

La conservación de Recursos Genéticos a **10 AÑOS**

de la creación del Centro Nacional
de Recursos Genéticos del INIFAP



Compilación y Edición: **EDITH ROJAS ANAYA**

ISBN: **978-607-37-1382-5**



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

DR. VÍCTOR MANUEL VILLALOBOS ARÁMBULA

Secretario

ING. VÍCTOR SUÁREZ CARRERA

Subsecretario de Alimentación y Competitividad

DR. SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA

Coordinador General de Desarrollo Rural

LIC. IGNACIO OVALLE FERNÁNDEZ

Director General de Seguridad Alimentaria Mexicana

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. LUIS ÁNGEL RODRÍGUEZ DEL BOSQUE

Encargado del Despacho de los Asuntos Correspondientes a la Dirección General del INIFAP

DR. ALFREDO ZAMARRIPA COLMENERO

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

DR. LUIS ORTEGA REYES

Coordinador de Planeación y Desarrollo

LIC. JOSÉ HUMBERTO CORONA MERCADO

Coordinador de Administración y Sistemas

DR. DANTE SCHIAFFINI BARRANCO

Titular de la Dirección General Adjunta de la Unidad Jurídica

CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ

Director del CNRG

CP. ALEJANDRO ALCANTAR PALOMERA

Jefe del Área Administrativa

LIC. JUAN LUIS RAMÍREZ GONZALEZ

Jefe de Operaciones

**LA CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS A 10 AÑOS DE LA CREACIÓN
DEL CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DEL INIFAP**

Compilador y editor:

DRA. EDITH ROJAS ANAYA

Comité Editorial

Dra. María Alejandra Mora Avilés, INIFAP

Dr. Sergio de los Santos Villalobos, ITSON

Dra. Claudia Pérez Mendoza, INIFAP

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y
PECUARIAS**

CENTRO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la Institución.

Derechos Reservados ©
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso Núm. 5. Colonia Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán, C.P. 04010, México, D.F.
Tel. (55) 38718700
Correo-e contactenos@inifap.gob.mx
www.inifap.gob.mx

Primera Edición 2021
Impreso en México
ISBN: 978-607-37-1382-5
Libro técnico Núm. 1
Noviembre del 2021

Centro Nacional De Recursos Genéticos.
Blvd. De la Biodiversidad No. 400. Colonia Rancho Las Cruces.
47600 Tepatitlán de Morelos, Jalisco.
Tel. (01) 5538718700. Ext 84820.

La presente publicación se terminó de imprimir el mes de noviembre del 2021 en los talleres Gráficos de Prometeo Editores, S.A. de C.V. Libertad 1457, Colonia Americana, Guadalajara Jalisco CP.44160 Tel.01 (33) 38262726.

Su tiraje consta de 600 ejemplares.

Esta publicación fue financiada con los recursos asignados por la Agencia de Cooperación Internacional del Japón para el Curso Internacional en Administración de Bancos de Germoplasma. Ejecutado en el año fiscal japonés 2021



Contenido

Prólogo	Luis Ángel Rodríguez del Bosque	III
Presentación	El Centro Nacional de Recursos Genéticos. José Fernando de la Torre Sánchez. INIFAP	1
Capítulo 1	Los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Rosalinda González-Santos, Fernando de la Torre-Sánchez, Jorge Cadena-Iñiguez, Luis Hernández-Sandoval	2
Capítulo 2:	El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación de recursos zoogenéticos de especies domésticas. José Fernando De La Torre Sánchez, Horacio Álvarez Gallardo, David Urbán Duarte, Sandra Pérez Reynozo	21
Capítulo 3	Recursos genéticos de pequeños rumiantes: Las razas localmente adaptadas de ganado ovino en México. Raúl Andrés Perezgrovas Garza	35
Capítulo 4	Recursos genéticos acuáticos. Carmen G. Paniagua Chávez, Miguel A. del Río Portilla, Fabiola Lafarga De la Cruz, Constanza del Mar Ochoa Saloma, Francisco J. García-De León, Wilfrido Contreras Sánchez, Ulises Hernández Vidal, Lenin Arias Rodríguez, Irene de los A. Barriga-Sosa	64
Capítulo 5	Recursos genéticos agrícolas y forestales. Esmeralda Cruz, Gabriela Sandoval, Carlos Cruz, Juan M. Pichardo, Martín Quintana, Francisco Calvillo	83
Capítulo 6	Recursos genéticos microbianos. Lily Xochilt Zelaya Molina, Noemí Yael López Cordero, Hugo Alberto Zaldívar López, Juan Lara Aguilera, Miguel Salas Morán, Ismael Fernando Chávez Díaz, Ramón Ignacio Arteaga Garibay	111
Capítulo 7	Colección de recursos genéticos microbianos del CNRG INIFAP. Ramón Ignacio Arteaga Garibay, Lily Xochilt Zelaya Molina, Ismael Fernando Chávez Díaz, Noemí Yael López Cordero, Hugo Alberto Zaldívar López, Juan Lara Aguilera, Miguel Salas Morán	127
Capítulo 8	Caracterización genómica y diversidad de los recursos genéticos. Luis Felipe Guzmán, Carlos Cruz Cárdenas	142
Capítulo 9	Herramientas informáticas para el estudio de los recursos genéticos. Lorena Jacqueline Gómez-Godínez, Francisco Fabián Calvillo Aguilar, Arturo Vera Ponce de León; Colin K. Khoury, María Victoria Díaz	164
Capítulo 10	Repositorio de datos biológicos para la gestión de recursos genéticos. María Elena Castro, Ernesto Borrayo, Juan Carlos Alarcón Maldonado.	191



Prólogo

Dr. Luis Ángel Rodríguez del Bosque

INIFAP

Los recursos genéticos representan un valor invaluable para el desarrollo estratégico de un país. México presenta una gran diversidad genética, que ha resultado del efecto de múltiples factores, tales como: los climáticos, geográficos, antropogénicos, culturales, entre otros. Esta característica es una ventaja, ya que se tiene la evidencia que una mayor diversidad en una especie o población representa mayores posibilidades de adaptación y sobrevivencia ante los cambios de su entorno. De esta forma, es imprescindible la conservación de los recursos genéticos para tener mayores posibilidades de respuesta ante los cambios presentes y futuros.

Ante la necesidad señalada, el gobierno federal, a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) inauguraron el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) el 17 de marzo de 2012 en Tepatitlán Jalisco, con la misión de conservar los recursos genéticos existentes en México, en beneficio de las generaciones presentes y futuras, apoyados siempre en el conocimiento científico y tecnología de vanguardia. Para el cumplimiento de esta misión, actualmente el CNRG cuenta con la infraestructura y personal altamente calificado, así como para la realización de la investigación y el desarrollo de métodos para la disposición de semilla o el restablecimiento de sistemas de cultivo tradicionales y en la reintroducción de cultivares tradicionales.

En la presente obra, se incluyen los avances que se han tenido en el CNRG en conservación de los recursos genéticos, además de colaboraciones en los temas de especies domésticas, en pequeños rumiantes, especies acuáticas, agrícolas y forestales, microbianos, así como los servicios que ofrece en la caracterización genómica, herramientas informáticas para el estudio de los recursos genéticos y depositarios de muestras en la conservación a mediano y largo plazo.

Este libro se publica como parte de los festejos conmemorativos de los 10 años de la fundación del CNRG y como un reconocimiento de su labor en el INIFAP y el país; así como, en el fortalecimiento de su vinculación de colaboración con otras instituciones dentro y fuera de México.



El Centro Nacional de Recursos Genéticos

José Fernando de la Torre-Sánchez.

Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP

Con una gran emoción, pongo a consideración de ustedes, el presente libro intitulado “La conservación de los Recursos Genéticos a 10 años de la creación del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP”, donde un grupo importante de Investigadores y Curadores del INIFAP y de otras Instituciones, expertos en las áreas del conocimiento sobre adquisición, recolecta, documentación, caracterización, evaluación, acondicionamiento y conservación de Recursos Genéticos Acuáticos, Agrícolas, Forestales, Pecuarios, Microbianos y de Invertebrados, puso su mejor esfuerzo para plasmar el estado del arte y de la ciencia en estos temas, con énfasis en el trabajo que se ha venido realizando desde la creación del CNRG-INIFAP hasta nuestros días.

En la presente obra, el lector tendrá la oportunidad de adentrarse en temas de mucho interés en recursos genéticos, abordados de una manera sencilla pero muy completa, incluyendo también temas de actualidad donde se esta generando nueva información de manera constante. La intención es que sea esta una obra de consulta y referencia de primera mano en todos los temas de Recursos Genéticos, que nos permita acceder a información útil y relevante, pero que al mismo tiempo nos señale los caminos para acceder a información especializada, cuando sea menester hacerlo.

Es de esta forma, que el equipo de Investigadores del CNRG-INIFAP, con la importante colaboración de colegas del Instituto y de otras Instituciones, que hemos querido celebrar el décimo aniversario de la puesta en operación del Centro Nacional de Recursos Genéticos, “Resguardo de la Riqueza Genética de México, para las Generaciones Presentes y Futuras”



Capítulo 1

Los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura

Rosalinda González-Santos¹, Fernando de la Torre-Sánchez², Jorge Cadena-Iñiguez³, Luis Hernández-Sandoval¹

1. Universidad Autónoma de Querétaro, 2. Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP, 3. Colegio de Postgraduados.

gonzalezrosalinda941@gmail.com

Aspectos generales de los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura.

Los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (RGAA) se refieren a cualquier material genético de valor real o potencial del cual el mundo depende para mantener y mejorar la productividad y calidad de los cultivos, la ganadería, la silvicultura y la pesca (Casas *et al.*, 2016). Los RGAA dependen de la participación humana para su mantenimiento, evolución y diversificación (FAO, 2016). Además, existe una interdependencia entre los países, que en su mayoría actúan como proveedores y usuarios, lo cual deriva en tratados y convenios internacionales que regulan su acceso y la distribución justa y equitativa derivada de su utilización (Halewood *et al.*, 2013).

Los RGAA desempeñan un papel crucial en la seguridad alimentaria, nutrición, medios de vida, mitigación y adaptación al cambio climático y en la provisión de servicios ecosistémicos. Son componentes clave de sostenibilidad, resiliencia y adaptabilidad en los sistemas de producción (Figura 1). Así mismo, son la materia prima para la obtención de nuevos productos en el sector farmacéutico, semillas agrícolas, suplementos

botánicos, cuidado personal y cosméticos, la industria alimenticia y bebidas, entre otros (FAO, 2015b; FAO, 2020).

La integración de informes mundiales y la definición de planes de acción mundial para los RGAA, se lleva a cabo a través de la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (CRGAA) de la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO). La CRGAA se integró en el año 1983 para la atención de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) y fue hasta el año 1995 que amplió su mandato para los recursos zoogenéticos, forestales y acuáticos. Cada sector de RGAA se atiende a través de Grupos de Trabajo Técnicos Intergubernamentales. México al igual que otros 177 países y la Unión Europea son miembros de dicha Comisión (FAO, 2020).

