajima fue negativo y altamente significativo (-2,354;  $P < 0,01$ ), lo que revela una desviación de la neutralidad, probablemente debida a un exceso de polimorfismos de baja frecuencia y a presión de selección (Tabla 5). Este resultado contrasta con poblaciones estudiadas por Zhuang *et al.* (2023), que reportaron valores positivos de D.

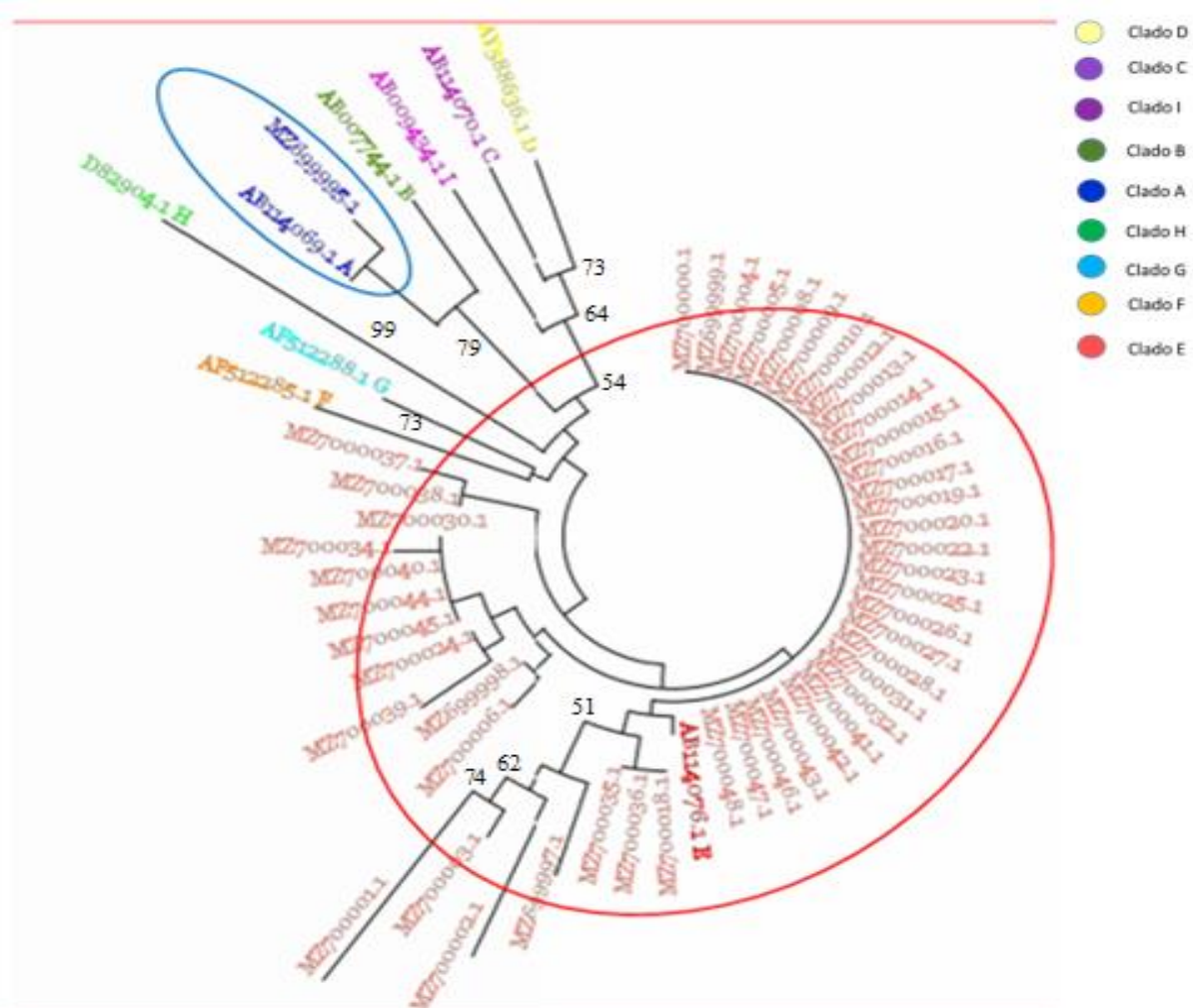
**Tabla 5. Índices de diversidad genética de secuencias estimados para la muestra analizada de gallos de lidia criollos cubanos.**