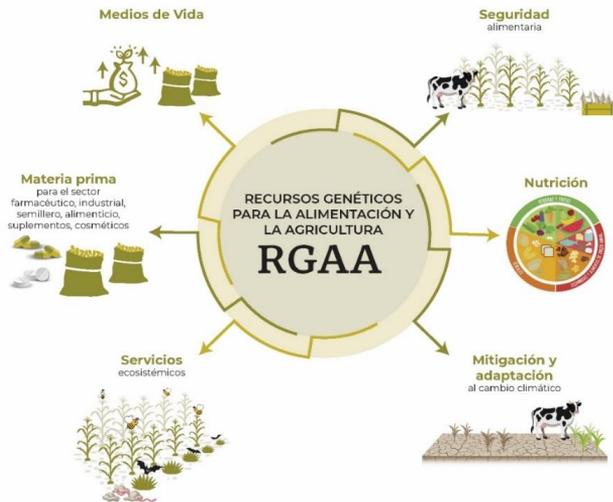


Figura 1. Diagrama representativo de los principales usos e importancia de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura.

Informes mundiales y planes de acción mundial de los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura.

Los países miembros de la CRGAA definen los Planes de Acción Mundial para la Alimentación y la Agricultura por grupo de recurso genético que tienen como objetivo asegurar la utilización sostenible y su conservación.

Se acuerdan las prioridades y líneas de acción de acuerdo a lo identificado en los informes mundiales (FAO, 2020).

El grupo de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) es el que más avances tiene, dispone de dos informes mundiales publicados y dos planes acción mundial acordados (FAO, 1996; FAO, 2010; FAO, 2011). El *Tercer informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura en el mundo* (Tercer informe) está en preparación junto con los informes de cada país. De acuerdo con el programa de trabajo plurianual de la CRGAA, la presentación del Tercer informe está prevista para el año 2023. Además, en la CRGAA fue negociado el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA), que comprende el Sistema multilateral de acceso y distribución de beneficios, específico para facilitar y regular el acceso a los RFAA y la distribución de beneficios derivados de la utilización de los RFAA que han sido designados por las Partes Interesadas a dicho Sistema (FAO, 2009).

Los recursos zoogenéticos están dentro del grupo con avances significativos con dos informes mundiales y un plan de acción mundial (FAO, 2007; FAO, 2015a). Los recursos genéticos forestales en el año 2013 publicaron el primer informe y el plan de acción mundial (FAO, 2014). En el caso de los recursos genéticos acuáticos, en el año 2019 se publicó el informe mundial sobre su *status* (FAO, 2019b) (Cuadro 1). Los recursos genéticos microbianos e invertebrados no disponen de Grupo Técnico por lo cual no se ha integrado informe mundial y plan de acción mundial.

Cuadro 1. Informes mundiales y planes de acción mundial de los recursos fitogenéticos, zoogenéticos y forestales.

Grupo de Recurso Genético para la Alimentación y la Agricultura	Informe Mundial y Plan de Acción Mundial
Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos en el Mundo (1996) • Plan de Acción Mundial para la Conservación y Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura y la Declaración de Leipzig (1996) • Segundo informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (2010) • Segundo Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (2011)
Recursos Zoogenéticos para la Alimentación y la Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura (2007) • Plan de Acción Mundial sobre los Recursos Zoogenéticos y la Declaración de Interlaken (2007) • El Segundo informe sobre la situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura (2015)
Recursos Genéticos Forestales	<ul style="list-style-type: none"> • Estado de los recursos genéticos forestales en el mundo (2013) • Plan de Acción Mundial para la conservación, la utilización sostenible y el desarrollo de los recursos genéticos forestales (2014)
Recursos Genéticos Acuáticos para la Alimentación y la Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • El estado de los recursos genéticos acuáticos para la alimentación y la agricultura en el mundo (2019)

En México al igual que nivel mundial el grupo que más avance tiene son los RFAA con tres informes nacionales publicados (Ramírez *et al.*, 2000; Molina-Moreno y Córdova-Téllez, 2006) y un plan de acción nacional acordado no publicado. El grupo de los recursos zoogenéticos, forestales y acuáticos entregaron los informes nacionales correspondientes a la FAO, pero no se han publicado. Destaca el grupo de los recursos microbianos que dispone del informe nacional publicado y el plan nacional de acción,

los cuales aún no se integran a nivel mundial, por la FAO (Rodríguez-Guzmán *et al.*, 2011 a,b) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Áreas estratégicas y líneas de acción de los Planes de Acción Mundial de los recursos fitogenéticos, zoogenéticos y forestales.

Grupo de Recurso	Plan de Acción Mundial	Áreas estratégicas y líneas de acción	
Genético para la Alimentación y la Agricultura			
Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura	Segundo Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (2011): cuatro áreas con 18 líneas de acción	I.	Conservación y manejo <i>in situ</i> : cuatro líneas de acción
		II.	Conservación <i>ex situ</i> : tres líneas de acción
		III.	Utilización sostenible: cinco líneas de acción
		IV.	Creación de una capacidad institucional y humana sostenible: seis líneas de acción
Recursos Zoogenéticos para la Alimentación y la Agricultura	Plan de Acción Mundial sobre los Recursos Zoogenéticos y la Declaración de Interlaken (2007): cuatro áreas con 23 líneas	I.	Caracterización, inventario y seguimiento de los riesgos asociados y las tendencias: dos líneas
		II.	Utilización sostenible y desarrollo: cuatro líneas
		III.	Conservación: cinco líneas
		IV.	Políticas, Instituciones y creación de capacidad: 12 líneas
Recursos Genéticos forestales	Plan de Acción Mundial para la conservación, la utilización sostenible y el desarrollo de los recursos genéticos forestales (2014): cuatro áreas estratégicas con 27 prioridades estratégicas	I.	Mejora de la disponibilidad de información sobre los recursos genéticos forestales y del acceso a la misma: cuatro prioridades estratégicas
		II.	Conservación de los recursos genéticos forestales (<i>in situ</i> y <i>ex</i>

	<i>situ</i>): siete prioridades estratégicas
III.	Utilización sostenible, desarrollo y ordenación de los recursos genéticos forestales: seis prioridades estratégicas
IV.	Políticas institucionales y creación de capacidades: 10 prioridades estratégicas

Los Planes de Acción Mundial de recursos fitogenéticos, zoogenéticos y forestales, negociados por los gobiernos en la CRGAA, consideran prácticamente las mismas cuatro áreas estrategias: conservación *in situ*, conservación *ex situ*, utilización sostenible y creación de capacidades con diferente número de líneas de acción (Cuadro 2), acorde con las necesidades que se identificaron en los informes mundiales (FAO, 2011; FAO, 2007; FAO, 2014).

Acceso y distribución de beneficios derivados de la utilización de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura.

Los tres instrumentos internacionales que componen el marco mundial para el acceso y distribución de beneficios derivados de la utilización de los recursos genéticos son: el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), el Protocolo de Nagoya sobre el acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización (PN) y el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA). Cabe señalar que estos tres instrumentos son jurídicamente vinculantes para sus Partes Contratantes y los países tienen derechos soberanos sobre sus recursos genéticos y la potestad para determinar el acceso a estos recursos corresponde a los gobiernos nacionales (FAO, 2016).

El objetivo central de estos tres instrumentos es la conservación y el aprovechamiento sostenible de los recursos biológicos y genéticos, y la distribución justa y equitativa derivada de su utilización. El CDB entró en

vigor desde el año 1993 y son parte 196 países; posteriormente entró en vigor el TIRFAA en el año 2004, actualmente con 147 países miembros y finalmente el PN en el año 2014 con 123 países parte (CDB, 2020, TIRFAA, 2020).

México firmó y ratificó el CDB y PN (CDB, 2020). En México del año 2014 al 2020, se han emitido ocho certificados internacionalmente reconocidos de acceso conforme al PN: cinco autorizados por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y de tres tomó conocimiento el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), órgano desconcentrado de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (AGRICULTURA), como Autoridad Nacional Competente para los RFAA (Cuadro 3) (ABSCH, 2020). Con relación al TIRFAA, México no es parte, pero se aplica el Acuerdo de Transferencia Normalizado por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) para los accesos de maíz y trigo (CIMMYT, 2020).

En el caso específico de los RGAA, se considera que los países son interdependientes y actúan ya sea como proveedores de ciertos RGAA y como usuarios de otros. El intercambio de estos es fundamental para el funcionamiento del sector agroalimentario y es probable que adquieran mayor relevancia en el futuro (FAO, 2016). En este contexto, tanto de instrumentos internacionales para la regulación como la importancia que tienen los RGAA, en el 2013 la CRGAA puso en marcha un proceso del que resultan los *Elementos para facilitar la aplicación nacional del acceso y distribución de beneficios en diferentes subsectores de los RGAA (Elementos de ABS en los RGAA)*. Dichos elementos fueron elaborados por un equipo de expertos técnicos y jurídicos en materia de acceso y distribución de beneficios de todas las regiones del mundo. En los Elementos de ABS en los RGAA se identificaron las principales características por grupo de RGAA a considerar para su acceso y distribución de beneficios derivados de su utilización (FAO, 2016).

Así mismo, la CRGAA analiza los alcances y la regulación del acceso a las “secuencias digitales (SD)” del cual aún no existe una definición acordada, pero se refiere a las secuencias de DNA que tienen la capacidad de transferir información almacenada en bases de datos de acceso libre y restringido. El tema de SD también está en agenda del Convenio sobre Diversidad Biológica, Protocolo de Nagoya, el Tratado Internacional sobre



los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Convención de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar (Aubry, 2019 FAO, 2020).

En el año 2019, la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO convino en que existía la necesidad de seguir examinando el tema del uso de la “información de secuencias digitales” de RGAA y sus implicaciones. Ésta acordó que, en su siguiente reunión, se abordararan las oportunidades de innovación que ofrecía la “información de secuencias digitales” de RGAA, los desafíos relacionados con la capacidad de acceder a dicha información y hacer uso de ella y las implicaciones para la conservación y la utilización sostenible de los RGAA y la distribución de los beneficios derivados de estos (FAO, 2020).

Cambio de paradigma para la conservación y utilización sostenible de los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura.

En los últimos años tanto el CDB como la CRGAA de la FAO han cambiado su concepción para la atención de la diversidad biológica y los RGAA. El CDB con la Declaración de Cancún, que fue adoptada en la 13ª reunión de la Conferencia de las Partes en el año 2016, reiteró la importancia de una visión integrada de la biodiversidad iniciando con los sectores de pesca, turismo, agricultura y forestales. En la Declaración de Sharm El-Sheikh, adoptada en la 14ª reunión de la Conferencia de las Partes en el año 2018, este enfoque ha sido fortalecido exhortando a la integración de la biodiversidad también en los sectores energéticos, de las infraestructuras, fabricación y sectores de procesamiento (Whitehorn *et al.*, 2019). Por su parte, la CRGAA en el año 2019 publicó el Informe Mundial de la Biodiversidad para la Alimentación y la Agricultura. Cabe señalar que en México el INIFAP se encargó de la coordinación para la elaboración del informe nacional de la Biodiversidad para la Alimentación y la Agricultura con la participación tanto del sector de agricultura como el sector ambiental (Cuadro 3).

Cuadro 3. Certificados internacionalmente reconocidos de acceso que conforme al Protocolo de Nagoya México ha emitido y publicado en la página “The Access and Benefit-sharing Clearing-House (ABS Clearing-House)” del Protocolo de Nagoya.

Clave	Fecha de Emisión	Solicitud de Acceso	Usuario	Autoridad Nacional Competente
ABSCH-IRCC-MX-241563-1	17 de diciembre 2018	Aviso para llevar a cabo la colecta de recursos fitogenéticos domesticados con fines de investigación básica	Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)	SNICS
ABSCH-IRCC-MX-240823-1	29 de junio 2018	Aviso de colecta de recursos biológicos forestales con fines de utilización en investigación y/o biotecnología	Instituto de Ecología	Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos (DGGFyS), SEMARNAT
ABSCH-IRCC-MX-240822-1	25 de junio 2018	Aviso para llevar a cabo la colecta de recursos biológicos forestales con fines de utilización, investigación y biotecnología	Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP	Dirección General de Gestión Forestal y de Suelos (DGGFyS), SEMARNAT
ABSCH-IRCC-MX-240821-1	25 de junio 2018	Aviso de colecta de recursos biológicos forestales con fines de utilización en investigación y biotecnología	Colegio de la Frontera Sur	DGGFyS, SEMARNAT
ABSCH-IRCC-MX-240640-1	03 de mayo 2017	Aviso para llevar a cabo colecta de recursos biológicos forestales con fines de investigación y en biotecnología	Colegio de Postgraduados	DGGFyS, SEMARNAT

ABSCH- IRCC- MX- 238488-1	10 de agosto 2017	Autorización para efectuar la colecta científica de recursos biológicos forestales, modalidad biotecnológica con fines comerciales	PROVITAL, S.A.	DGGFyS, SEMARNAT
ABSCH- IRCC- MX- 208823-1	24 de noviembre 2016	Resolución de solicitud de acceso a chayote	University of Tsukuba	SNICS
ABSCH- IRCC- MX- 207343- 3	15 de julio 2015	Resolución de solicitud de acceso BioN2Inc	BioN2, Inc. (<i>BioN2</i>)	SNICS

En el informe mundial de la Biodiversidad para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2019a), se identificaron las siguientes necesidades como prioritarias:

- Asegurar que los ecosistemas, las especies y la diversidad genética contribuyan al suministro de productos alimenticios y agrícolas y a la resiliencia de los sistemas alimentarios y agrícolas;
- Potenciar los conocimientos sobre las funciones que desempeña la biodiversidad en los procesos ecológicos que sustentan la producción alimentaria y agrícola, y utilizar estos conocimientos para formular estrategias de gestión que protejan, restauren y mejoren tales procesos en diversas escalas; y
- Establecer políticas y mediadas de extensión eficaces para respaldar la adopción de prácticas de gestión que utilicen la biodiversidad de manera sostenible para la seguridad y la resiliencia de la alimentación y de los medios de vida.

Por lo tanto, se considera que ha cambiado la manera de entender y atender la diversidad biológica que incluye a los RGAA, con una visión integral que requiere la colaboración de todos los actores institucionales tanto del medio ambiente como agricultura. En el caso de México se ha tenido un desarrollo similar, se tienen avances en estrategias y políticas



públicas por el grupo de recursos genéticos y empiezan a proponerse proyectos integrales de biodiversidad para la alimentación y la agricultura.

Los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura en México.

México es uno de los pocos países donde converge una amplia diversidad biológica, recursos genéticos para la alimentación y la agricultura y una riqueza biocultural extraordinaria. Se destaca por ser centro de origen, diversidad y domesticación de aproximadamente 60 cultivos, entre los que destaca el maíz (*Zea*), frijol (*Phaseolus*), papa (*Solanum*), vainilla (*Vanilla*), con importancia no sólo para la alimentación y agricultura de los mexicanos, sino para la humanidad y la presencia de más de 65 grupos etnolingüísticos distribuidos en todo el país (Navarrete-Linares, 2010). Además de disponer de amplia diversidad fisiográfica y diferentes tipos de climas, ha permitido el mantenimiento y generación de una amplia agrobiodiversidad (Casas *et al.*, 2016).

En el Informe Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura del 2000 y 2006, se identificó que una de las principales fortalezas del país era su capacidad en infraestructura y la especialización científica disponible (Ramírez *et al.*, 2000; Molina-Moreno y Córdova-Téllez, 2006). Para la atención de los RGAA, México dispone de instituciones líderes en el tema como el Colegio de Postgraduados (CP), el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA) para la atención de los recursos fitogenéticos, zoogenéticos, acuícolas y forestales, los cuales tienen centros regionales distribuidos en todo el país. Destaca, el INIFAP con el Centro Nacional de Recursos Genéticos con capacidad para resguardar más de tres millones de accesiones de los recursos fitogenéticos, zoogenéticos, forestales, acuáticos y microorganismos e invertebrados (INIFAP, 2020; INAPESCA, 2020; CP, 2020).

Adicionalmente, la mayoría de las universidades estatales, politécnicas e interculturales desarrollan investigación básica y aplicada en el tema de RGAA, como la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la Universidad de Guadalajara, la Universidad Autónoma de Querétaro.

además de los centros de investigación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Por ejemplo, en instituciones como la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) que tiene relativamente poco tiempo o desarrollando el tema de los RGAAA, se dispone de siete licenciaturas, estrechamente relacionadas con el tema y cinco postgrados. Se tiene un banco de germoplasma con más de 900 accesiones de 19 familias de especies cultivas, parientes silvestres y especies silvestres comestibles. Las accesiones en resguardo tienen no sólo uso alimenticio sino también medicinal, comestible, maderable, cosmético, ornamental, forraje, ceremonial, entre otros. Además dispone del Herbario Jerzy Rzedowski (QMEX) con más de 36,000 ejemplares de 6,135 especies herborizadas en la colección y el Laboratorio Nacional CONACyT de Identificación y Caracterización Vegetal (UAQ, 2020).

Programas y políticas públicas implementadas en México.

En México se han establecido diferentes programas para los RGAA, en su mayoría dirigidos a los RFAA. Destaca en el año 2002, la ejecución del programa denominado Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) definido como un mecanismo de coordinación interinstitucional e interdisciplinario para la conservación y aprovechamiento de los RFAA, para la distribución justa y equitativa derivada de su utilización (González-Santos *et al.*, 2015).

A través del programa “SINAREFI” que operó del año 2002 al 2013, México definió un modelo para la atención de los recursos fitogenéticos para la alimentación la agricultura, en donde los principales ejes fueron:

- a) integración del diagnóstico para conocer las principales fortalezas y oportunidades, a través de la integración de los informes nacionales;
- b) definir un plan nacional de acción que tomó como base el Primer Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos de la FAO;
- c) definir 44 cultivos prioritarios para la atención con centro de origen, diversidad y domesticación en México;
- d) integración de redes interdisciplinarias e interinstitucionales,



e) integración de la Red de Centros de Conservación (González-Santos et al., 2015).

Además, en el 2008, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), ahora Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (AGRICULTURA), definió el programa denominado “Sistema Nacional de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINARGEN)” como la política pública para los RGAA del año 2008 al 2012. El cual estaba constituido por los subsistemas agrícola, zoogenéticos, acuáticos, forestales y microorganismos. Entre los objetivos del SINARGEN destaca la ejecución de una estrategia similar a la de SINAREFI para la conservación y aprovechamiento sostenible de los RGAA (Claridades Agropecuarias, 2010; Paniagua-Chávez et al., 2011).

El programa SINARGEN fue coordinado a través de la Subsecretaría de Agricultura, en el cual se designó como instancia coordinadora al Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) para los recursos fitogenéticos, a la Coordinación General de Ganadería para los recursos zoogenéticos, para los recursos acuáticos se establecieron convenios con el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada del CONACYT y para los recursos forestales con la Comisión Nacional Forestal de SEMARNAT. Entre los principales logros alcanzados por la estrategia SINAREFI y SINARGEN destacan la integración de plataformas interinstitucionales, elaboración de diagnósticos, y planes nacionales de acción (Cuadro 4) (Claridades Agropecuarias, 2010; Paniagua-Chávez et al., 2011).

Cabe señalar que para la operación del SINARGEN se dispuso de recursos financieros etiquetados en las Reglas de Operación de la SAGARPA ahora AGRICULTURA, para los diferentes grupos de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura de 2008 a 2018. No obstante, sólo en el periodo 2008-2013, los recursos fueron asignados bajo una estrategia definida. Se considera que debido a que no existe un marco jurídico que defina la política pública en el tema con instancias responsables y recursos financieros, se dificulta la continuidad de los programas.

Recientemente, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (AGRICULTURA) publicó la conformación del Comité Sectorial de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura que tiene como objetivo promover la conservación, manejo, distribución justa y equitativa de los

beneficios y aprovechamiento sostenible de los RGAA, mediante la coordinación interinstitucional e interdisciplinaria. El cual es presidido por el Secretario de Agricultura y Desarrollo Rural y participa la Subsecretaría de Agricultura, la Subsecretaría de Desarrollo Rural, Subsecretaría de Alimentación y Competitividad, la Coordinación General de Ganadería, la Coordinación General de Asuntos Internacionales, el Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias, el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y el Colegio de Postgraduados (DOF, 2020).

Cuadro 4. Principales logros obtenidos por los Subsistemas del Sistema Nacional de Recursos Genéticos.

Subsistema Agrícola (Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, SINAREFI)

- Integración de una plataforma interinstitucional e interdisciplinaria con más 60 instancias participantes (45 redes)
 - Definió e implementó la estrategia para la conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos fitogenéticos nativos (Estrategia SINAREFI) para la atención de 44 cultivos nativos, así como sentar las bases de acción y normativas para la distribución justa y equitativa derivada de la utilización
 - Tres informes nacionales publicados, coordinado por el SNICS y un plan nacional de acción no publicado
-

Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Pecuarios

- Dos informes nacionales Coordinados por la Coordinación General de Ganadería
 - Información disponible de las razas en el Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos (DAD-IS) de la FAO
 - Programa Nacional de Recursos Genéticos Pecuarios desde 1998
 - Integración del Consejo Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios, Asociación civil en 1999 conformadas por las principales asociaciones de criadores de raza pura e instituciones de investigación
-

Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA)

- Integración del informe nacional, coordinado por CONAPESCA
 - Integración de la plataforma interinstitucional con más de siete instancias participantes en el subsistema
 - Atención prioritaria a siete especies nativas
-

Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM)

- Integración de plataforma interinstitucional con la regionalización en cinco sedes (más de 11 instancias): Golfo-Sureste, Sur, Centro, Noroeste, Norte
 - Reconocimiento por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) de la Colección de Microorganismos del Centro
-

Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) como Autoridad Depositaria Internacional, bajo el Tratado de Budapest.

- Diagnóstico nacional
- Plan nacional de acción

Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Forestales

- Elaboración del diagnóstico y plan nacional de acción

Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG-INIFAP)

- Resguardo de accesiones de recursos fitogenéticos, zoogenéticos, acuáticos, microbianos y forestales
-

Conclusiones.