Raza	n	S	h	Hd	$\pi$	k	D
Cubana	53	35	22	0,78	0,00443	2,56	-2,354
$\pm$ DE	-	-	-	$\pm 0,062$	$\pm 0,000001$	$\pm 0,941$	$P < 0,01$

**n:** número de secuencias, **S:** número de sitios polimórficos, **h:** número de haplotipos, **Hd:** diversidad haplotípica, **DE:** desviación estándar,  **$\pi$ :** diversidad nucleotídica, **k:** número promedio de diferencias nucleotídicas y **D Tajima's.**

**Análisis filogenético**

En la figura 1 se observa la distribución en forma de árbol de los clústeres de los gallos estudiados. Aunque en el Haplotipo 2 se reunieron 26 individuos, en el Haplotipo 13 se agruparon cuatro, en los Haplotipos 5, 6, 9 y 15 hubo dos individuos cada uno, y 15 individuos presentaron su propio haplotipo único. La topología del árbol UPGMA sugiere una estructura poblacional compleja con múltiples linajes maternos.



**Figura 1.** Diagrama de análisis filogenético Neighbor Joining con el código de las secuencias de gallos cubanos, ubicados según el CLADO genético al que pertenecen, árbol con raíz. Se utilizaron 1000 repeticiones. MZ699995-MZ700048 secuencias del D-loop del ADNmt de los gallos de lidia criollos cubanos. Como referencia se empleó: AB114069 clado A, AB007744 clado B, AB003494 clado I, AB114070 clado C, AY588636 clado D, AF512288 clado G, AF512285 clado F, D82904 clado H. El círculo rojo indica las muestras que se ubican en el clado E y el círculo azul los del clado A.

Los valores de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica encontrados sugieren una contribución importante de los gallos de lidia criollos cubanos a la diversidad genética de la especie, similar a lo señalado por Kullán *et al.* (2026) para razas chinas. El alto número de haplotipos (22) para un tamaño de muestra de 53 individuos indica una variabilidad genética elevada, lo que contrasta con poblaciones más homogéneas de otros países. Esta alta diversidad podría explicarse por el origen multiétnico de las poblaciones cubanas (González-Alonso *et al.*, 2025), que han recibido influencias de gallos traídos desde España, otras regiones de Europa, Asia y África durante el período colonial. La significativa desviación de la neutralidad (D de Tajima

negativo) sugiere que estas poblaciones podrían haber experimentado expansiones poblacionales recientes o procesos de selección direccional (Al-Jumaili *et al.*, 2020).

## CONCLUSIONES

Las aves sometidas al muestreo presentaron una variabilidad genética muy elevada. Esta investigación constituye la primera caracterización genética a nivel de ADNmt del gallo de lidia criollo cubano.