- Los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura son indispensables para la seguridad alimentaria, hacer frente al cambio climático y son los medios para mejorar la calidad de vida social y económica de todos los tipos de productores y de la población en general.
- Existe un amplio interés a nivel internacional para fomentar la conservación y aprovechamiento sostenible de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, así como asegurar la distribución justa y equitativa derivada de su utilización, lo cual se ha acordado principalmente en la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO y el Convenio sobre Diversidad Biológica.
- México requiere una Ley específica para definir la política pública para la conservación, aprovechamiento sostenible y distribución justa y equitativa derivada de la utilización de los Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura para lo cual, debe aprovechar la capacidad técnica e infraestructura que dispone, así como de las experiencias adquiridas en el tema con los programas y estrategias, tales como, el programa y estrategia del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) y el Sistema Nacional de Recursos Genéticos (SINARGEN).
- La Ley para los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura, que sea definida e implementada en México, deberá asegurar los recursos financieros, fomentar la colaboración interinstitucional e interdisciplinaria así como, la definición de un Plan Nacional de Acción a corto, mediano y largo plazo que no se vea afectado por los cambios de administración.

Literatura consultada.

- ABSCH. 2020. The Access and Benefit-sharing Clearing-House (ABS Clearing-House). Disponible en: <https://absch.cbd.int/es/countries/MX/IRCC>
- Aubry S. The future of digital Sequence Information for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 2019;10:1-10.
- Claridades Agropecuarias. México construye el Centro Nacional de Recursos Genéticos. Avance a grandes pasos en la conservación de la biodiversidad. *Septiembre* 2010:205.
- Casas A, Torres-Guevara J, Parra F (ed). Domesticación en el continente americano. Manejo de biodiversidad y evolución dirigida por las culturas del Nuevo Mundo. Universidad Nacional Autónoma de México y Universidad Nacional Agraria la Molina del Perú. México-Perú. 2016:502.
- CIMMYT. 2020. Solicitudes de semillas. Disponible en: <https://www.cimmyt.org/resources/seed-request/>
- CDB. 2020. Convenio sobre la Diversidad Biológica. Disponible en: <https://www.cbd.int/convention/>
- CP. 2020. El Sistema de Campus del Colegio de Postgraduados. Disponible en: <http://www.colpos.mx/wb/index.php/campus>
- DOF. 2020. Acuerdo por el que se crea el Comité Sectorial de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <https://www.gob.mx/snics/prensa/comite-sectorial-de-recursos-geneticos-para-la-alimentacion-y-la-agricultura-248489>
- FAO. Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos en el Mundo. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 1996:85.
- FAO. Plan de Acción Mundial sobre los recursos zoogenéticos y la Declaración de Interlaken. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. 2007:68.
- FAO. Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. 2009:56.
- FAO. El Segundo Informe sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el mundo.



- Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. 2010:372.
- FAO. Segundo Plan de Acción Mundial para los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2011:104.
 - FAO. The state of the world's forest genetic resources. Commissions on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and agriculture organization of the united nations, Rome. 2013:276.
 - FAO. Plan de Acción Mundial para la conservación la utilización sostenible y el desarrollo de los recursos genéticos forestales. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. 2014a:36.
 - FAO. The estate of the world's forest genetic resources. Commission on Genetic Resources for Resources for Food and Agriculture Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2014b:275.
 - FAO. The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, FAO. Roma. 2015a:562.
 - FAO. Coping with climate change-the roles of genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, FAO. Rome, 2015b:110.
 - FAO. Elementos del ADB. Elemento para facilitar la aplicación nacional del acceso y distribución de beneficios en diferentes subsectores de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 2016:33.
 - FAO. The state of the world's biodiversity for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, 2019a:529.
 - FAO. The state of the world's aquatic genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, FAO. Rome. 2019b:251.

- FAO. 2020. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/cgrfa/es/>
- González-Santos, R. Diagnóstico y análisis de la pertinencia de las políticas públicas en los recursos fitogenéticos en México. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, México. 2016:159.
- González-Santos R, Cadena-Iñiguez J; Morales-Flores FJ, Ruiz-Vera VM, Pimental-López J, Peña-Lomeí A. Model for the conservation and sustainable use of plant genetic resources in México. *Wulfenia Journal Austria*: 2015;22:333-35.
- Halewood M, López-Noriega I, Louafi. *Crop Genetic Resources as Global Commons*. Bioversity International, New York, USA. 2013:399.
- INAPESCA. 2020. Centros Regionales de Investigación Pesquera. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/centros-regionales-de-investigacion-pesquera-crip-s>
- INIFAP. 2020. Centros de Investigación. Disponible en: <https://www.gob.mx/inifap/acciones-y-programas/centros-de-investigacion>
- Molina-Moreno JC, Córdova-Téllez. (eds.). Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura. Informe Nacional 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitotecnia, A.C, Chapingo, México. 2006:172.
- Navarrete-Linares F. Pueblos indígenas de México. Comisión Nacional de los Pueblos Indígenas. México. 2010:19.
- Paniagua-Chávez CG, Ortiz-Gallarza SM, Aguilar-Juárez M. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos: uso de la criopreservación para la conservación de los recursos genéticos acuáticos de México. *Hidrobiología*. 2011;21:415-429.
- Ramírez VP; Ortega P, López A Castillo F, Livera M, Rincón F. y Zavala F. Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura. Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. 2000:130.
- Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón A, Alatorre-Rosas R, Almaraz JJ, Arteaga-Garibay RI, Ferrera-Cerrato R, Gamboa-Angulo MM, Giono-Cerezo S, Hernández-Cuevas LV, Mendoza de Gives P, Pérez-Moreno J, Reyes-Estebanez MMJ, Hernández-Ávila M. Plan Nacional de Acción sobre los Recursos Genéticos Microbianos de México.

Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Colegio de Postgraduados, México. 2011a:244.

- Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón R, Alatorre-Rosas R, Almaraz JJ, Arteaga-Garibay R.I, Ferrera-Cerrato R, Gamboa-Angulo MM, Giono-Cerezo S, Hernández-Cuevas LV, Mendoza de Gives P, Pérez-Moreno J, Reyes-Estebanez MMJ, Hernández-Ávila M. Recursos genéticos microbianos de México, Diagnóstico Nacional. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Colegio de Postgraduados, México. 2011b:180.
- TIRFFA. 2020. Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/plant-treaty/es/>
- Whitehorn PR, Navarro LM, Schrôter M, Fernandez M, Rotlan-Puig X, Marques A. Mainstreaming Bioersity: a review of national strategies. *Biological Conservation* 2019;235:157-163.
- UAQ. 2020. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales. Disponible en: <https://fcn.uaq.mx/>



Capítulo 2

El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación de recursos zoogenéticos de especies domésticas

José Fernando De La Torre Sánchez, Horacio Álvarez Gallardo, David Urbán Duarte, Sandra Pérez Reynozo
Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP.
delatorre.fernando@inifap.gob.mx

Introducción.

En el presente documento se aborda la importancia de la estrategia de conservación *ex situ* e *in vitro* de los Recursos Genéticos Animales (RGA), esto como complemento a las acciones de conservación de poblaciones animales en su entorno natural (*in situ*) y en condiciones controladas y de producción (*ex situ*, *in vivo*). La conservación *ex situ* e *in vitro* se da en nitrógeno líquido, a temperaturas de 196 °C bajo cero, donde es posible preservar células espermáticas (semen), embriones, óvulos y células somáticas. La criopreservación de semen es una tecnología que data de hace casi 75 años y es de uso rutinario en todas las especies domésticas (con la excepción de algunas especies de aves), siendo la conservación de semen el método más utilizado para la conservación *ex situ in vitro* de recursos genéticos animales, en los bancos de germoplasma a nivel mundial. La desventaja, sin embargo es que se esta conservando únicamente la mitad del acervo genético necesario para crear un individuo igual al de la dosis de semen, lo que requiere estrategias como el cruzamiento absorbente, para restituir un genotipo que se conserva en semen. La criopreservación de embriones es la mejor opción para conservar la diversidad genética de un grupo racial y ofrece la vía más rápida para restaurar una población con características favorables. Pese a lo anterior, en la actualidad sigue siendo comparada con el procesamiento de semen, una técnica que requiere más inversión, más recursos técnicos y más infraestructura, para la producción de cada unidad de



germoplasma, por lo que su uso en bancos de germoplasma es muy limitado, del orden del 5% a nivel mundial. No obstante, existe consenso global de la necesidad de incrementar el resguardo de embriones en los bancos de germoplasma del mundo. La crioconservación de embriones producidos *in vitro* y óvulos, básicamente por vitrificación, son tecnologías en fase de desarrollo y su uso en bancos de germoplasma es mínimo. La conservación de células somáticas es un procedimiento simple y rutinario, aunque su posible empleo para la generación de germoplasma por trasplante nuclear ha sido aplicado en muy pocos países y a un nivel mínimo.

Con la excepción de los guajolotes y de las abejas sin aguijón (Meliponas y Trigonas), las especies animales domesticadas que hoy sustentan la producción pecuaria en México no son nativas de América. Bovinos (europeos y cebuinos), equinos (caballos y asnos), ovinos (de lana y de pelo), caprinos, porcinos y gallinas fueron introducidos al continente provenientes de España y Portugal, hace aproximadamente 500 años; dando origen, después de cinco siglos de adaptación a condiciones edafoclimáticas y de producción específicas, a razas denominadas como localmente adaptadas, también conocidas genéricamente como criollas, con denominaciones específicas de acuerdo a las regiones donde han permanecido, y que en la actualidad juegan un papel socioeconómico y ecológico importante en diferentes regiones del mundo, fuertemente asociadas a Pueblos Originales y grupos de población de bajos recursos (Gallardo *et al.*, 2002). Las razas localmente adaptadas son consideradas un recurso genético valioso por su capacidad de producir en condiciones adversas de clima y alimentación y si bien son en general consideradas de baja producción, al ser entes biológicos capaces de producir de forma sustentable en condiciones difíciles y con bajos insumos, se vuelven opción en su forma pura o en cruzamiento para escenarios adversos, actuales o futuros (desertificación, cambio climático). Las poblaciones criollas se encuentran actualmente en su mayoría bajo el estatus de amenazadas o en extinción y por ello se requiere la aplicación de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, que ayuden a preservar esta fuente potencialmente valiosa de variabilidad genética, de cara a condiciones ambientales cambiantes (FAO, 2016; Martínez, 2005; Perezgrovas, 2003).



La introducción reciente de especies domésticas animales a nuestro país (segunda mitad del siglo XIX a la fecha), ha traído razas de bovinos especializadas en la producción de leche y carne, cerdos, ovinos, caprinos y aves, con características productivas sobresalientes, pero con mayores requerimientos de condiciones ambientales adecuadas, más y mejores insumos y manejo. Por otra parte, los programas de mejoramiento genético que se aplican en estos genotipos, basados en evaluaciones genéticas y genómicas, orientados a necesidades específicas de producción y el uso intensivo que se da a los animales sobresalientes gracias al uso de herramientas reproductivas como la congelación de semen e inseminación artificial, van reduciendo el espectro de variabilidad genética de estas razas. Lo anterior, genera la necesidad de que se establezcan estrategias de conservación *ex situ* que permitan conservar el germoplasma de individuos relevantes a lo largo del tiempo y así preservar variabilidad genética que pudiera desaparecer ante los cambios acelerados que experimentan estas razas y tenerla disponible para la reintroducción de germoplasma con características particulares al pool genético de la raza cuando así se requiera (CONARGEN, 1999).

Los diferentes métodos disponibles para la conservación de recursos genéticos pecuarios se agrupan en dos principales formas: la conservación *in situ* (conservación de las poblaciones en su hábitat de origen o de domesticación), que tiene la ventaja de permitir la continua evolución y adaptación de los grupos raciales, en respuesta a cambios en el medio ambiente, pero que deja más expuestos a estos recursos a su reducción o desaparición por destrucción o fraccionamiento de hábitats, ocasionados por desastres naturales o por factores antropocéntricos. La conservación *ex situ* (conservación del germoplasma fuera de su ambiente natural) es por contraparte una forma inmediata y segura de conservar el recurso genético y tenerlo disponible en cualquier momento. Lo anterior permite agregar variabilidad genética a las poblaciones *in vivo* e incluso, para reintroducir especies cuya población es escasa o extinta, pero que, a menos que se estén actualizando las colecciones de manera continua, no responde a los cambios en las condiciones ambientales y de mercado. Estos dos métodos son relevantes y complementarios y aunque siempre será la conservación *in situ* la forma más recomendable para conservar la variabilidad de las poblaciones y promover cambios adaptativos a



condiciones ambientales y de producción, la conservación *ex situ*, que se da principalmente en bancos de germoplasma deberá ser una herramienta complementaria estratégica para asegurar la supervivencia de las especies (Goodwin *et al.*, 2012; Leroy *et al.*, 2019).

En RGA, la conservación *ex situ* se puede dar a través del mantenimiento de poblaciones animales en condiciones controladas y a través de la conservación *in vitro* de germoplasma animal. En los países en desarrollo, es más común observar que se conservan poblaciones vivas, lo cual es; sin embargo más costoso que la conservación del germoplasma. Lo anterior implica riesgos mayores al adecuado mantenimiento de estas, por lo que la recomendación de FAO es que se implementen en estos países estrategias de conservación *in vitro* de RGA (Gibson *et al.*, 2006; FAO, 2021). El término germoplasma animal, se refiere colectivamente a células que, por sí mismas o en combinación (primordialmente embriones en estadios de pre-implantación, células espermáticas y óvulos) dan origen a descendencia viva. El germoplasma animal se conserva en muy bajas temperaturas (usualmente en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). La criopreservación de germoplasma animal no sólo tiene impacto como método de conservación *ex situ* de RGA, también es una herramienta reproductiva utilizada en ganadería para diseminar ampliamente la genética de animales superiores a través de la inseminación artificial con semen congelado y de la transferencia de embriones, tanto producidos *in vitro* como obtenidos *in vivo*. Basta decir que, en 1998, más de 250 millones de dosis de semen proveniente de toros genéticamente superiores fueron criopreservadas a nivel mundial y que más de 100 millones de vacas recibieron su primer servicio de inseminación artificial de esas dosis (Mazur *et al.*, 2008).

En la declaración de Interlaken, se establece en su prioridad estratégica N° 9 que se deben crear o potenciar los programas de conservación *ex situ* y lo presenta de esta manera: *“Las medidas de conservación ex situ proporcionan una garantía de seguridad frente a las pérdidas de recursos zoogenéticos sobre el terreno, que se puede dar bien a través de la erosión o como resultado de emergencias. Las medidas ex situ complementan las medidas in situ, con las que deberían estar vinculadas, cuando proceda. Las colecciones ex situ también pueden desempeñar una función activa en los programas estratégicos de mejora*



genética" (FAO, 2007). La conservación *ex situ in vitro* de RGA se establece como una prioridad para asegurar que el valor genético de animales con características favorables para la producción o la probada resistencia a factores bióticos y abióticos sea respaldada a través de la crioconservación del germoplasma animal y su resguardo en bancos de germoplasma, en función de su capacidad para generar descendencia con características favorables. Así, diferentes fuentes de germoplasma animal (semén, embriones, óvulos, células somáticas) pueden ser crioconservadas y eventualmente utilizadas bajo diferentes esquemas según sea el propósito de esta regeneración (FAO, 2021; Sonesson *et al.*, 2002).

La criopreservación de germoplasma animal demanda conocimientos y tecnología en diferentes áreas del conocimiento, como son: fisiología animal, biología celular, embriología, cultivo *in vitro* de células y criobiología, entre otras. El mantener la viabilidad de los gametos, embriones y células somáticas después de someter el germoplasma a procesos de colección, dilución, cultivo, co-cultivo, adición de componentes orgánicos y químicos, exposición a sustancias tóxicas (crio protectores), enfriamiento y congelación, es el gran reto que enfrenta la conservación de RGA y se ha generado una gran cantidad de información desde la década de los 1940's, cuando se descubrieron las cualidades crio protectoras del glicerol para la criopreservación de la célula espermática. A la fecha el reto a vencer es la vitrificación de óvulos con tasas de sobrevivencia al proceso adecuadas para el propósito de conservación. En los siguientes párrafos se hace una breve reseña del estado del conocimiento de las diferentes biotecnologías reproductivas usadas como herramienta para la conservación *in vitro* de germoplasma animal.

Conservación de semen.

La criopreservación de semen cuenta con más de 70 años de investigación, a partir del descubrimiento fortuito de la capacidad crioprotectora del glicerol en células espermáticas (Polge *et al.*, 1949) y es actualmente una tecnología de uso rutinario en todas las especies domésticas, tanto para la conservación de germoplasma como para el uso productivo (inseminación artificial). Adicionalmente, gracias a la posibilidad de agregar diluyentes a un eyaculado para incrementar su volumen, es posible generar varios cientos de unidades de germoplasma



de una sola colecta de semen. Estos hechos colocan a la conservación de semen como el método preferido y más utilizado para la conservación *ex situ* de RGA en los bancos de germoplasma a nivel mundial (FAO, 2021; FAO, 2012). La desventaja es que se está conservando únicamente la mitad del acervo genético necesario para crear un individuo, y para poder generar una población del genotipo conservado que se desea traer a la vida, se requieren varias generaciones de cruzamiento absorbente (4 a 5 para obtener animales con 94 a 97 % de la composición genética deseada) (Ollivier and Renard, 1995). La practicidad que ofrece la criopreservación de semen, minimiza esta desventaja; además, las unidades de germoplasma de semen son perfectamente apropiadas para otros propósitos de la conservación, como manejar la diversidad genética en poblaciones *in situ*. El semen criopreservado va a complementar también las colecciones de otros tipos celulares, tales como embriones y ovocitos. En adición, con el uso de semen como fuente de germoplasma, los genes provenientes del genoma mitocondrial no son transmitidos a la descendencia, lo cual puede resultar en variaciones en la transmisión de los caracteres deseados (Troy *et al.*, 2001).

Una última consideración en este apartado, es la dificultad que entraña la colección de muestras de semen como recurso genético, pues a diferencia de la colección comercial de individuos de alto mérito genético, que se realiza en instalaciones sanitariamente aseguradas, los machos que se colectan como resultado de la identificación de animales candidatos a representar la variabilidad genética en una población, por lo general están dispersos y resulta muy complicado asegurar condiciones sanitarias al momento de la colección (FAO, 2021). Por ello, es importante contar con métodos sensibles y específicos de evaluación de germoplasma posteriores a la criopreservación, que permitan asegurar la calidad sanitaria del recurso genético a resguardar. El factor sanitario es crítico cuando se trata de resguardar el semen como germoplasma a largo plazo y con posible necesidad futura de distribuirlo hacia otras naciones. Por ello, investigaciones recientes orientadas a sustituir los componentes orgánicos de origen animal (yema de huevo, leche) con componentes vegetales con propiedades similares (lecitina de soya, leche de coco) (Layek *et al.*, 2016; Nitin *et al.*, 2018), resultan relevantes para la conservación de semen como germoplasma al suprimir la posibilidad de transporte de enfermedades contenidas en componentes de origen



animal en el diluyente, a través de la distribución nacional e internacional del semen.

La criopreservación de semen en mamíferos domésticos ha sido llevada en mayor o menor medida a planos de uso rutinario para fines productivos y comerciales, lo que asegura la disponibilidad de protocolos estandarizados y probados para fines de conservación como recurso genético. En las aves, existe información generada en los últimos 50 años, en cuanto a criopreservación de semen de especies domésticas, uso de crioprotectores, congelación lenta y rápida, métodos de descongelado y métodos de empaque; no obstante, aunque se ha congelado con éxito semen de guajolotes, patos, gansos, palomas e incluso algunas especies silvestres, los métodos más robustos y exitosos son los desarrollados para gallos. Blesebois (2007) menciona que la investigación en criopreservación de semen aviar con fines de conservación de recursos genéticos debe apuntar a tres objetivos: a) mejoramiento de predictores para reconocer machos con mejores posibilidad de producir semen congelable; b) estandarización de protocolos de congelación de semen en especies diferentes al pollo y c) promover el desarrollo de criobancos de semen de ave (mencionando que en la actualidad sólo existen tres bancos de semen de aves consolidados, en USA, Holanda y Francia).

Conservación de embriones.

La criopreservación de embriones es la mejor opción para conservar la diversidad genética de una población y ofrece la vía más rápida para restaurar una población con características favorables (FAO, 2012; FAO 2021). Aunque la producción de embriones a través de multiovulación y colección no quirúrgica (o mediante producción de embriones *in vitro*) y su posterior criopreservación es una técnica rutinaria en la actualidad (Mapletoft, 2012; Mapletoft *et al.*, 2015), sigue siendo, con respecto a la producción de semen un procedimiento que requiere mayor inversión, más recursos técnicos y de equipamiento y la producción por colección, por animal es menor (5.5 embriones congelables por colección para el caso de los bovinos). Por lo anterior, su uso en bancos de germoplasma es mucho menor (menos del 5% con respecto al semen), aunque existe consenso a nivel global de la importancia de incrementar el porcentaje de



conservación en forma de embriones en los bancos de germoplasma (FAO, 2012; FAO, 2021).

Una cantidad importante de estudios se han realizado en torno a mejorar la calidad y cantidad de embriones potencialmente viables por hembra donadora, en un lapso de tiempo determinado. En lo que se refiere a incrementar el número de embriones viables, congelables por tratamiento de superovulación, se ha logrado avanzar muy poco, con resultados inconsistentes. En un estudio retrospectivo realizado sobre la producción de embriones en bovinos productores de leche, se encontró que en un período de 20 años, aunque se ensayaron procedimientos novedosos, la respuesta en términos de embriones congelables no aumentó (Hasler, 2006). Sin embargo, otra forma de incrementar la cantidad de embriones viables producidos por hembra, por unidad de tiempo, es incrementando la frecuencia de multiovulaciones y sus respectivas colectas embrionarias lo que se puede lograr reduciendo el intervalo entre superovulaciones. Se ha generado una tecnología denominada reciclado rápido de donadoras que ha permitido reducir de 60-70 a 33-35 días el intervalo entre tratamientos de superovulación sin menoscabo de la respuesta ovulatoria hasta en 18 tratamientos consecutivos, ofreciendo la posibilidad de casi duplicar la producción de embriones congelables por vaca por año. (Hasler, 2003). La producción *in vivo* de embriones se realiza con mayor o menor eficiencia en las diferentes especies de mamíferos domésticos y la posterior crio preservación de los embriones es también un procedimiento rutinario, realizado por el método de congelación lenta y en vigoroso desarrollo por el método de vitrificación (Valente *et al.*, 2017; Saragusty and Arav, 2011).