## REFERENCIAS

- Abuabara, Y. J., Agapito-Tenfen, S., Agudelo-Henao, C. A., Aguilar-Aguilar, P. A., Aguilar, N., Aguilera-Arango, G., & Debouck, D. G. (2021). Recursos Genéticos para las Américas y el Caribe (SIRGEAC): agrobiodiversidad, un mundo de oportunidades en tiempos de crisis. [https://scholar.google.com/scholar\\_url?url=https://repositorio.unal.edu.co/items/7f261ac29c7c44288ebe05b26bbb8a1c&hl=es&sa=T&oi=gsb&ct=res&cd=0&d=13334818977294184700&ei=7nIOapWIMrXKieoP5bKiQQ&scisig=AFyMTJVLlrbcvsjDwlstufszmdwp](https://scholar.google.com/scholar_url?url=https://repositorio.unal.edu.co/items/7f261ac29c7c44288ebe05b26bbb8a1c&hl=es&sa=T&oi=gsb&ct=res&cd=0&d=13334818977294184700&ei=7nIOapWIMrXKieoP5bKiQQ&scisig=AFyMTJVLlrbcvsjDwlstufszmdwp)
- Al-Jumaili, A. S., Boudali, S. F., Kebede, A., Al-Bayatti, S. A., Essa, A. A., Ahbara, A., & Hanotte, O. (2020). The maternal origin of indigenous domestic chicken from the Middle East, the north and the horn of Africa. *BMC genetics*, 21(1), 30. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12863-020-0830-0>
- Do, S. Q., Nguyen, L. T. P., Nguyen, T. H., & Nguyen, T. Q. (2019). Genomic characterization of three Vietnamese indigenous chicken varieties using mitochondrial D-loop sequences. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(4), 833-839. <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/cjas-2019-0025>
- Eltanany, M., & Hemedda, S. (2016). Deeper insight into maternal genetic assessments and demographic history for Egyptian indigenous chicken populations using mtDNA analysis. *Journal of Advanced Research*, 7(5), 615-623. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.06.005>
- FAO. (2019). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/home/en/>
- González-Alonso, H., Daguerre, J. C., & Hernández-Peraza, C. (2025). Diversidad de aves y nuevos registros para la Península de Hicacos, Matanzas, Cuba. *Cuban Journal of Biological Sciences/Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 13(1). <https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:188965813?sid=ebsco:plink:scholar&id=ebsco:gcd:188965813&crl=c>

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95-98. <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=1383440>
- Hasan, M., Pish Jang, C., Yilduz Ali, M., & Weigend, S. (2016). Maternal origin of Turkish and Iranian native chickens inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Journal of Animal Science*, 29(11), 1547-1554. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.1060>
- Kenchaiwong, W., Promket, D., Sirisan, V., Chankitisakul, V., Kananit, S., & Boonkum, W. (2025). Genetic Evaluation of Growth Traits in Black-Boned and Thai Native Synthetic Chickens Under Heat Stress. *Animals*, 15(15), 2314. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12345537/>
- Kullan, A. R. K., Neumann, E. G., Alsheblak, O., & Noura, A. J. (2026). Genetic diversity of mitochondrial DNA D-loop sequences in UAE native chickens. *Poultry Science*, 106748. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579126003755>
- Macrogen Inc. (2019). *Macrogen*. <https://dna.macrogen.com/>
- Meydan, H., Jang, C. P., Yıldız, M. A., & Weigend, S. (2016). Maternal origin of Turkish and Iranian native chickens inferred from mitochondrial DNA D-loop sequences. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(11), 1547. DOI: [10.5713/ajas.15.1060](https://doi.org/10.5713/ajas.15.1060)
- Oni, O. A. (2025). Molecular characterisation of mtDNA D-loop in three indigenous chicken populations in Southwestern Nigeria. *Zenodo*, <https://zenodo.org/records/17305391>
- Tauros. (2019). *Tauros Diagnostik GbR Niederwall*. <https://www.tauros-diagnostik.de>
- Yussif, I., & Kugonza, D. R. (2023). Genetic Diversity of Ugandan Local Chicken Genotypes Inferred from Mitochondrial DNA D-loop Sequences. *ASRIC Journal On Agricultural Sciences*, 229. <https://asric.africa/sites/default/files/2025-05/AS%2022%202023%20Vol.%204%20Issue%201.pdf>
- Zhuang, Z., Zhao, L., Zong, W., Guo, Q., Li, X., Bi, Y., & Bai, H. (2023). Genetic diversity and breed identification of Chinese and Vietnamese local chicken breeds based on microsatellite analysis. *Journal of Animal Science*, 101, 182. <https://academic.oup.com/jas/article/doi/10.1093/jas/skad182/7190185?guestAccessKey=>

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: AVG, GEGV, AAC, AVM, OUR, AAVP; análisis e interpretación de los datos: AVG, GEGV, AAC, AVM; redacción del artículo: AVG, GEGV, AAC, AVM, OUR, AAVP.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.