Una limitante importante para la producción *in vivo* y criopreservación de embriones con fines de resguardo de recursos genéticos es la falta de información del uso de estos procedimientos en mamíferos domésticos de razas localmente adaptadas. Es necesario, por ejemplo, definir si estos animales presentan respuesta óptima a la superovulación con tratamientos hormonales tal y como se usan con razas modernas, toda vez que estos primeros son por lo general de talla más pequeña y no están sujetos a estrés por alta producción. En este sentido, Villaseñor *et al.*, (2017) encontraron que utilizando dosis reducidas de hormona folículo estimulante con respecto a la dosis estándar recomendada para ganado de carne la respuesta ovárica se redujo, contrario a lo que ocurre con



ganado cebuino, donde se obtienen mejores resultados con dosis reducidas (De La Torre, *et al.*, 1992) y que en general la respuesta fue menor a la observada con razas modernas de ganado europeo y cebuino. Lo anterior resalta la importancia de generar información relacionada con procedimientos de obtención y criopreservación de embriones en razas localmente adaptadas.

La producción *in vitro* de embriones ha surgido en los últimos años como una alternativa prometedora para la obtención de embriones, tanto para fines comerciales como para la criopreservación de estos como recurso genético. La obtención de los óvulos de animales vivos a través de la aspiración folicular por la vía transvaginal (TVA) permite la selección de la hembra de la cual se obtendrán los gametos femeninos, que al fertilizarse *in vitro* con semen de un macho seleccionado *ex profeso* para los óvulos obtenidos, producirán embriones con la carga genética deseada. Esta tecnología se ha desarrollado en la mayoría de las especies domésticas y en especies como el bovino han sido exitosas en producir embriones a niveles comparables o mayores a la producción *in vivo* de embriones (Mapletoft and Hasler, 2005; Moreira *et al.*, 2010; Viana, 2018).

La verdadera limitante que se presenta con el embrión producido *in vitro* es la dificultad para obtener adecuadas tasas de sobrevivencia embrionaria después de la criopreservación; lo anterior debido a que el embrión producido *in vitro* presenta anomalías morfológicas y fisiológicas, entre las que destaca una excesiva acumulación de lípidos intracitoplasmáticos con un efecto directo en la resistencia del embrión al proceso de crio preservación (De la Torre *et al.*, 2006). Esta limitante ha sido resuelta desde dos perspectivas. En primera instancia, con el desarrollo de medios para la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de óvulos y embriones que son completamente definidos, es decir, que no contienen componentes de origen animal, que necesariamente vienen con otros compuestos indisociables y variables en su concentración. Esto no solamente presenta la ventaja de asegurar la calidad sanitaria de los embriones que se producen (Hasler, 2010), sino que reduce considerablemente la acumulación de lípidos en el embrión (Summers and Biggers, 2003). La segunda es, la utilización del método de vitrificación para criopreservar los embriones. Este método que es descrito en la siguiente sección, ofrece una alternativa para incrementar la viabilidad de embriones producidos *in vitro* después de la criopreservación, en



comparación con el método de congelación lenta (Saragusty and Arav, 2011).

Conservación de óvulos.

La criopreservación de óvulos tiene la importancia estratégica de permitir, junto con la criopreservación de semen, la realización de cruzamientos programados con fines específicos, aún cuando los progenitores ya no estén disponibles. Esta opción cobra mayor relevancia cuando se detecta un alto valor de la descendencia en una cruce específica de dos individuos. La criopreservación de óvulos como germoplasma, sin embargo; reviste importantes dificultades técnicas y es una tecnología en constante desarrollo (Dhali *et al.*, 2018), por lo que es muy reducido el número de unidades de germoplasma actualmente conservadas en los bancos de germoplasma a nivel mundial. (FAO, 2012). La vitrificación es el método de criopreservación que mejores resultados ha brindado en óvulos; este método requiere tiempos cortos de exposición a las sustancias crioprotectoras y una tasa de enfriamiento ultrarrápida (mas de 15,000 °C/min). Diversos métodos se han ensayado con relativo éxito; sin embargo, todos ellos implican la exposición en mayor o menor grado al nitrógeno líquido, con la consecuente posibilidad de contaminación (Mapletoft y Hasler, 2005). El desarrollo de un método aséptico de vitrificación de ovocitos, sin que la muestra entre en contacto con el nitrógeno líquido es de vital importancia para la criopreservación de ovocitos en bancos de germoplasma. Recientemente se han desarrollado métodos para la vitrificación aséptica de ovocitos, con resultados variables. (Dujíčková *et al.*, 2021; Vajta, *et al.*, 2015).

Conservación de células somáticas.

Existe también la opción de crioconservar células somáticas. Estas pueden ser utilizadas para obtención de ácidos nucleicos con fines de caracterización molecular o realizar trasplante nuclear (clonación). Si bien la obtención, preparación y criopreservación de células somáticas, así como la eventual extracción de los ácidos nucleicos son procedimientos estandarizados y relativamente sencillos, la aplicación de tecnologías como la clonación, traen la dificultad de requerir mayor aporte de

tecnología. Con miras a realizar estos procedimientos a futuro, la crioconservación de células somáticas puede ser considerada como una opción razonable de conservación en bancos de germoplasma animal (Groenveld et al., 2008). Se recomienda que este procedimiento se realice al momento de colectar germoplasma (semen, óvulos, embriones) a los individuos seleccionados para conservación.

Consideraciones finales.

Aunque existen alternativas tecnológicas para la crioconservación de todo tipo de germoplasma animal (semen, embriones, óvulos, células somáticas y hasta larvas en el caso de germoplasma acuático), debido al nivel de tecnología requerido y altos costos de conservación de embriones y óvulos, los bancos de germoplasma animal en el mundo sólo conservan en su mayoría semen; esto con las limitantes que conlleva la conservación de sólo el gameto masculino y por ende sólo la mitad de la carga genética necesaria para producir un animal vivo. La mejor alternativa de conservación son los embriones, ya sea que se obtengan *in vivo* o que sean producidos *in vitro*.

No sólo es importante la conservación de RGA de razas localmente adaptadas por el estado de riesgo en que se encuentran, pero también lo es la conservación de germoplasma de razas de reciente introducción y alta productividad, pues en estas se puede observar reducción de la base genética de la raza por el uso intensivo de la IA a partir de pocos sementales; esto es particularmente relevante en bovinos.

Es importante puntualizar, por último, que el aseguramiento del estatus sanitario de las unidades de germoplasma destinadas a conservación, no sólo va a evitar el transporte de enfermedades a otros países al realizarse distribuciones internacionales de RGA, también va a contribuir a mantener la sanidad de nuestras unidades de producción pecuarias.

Literatura consultada.

- CONARGEN, 1999. Programa Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios. Documento Corporativo del Consejo Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios, México, D.F. Disponible en



- <http://www.conargen.mx/index.php/acerca-del-conargen/documentos-corporativos>.
- Dhali A, Kolte P, Mishra A, Sudhir CR, Bhatta R. 2018. Cryopreservation of oocytes and embryos: Current Status and Opportunities; In: Infertility, Assisted Reproductive Technologies and Hormone Assays, Dhastagir Sultan Sheriff, IntechOpen. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/64778>.
 - De La Torre SJF, Castro LMA, González PE, Reynoso CO. Respuestas de Vacas Cebú a superovulaciones sucesivas con FSH. *Técnica Pequeña* Mexico. 1992;30:223-231.
 - De La Torre SJF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE. Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction Fertility and Development*. 2006;18: 597-607.
 - Dujíčková L, Makarevich A, Olexiková L, Kubovičová E, Strejček F. Methodological approaches for vitrification of bovine oocytes. *Zygote*. 2021;29:1-11.
 - FAO. Plan de acción mundial sobre los recursos zoogenéticos y la declaración de Interlaken. Comisión de Recursos Genéticos para la alimentación y la agricultura. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. Roma. 2007.
 - FAO. Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines N° 12. Rome. 2012.
 - FAO. The contributions of livestock species and breeds to ecosystem services. *Ecosystem Services and Biodiversity*. Rome. 2016.
 - FAO. Innovations in Cryoconservation of Animal Genetic Resources. Draft Technical Guidelines. Intergovernmental Technical Working Group on Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy. 2021.
 - Gallardo N, Enciso SA, Núñez DR, Vega MCA, Vásquez PC, Galván AD, Ruiz LF, Torres FG, Mondragón VI, Quezada EJJ, Solís RJ, Magaña MJG, Montañó BM, Ramírez NR. Informe sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios de México. *SAGARPA, México. Claridades Agropecuarias* 2002;111:1-39.
 - Gibson J, Gamage S, Hanotte O, Iñiguez L, Maillard JC, Rischkowsky B, Semambo D, Toll J. Options and strategies for the conservation of



- farm animal genetic resources. Report of an International Workshop in Montpellier, France. Bioversity International, Rome. 2006.
- Goodwin SF, Friedmann T, Dunlap JC. Biotechnologies for the management of Genetic Resources for food and agriculture. In: Advances in Genetics. Academic Press. 2012;78:6-112.
 - Hasler JF. The current status and future of comercial embryo transfer in cattle Animal Reproductive Science. 2003;79:245-264.
 - Hasler JF. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. Theriogenology. 2006;65:4-16.
 - Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. Reproduction Fertility and Development. 2010;22:119-125
 - Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders. Animal Reproduction Science. 2016;172:1-9.
 - Leroy G, Boettcher P, Besbes B, Danchin-Burge C, Baumung R, Hiemstra SJ. Cryoconservation of Animal Genetic Resources in Europe and Two African Countries: A Gap Analysis. Diversity. 2019;11:240.
 - Mapletoft RJ. Perspectives on bovine embryo transfer. In: WCDS Advances in Dairy Technology University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. 2012;24:83-93.
 - Mapletoft, R.J. y Hasler, J.F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. Science Technology. 2005;24:393-403.
 - Mapletoft RJ, García GA, Dias F, Singh J, Adams GP. *In vitro* and *in vivo* embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. Animal reproduction. 2015;12:383-388.
 - Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Criopreservation of the germplasm of animals used in Biological and medical research: Importance, impact, status, and future directions. Biol Reprod. 2008;78:2-12.
 - Moreira VJH, Bruno SLG, Pereira PM, Camargo LSA. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. Acta Scientiae Veterinariae. 2010;38:661-664.
 - Ollivier L, Renard JP. The costs of cryopreservation of animal genetic resources. In Book of abstracts of the 46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Wageningen, the Netherlands. Wageningen Press. 1995;57.



- Perezgrovas R. 2003. El borrego Chiapas criollo. Una historia de vellones, mercados mundiales y mujeres de polleras de lana. Revista Biodiversidad Sustentable y Culturas; N° 37, Julio del 2003.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949;164:666-666.
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction. 2011;141:1-19.
- Sonesson AK, Goddard ME, Meuwissen TH. The use of frozen semen to mini- mize inbreeding in small populations. Genetical Research. 2002;80:27-30.
- Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Hum Reprod Update. 2003;9:557-82.
- Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, *et al.* Genetic evidence for near-eastern origins of European cattle. Nature. 2001;410:1088-1091.
- Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. Reproductive BioMedicine Online. 2015;30:325-333.
- Valente SB, Fonseca ZA, Covre da Silva N, Morotti F, Marcondes SM. Cryopreservation of *in vitro*-produced embryos: challenges for commercial implementation. Animal Reproduction. 2017;14:521-527.
- Viana JHM. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals, embryo industry on a new level: over one million embryos produced *in vitro* IETS data retrieval committee. In: Embryo Technology Newsletter. 2018;36:1-15.
- Villaseñor GF, De La Torre SJF, Martínez VG, Álvarez GH, Pérez RS, Palacios FJA, Polanco SR, Montañó BM. Caracterización de la respuesta ovárica a la superovulación en bovino Criollo Coreño utilizando dosis reducidas de FSH, Revista Mexicana Ciencias Pecuarias. 2017;8:225-232.



Capítulo 3

Recursos genéticos de pequeños rumiantes

Las razas localmente adaptadas de ganado ovino en México

Raúl Andrés Perezgrovas Garza

Instituto de Estudios Indígenas. Universidad Autónoma de Chiapas

rgrovas@unach.mx

Introducción.

De conformidad con la base de datos del sistema de información sobre la diversidad de los animales domésticos (DAD-IS), publicada de manera virtual por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en México existen 20 razas de ovejas transfronterizas y únicamente cinco razas locales de ovinos. Este organismo internacional define a las razas locales, de cualquier especie, como aquellas que “se encuentran sólo en un país”, mientras que las transfronterizas están en varios de ellos (FAO, 2007).

A pesar de estar representadas en los catálogos de recursos zoogenéticos más importantes, las razas locales de ovinos en México son poco conocidas, y tal vez por ello son poco valoradas, incluso en nuestro propio país; la difusión de sus ventajas y características ayudará a fomentar su estudio y su preservación para las generaciones futuras. Es en este orden de ideas que la formación de núcleos de animales *in situ* y *ex situ*, la biotecnología reproductiva y la criopreservación del material genético de dichas razas se convierten en herramientas necesarias para cumplir ese objetivo.

La relevancia de estudiar, preservar y fomentar las razas locales de ganado lanar en México deriva de varios aspectos; uno de ellos es la contribución



que han hecho a la historia de la cría animal en México, debido a que son grupos genéticos antiguos que pueden ser rastreados varios siglos atrás. Otro elemento a considerar es el aporte que estas razas locales hacen a la cultura de los pueblos que las mantienen en estado productivo, lo que se puede asociar a la conservación de tradiciones (fiestas, ritos, ceremonias, vestimenta típica); además, la persistencia de los animales a lo largo del tiempo es señal de que las prácticas empíricas de manejo que se han diseñado para mantenerlos son eficientes, y de ahí su contribución a la zootecnia.

Desde el punto de vista genético, las razas locales de ganado lanar representan un conjunto de genes valiosos que proporcionan resistencia a enfermedades, rusticidad ante ambientes adversos, y capacidad de adaptación a una amplia gama de entornos geográficos y recursos alimenticios. Finalmente, no puede soslayarse la protección que estas razas locales significan ante la amenaza de los efectos del cambio climático que ya vivimos, ante los cuales las razas exóticas o especializadas tienen menos defensa.

Problemática.

Las razas locales de ganado ovino, tanto aquellas actualmente incluidas en el sistema de información de la diversidad de animales domésticos de la FAO, como otras más que se están estudiando en México en este momento, están amenazadas de sufrir extinción en el futuro cercano. Los propios datos de la FAO explican que "*la mayor amenaza a la diversidad genética*" está constituida por los cruzamientos no controlados con ejemplares o germoplasma de "*un número reducido de razas*" transfronterizas (FAO, 2007). Para contrarrestar esta situación, dicho organismo mundial propone que se actualice el acervo de conocimientos sobre todas las razas, y esto es precisamente lo que intenta el presente capítulo: mostrar nueva información sobre las razas locales de ganado lanar en México, para conocerlas mejor y para darles el valor cultural, zootécnico y genético que les corresponde.

Justificación.

La información sobre las razas locales de ganado ovino en México es limitada, y en muchos casos se difunde apenas al nivel regional; además,



no todas están incluidas en el sistema de información de la diversidad de animales domésticos de la FAO o en los catálogos de las instancias federales que se dedican al sector pecuario. Las cifras publicadas recientemente sobre la población de ganado ovino en México (SIAP, 2020) refieren un hato nacional de poco más de 8.7 millones de cabezas, sin especificar las razas de que se trata. Además, de manera no especificada, el Informe Nacional sobre la situación de los recursos zoogenéticos, preparado por la SAGARPA (2012), hace mención de la existencia en México de 13 razas localmente adaptadas de ovinos y tan solo nueve exóticas, datos que no corresponden con la información de la FAO. Por desgracia no hay datos precisos sobre las razas locales de las cuales se está hablando en ese informe oficial.

Es por todo lo anterior que se requiere mostrar las principales características de cada una de las razas locales de ovinos del país, para lo cual en este documento se presenta una semblanza etno-zootécnica. Con esto se estará cumpliendo el postulado de la FAO, que establece que “*es primordial mejorar el conocimiento de las razas y sistemas de producción*” (FAO, 2007). Como se revisa más adelante, algunas razas ovinas locales son ahora reconocidas debido a la cantidad de trabajo académico realizado con ellas desde hace varios años; es el caso del Borrego Chiapas y el ovino Pelibuey, pero otras más son prácticamente desconocidas, como la Lucero (presente en el catálogo de la FAO), o las de reciente postulación académica como la Chocholteca de Oaxaca y la Chapingo del Estado de México.

Las razas ovinas reconocidas por la FAO.

El sistema de información de la diversidad de animales domésticos de la FAO, es un valioso instrumento de consulta que hace un recuento de las razas presentes en los países afiliados, de todas las especies de animales domésticos. Al consultar el caso específico de México, y particularmente para la especie ovina, se puede constatar que la mayoría de las razas son transfronterizas (20) y que sólo cinco pertenecen al grupo de razas localmente adaptadas, las cuales, en orden alfabético, son: Borrego Chiapas, Criollo, Lucero, Pelibuey o Tabasco y Tarahumara.



Es conveniente recordar que la información que se encuentra en esta base de datos mundial debe ser recopilada en los países de origen por las instancias oficiales, que en el caso de México están representadas por la Coordinación General de Ganadería de la actual Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), tras lo cual es enviada a la FAO en Roma para justificar su inserción en el sistema global de información (DAD-IS). La fuente de referencia para las dependencias nacionales recae generalmente en la academia, pues los grupos de investigación de manera continua están presentando avances en los congresos, y de forma paralela están publicando sus resultados en Memorias, Revistas diversas y Libros especializados.

Para el caso de la especie ovina, la base de datos de la FAO identifica en México 20 razas transfronterizas, las cuales, contrariamente a lo que pudiera pensarse, tienen registrada muy poca información, si acaso el nombre oficial en el idioma de origen y algún dato sobre el nivel de riesgo asociado al tamaño de la población; este fue el caso para varias de las razas transfronterizas como Corriedale, Hampshire Down y Rambouillet, e incluso, para algunas de las razas más conocidas, como la Merino, apenas se menciona que se dedica a la producción de lana, o la Katahdin, de la que sólo se establece que es importada y exótica. De este modo, la mayor parte de la información sobre razas ovinas de México —publicada en la base de datos de la FAO— se refiere a las cinco razas locales de ganado lanar.

En este capítulo se hace un análisis más preciso y comparativo de la información que incluye la FAO en su base de datos para las ovejas locales de México. En el Cuadro 1, se pueden apreciar algunas de las características referidas por el organismo internacional para dichas razas locales mexicanas, y su análisis pone de manifiesto varios puntos que vale la pena desglosar. Primero, las cinco razas podrían ser en realidad seis, debido a que la base de datos de la FAO trae información por separado para la oveja Pelibuey y para el borrego Tabasco, cuando en México sabemos que son la misma; es por ello que en este trabajo se consideran como una sola raza local. Igualmente destaca que el nombre con el que se inscribió la raza de ganado lanar Tarahumara está equivocado, y que ese error ha pasado desapercibido durante muchos años.

Otro elemento a resaltar es que la información de algunos descriptores es muy detallada para algunas razas locales, pero muy escueta para otras;

este es el caso de la “descripción de los usos específicos”, que en el Borrego Chiapas es muy amplia (Figura 1), mientras que para las otras cuatro razas ni siquiera se menciona. Sobre el “origen y desarrollo” de las razas, los datos son considerables para el ovino “Criollo”, mencionando incluso las que pudieron ser las razas originarias, no así para la Lucero y la Tarahumara, que se registran apenas como “variedad del Criollo”. En cuanto a la “localización de la subespecie”, la información es diversa, pues mientras que es muy definida para el Borrego Chiapas, el Criollo dice estar “en las tierras altas” y el Pelibuey en la “región tropical”. Mención aparte se hace aquí de la oveja Lucero, cuya localización en las “montañas del sur de México” invita a pensar que se trata del mismo Borrego Chiapas (Figura 1) en su variedad negra. No existen en México reportes específicos sobre la oveja Lucero, lo cual hace más factible la hipótesis anterior.



Figura 1. Variedades fenotípicas del Borrego Chiapas.

Cuadro 1. Información de las razas ovinas localmente adaptadas en México, según el sistema de información DAD-IS de la FAO.

Información Raza local	/ Borrego Chiapas	Criollo	Lucero	Pelibuey o Tabasco	Tarhumara [sic]
Nombre común	Borrego Chiapas	Criollo, Chusco	Lucero	Pelibuey, Tabasco, Rojo Cubano	Tarhumara
Usos específicos	Para lana. La lana es utilizada para elaborar vestimenta tradicional para uso diario y ceremonial, y para artesanías	Para carne	Para lana	Para carne	Para lana
Nivel de riesgo	Desconocido	Fuera de riesgo	Desconocido	Fuera de riesgo	Desconocido
Origen y desarrollo	Son descendientes de razas ovinas introducidas por los españoles	Desciende del Churro español y probablemente también del Merino español (1548-1812)	Variedad del Criollo	Parte del grupo de Ovejas de Pelo americanas	Variedad del Criollo
Localización de la subespecie	Chiapas	Tierras altas de México	Montañas del sur de México	Región tropical, Golfo de México	
Información sobre cualidades	Bien adaptadas a las áreas montañosas	Se reporta resistente a infestación endoparasitaria			
Información morfológica	Peso medio = 28 kg, en machos y hembras	Se conoce como poco prolífica pero de buena fertilidad			
		Peso medio = 32.8 kg machos y 26.1 kg hembras.	Color negro con mancha blanca en la cabeza	Altura a la cruz = 65 cm machos y 62 cm hembras.	Peso medio 47 kg

	Negro o blanco sólido, pinto	machos y hembras. Machos tienen en garganta y cuello. Colores: canela, rojo, blanco o pinto	37.5 kg
Información de la fibra	Vellón = 1.06 kg Lana burda/tipo tapete	Raza de pelo	
Información de rendimiento	Sólo las mujeres están involucradas en la cría de ovejas. Los borregos son llevados a pastoreo todos los días, y durante la noche se mantienen en un corral cerca de la vivienda	Tamaño de camada = 1.02	Peso al nacimiento = 2.7 kg Tamaño de camada = 1.34
Población Programa de criopreservación			100,000 (2006)

* Desde 2016, en el CNRG-INIFAP. Fuente: <http://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/es/>



En el caso de las “cualidades” de las razas locales, la FAO sólo habla de la adaptación del Borrego Chiapas, pero de varias características del Criollo, como su resistencia a parasitosis y sus bondades reproductivas no hay información. La “información morfológica” es abundante para el Pelibuey, cuando para otras razas apenas se menciona el peso medio y algunos datos fenotípicos. Resulta interesante encontrar que la “información del rendimiento” es amplia y detallada para el Borrego Chiapas, la cual deja ver que los datos fueron tomados de investigación realizada por los académicos de la Universidad Autónoma de Chiapas, que ha publicado varios libros: aquellos sobre las características de la fibra (Perezgrovas, 2005) y los que tratan los temas históricos, morfológicos y zootécnicos (Perezgrovas, 2018), y varios artículos sobre la temática, que van desde la participación de pastoras indígenas tzotziles en el diseño de prácticas de manejo (Perezgrovas y Castro, 2000), hasta los estudios de genética de población (Perezgrovas y Castro, 1998) y la genética molecular. Para el resto de las razas locales mexicanas, la FAO apenas ofrece información sobre el tamaño de la camada o el peso al nacimiento.

Resalta en la base de datos de la FAO que se inscribiera tan poca información sobre la lana de los animales, considerando que, excepto el Pelibuey, las otras cuatro razas tienen esa orientación productiva, y que, al menos en el caso del Borrego Chiapas y la oveja Tarahumara, existe publicada una gran cantidad de trabajos académicos sobre el particular (Perezgrovas y Parés, 2013). El sistema de información de FAO casi no tiene datos de la “población” de las cinco razas locales de México, y apenas menciona una cifra para la oveja Pelibuey.

Otras ovejas locales de México.

Aunque no se encuentran en los catálogos internacionales, en México se han estudiado otras razas de ovejas localmente adaptadas, las cuales son menos conocidas, pero igualmente importantes. En este capítulo se presentan los datos recabados sobre estas razas ovinas, tratando de que se divulgue el esfuerzo de las instituciones que se han abocado a su investigación y fomento.

Existe un patrón común en las razas locales de ganado lanar en México, al menos en las que se localizan en zonas montañosas, y es su cría para producir vellones “de doble capa”, es decir, la materia prima que se requiere para confeccionar ropa típica, ya sea empleando el telar de pedal



común en Oaxaca y Tlaxcala, o bien el telar de cintura de origen prehispánico que todavía manejan con gran arte las tejedoras de las comunidades indígenas de las montañas de Chiapas, Veracruz, Puebla y Guerrero, o los grandes telares con bastidor que se utilizan en la Sierra Tarahumara de Chihuahua. De estas razas locales se hará aquí una breve semblanza, con el objetivo de mostrarlas, conocerlas mejor y valorarlas.

Ovino Criollo Chocholteco de la Mixteca, Oaxaca.

La población de ovinos Chocholteca es reducida, y se encuentra aislada geográficamente en la Mixteca Alta, en el estado de Oaxaca. Los estudios realizados en fechas recientes (Salinas-Ríos *et al.*, 2021) muestran que es una población genéticamente distinta a otras ovejas del país y del mundo, incluidas el Borrego Chiapas, el Criollo y el Pelibuey mexicano; las características de esta raza son: adaptación a climas fríos y pasturas pobres, ligera estacionalidad reproductiva, y pesos medios de 34 kg los machos y 26.5 kg las hembras. Los análisis de distancias genéticas muestran a la oveja Chocholteca en el mismo tronco con algunos ovinos criollos americanos y cerca de las ovejas Merino de España y de Chile; curiosamente, se encuentra distante del Borrego Chiapas.

En dicho estudio, la estructura genética sugiere que entre sus ancestros se encuentra el Merino español, lo que puede asociarse históricamente a la influencia ganadera de Hernán Cortés, marqués del Valle de Oaxaca, quien había solicitado que le enviaran de ese tipo de ovejas para multiplicarlas, según consta en las crónicas:

...en los límites de su marquesado [Cortés] llevó “gran número de carneros merinos y otros ganados, que hallaron abundantes pastos en las cercanías de Tehuantepec”. (Prescott, 2000)

La oveja Criolla Chocholteca está siendo estudiada actualmente para establecer las características de su lana, y se piensa establecer un núcleo de selección en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

Ovino Criollo “Obispo” de la montaña de Guerrero.

Esta es una raza local muy poco conocida, pero que en fechas recientes ha estado sujeta a varios protocolos de investigación con el afán de



caracterizarla, pues “se desconoce su origen genético y no se dispone de información sistemática sobre sus características morfo-estructurales, ni aspectos de su comportamiento productivo y reproductivo, por lo que este genotipo podría desaparecer” (Martínez, 2016). Una de las características más notorias de la oveja Obispo es la presencia de cuatro cuernos, que es una manifestación genética que comparte con algunas razas ovinas en Estados Unidos (Navajo-Churro) y que ocurre eventualmente en otras razas locales de ganado lanar.

López-Gordillo en una publicación relativa al desarrollo sustentable de zonas indígenas, considera a esta raza local como parte importante del modo de vida de la población; y paulatinamente van surgiendo los primeros datos de la caracterización de la raza, de la que se conocen menos de 1000 ejemplares adultos:

“El ovino “Obispo” de la montaña es un animal rústico, longevo, pequeño, magro de carnes, prolífico y de temperamento activo que se ha adaptado a las condiciones difíciles de escasez de forraje durante la sequía y de fácil manejo. El objetivo de su cría es el autoconsumo...” (Martínez, 2016)

Los estudios recientes con esta oveja Criolla son mucho más específicos, y reseñan la curva de rendimiento y composición de la leche (Nava-García *et al.*, 2019), lo cual es indicativo de que existe un interés real en impulsar la conservación y fomento de esta raza en peligro de desaparecer para mantener apenas “una presencia meramente anecdótica” (Martínez, 2016: 38). Como en el caso del Borrego Chiapas y el ovino Criollo Chocholteca, se observa en la oveja Obispo esta tendencia de que sean las instituciones académicas las encargadas de su estudio y conservación.

Ovino Criollo Chapingo, Estado de México.

Junto con el Borrego Chiapas y el Chocholteca, el ovino Criollo Chapingo está siendo promovido y evaluado por un programa universitario, en este caso por el Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). El proyecto está diseñado para “conservar, caracterizar, utilizar y desarrollar” esta oveja criolla del centro de México, para lo cual se está formando un núcleo de selección con material genético de fenotipos definidos, que se adquiere en comunidades campesinas e indígenas de varios estados del país (Redacción Ganadería.com, 2018).



De acuerdo con la información proporcionada por la UACH, “Esta nueva raza no requiere vacunación, desparasitación ni antibióticos [por lo que], es una alternativa de producción ecológica y consecuentemente de producción de alimento para los más necesitados de nuestro país” (Trujano, 2018). Los resultados de la investigación están próximos a publicarse, pero la idea es realizar mejoramiento genético a través de un mejor manejo alimenticio, reproductivo y sanitario.

Oveja Kimichin del norte de Puebla.

Este ganado lanar se caracteriza por tener “orejas de ratón”, es decir, que son de tamaño menor al normal. El estudio pionero de Hernández-Treviño *et al.* (2011) realizó una primera caracterización fenotípica, zoométrica y morfométrica de esta oveja local, encontrando que es “un animal pequeño, sin orejas, muy rústico, de perfil cefálico recto y muy bien adaptado a las condiciones edafoclimáticas de la región”. Como es reconocido por diferentes instancias, en el caso de la oveja Kimichin, “*la introducción de razas mejoradas pone en peligro de extinción a este animal*” (Hernández, 2016).

La condición de presentar orejas pequeñas se puede observar en otras razas locales, y se ha reportado en el Borrego Chiapas (Sarmiento, 1989), sobre todo en la población de ganado lanar de la región de la Sierra Madre (Rodríguez *et al.*, 2006), en donde hay una mayor consanguinidad dentro de los rebaños. Esta característica puede tener una alta heredabilidad, pues un semental con las orejas pequeñas genera muchos corderos con la misma condición.

Oveja Criolla de la Sierra de Zongolica, Veracruz.

Es un ganado lanar manejado ancestralmente por grupos indígenas hablantes del náhuatl en las montañas de Zongolica, en el estado de Veracruz, y que está siendo caracterizado desde hace varios años por un grupo de académicos del Colegio de Postgraduados. En sus publicaciones destacan que la ovinicultura en esta región es una actividad de las mujeres indígenas empleando un sistema de apersogue por el cual los animales están amarrados a estacas o arbustos dentro del área de pastoreo (*ilpitinemi*). Los rebaños son pequeños (ocho animales), pero el número de la población ha descendido, por lo que “hay que tomar

medidas de conservación de esta raza autóctona ya que ha representado una fuente importante de lana, carne, pieles y abono orgánico” (Citlahua *et al.*, 2005).

Citlahua y Vargas (2009) han generado una presentación bilingüe (náhuatl-castellano) en la que se pueden observar las características zoométricas y productivas de los animales, el sistema de manejo diseñado por las mujeres, y el uso textil de los vellones, los cuales se procesan en telar de cintura tradicional para elaborar la ropa de las personas. Los autores concluyen su trabajo —como lo hacen quienes trabajan con ovinos criollos— aseverando que se requiere rescatar a los borregos locales e iniciar un programa de selección con base en los criterios que establecen los productores.

Actualización de datos productivos.

Producción de lana

El DAD-IS de la FAO carece de información sobre las características de la fibra en las razas locales mexicanas, pero en realidad hay suficientes datos sobre el particular. El trabajo de Perezgrovas y Parés (2013) realizado con más de una treintena de razas locales de varias partes del mundo, evidencia el tipo de lana y otras características de las ovejas locales mexicanas.

En el Cuadro 2, se presenta una síntesis de los estudios sobre la fibra de lana en varias ovejas locales de México.

Cuadro 2. Características de la fibra y la mecha de lana en ovejas locales mexicanas y el Merino español.

Raza / Característica	Chiapas Café	Valles Centrales de Oaxaca	Tarahumara de Chihuahua	Criolla de Zongolica, Veracruz	Merino español
Longitud de fibras, cm	25.31	9.27	12.27	13.75	5.23
Largas gruesas	12.09	5.55	8.31	9.40	3.32
Cortas-delgadas Kemp	7.19	2.68	4.36	3.00	0.60
Proporción de fibras, %	21.15	19.13	13.67	9.97	0.47
Largas gruesas	74.93	78.02	82.02	87.56	99.47
Cortas-delgadas Kemp	3.87	2.84	4.31	2.47	0.06
Rendimiento al desengrasado alcohólico, %	87.84	75.96	73.16	82.40	53.31

Fuente: Adaptado de Perezgrovas y Parés (2013).

El cuadro anterior refleja que las razas locales con orientación hacia la producción de lana presentan un vellón de los llamados “de doble capa”, es decir, con una combinación de fibras largas-gruesas y cortas-delgadas, lo cual le confiere la “calidad artesanal” que requiere el trabajo tradicional en telares de pedal y de cintura. En contraste, la oveja Merino tiene un vellón de una sola capa (fibras cortas-delgadas) propio de las fibras de calidad industrial; y además estos vellones son de color blanco y tienen una gran merma después del lavado, lo cual sería una desventaja para el trabajo que hacen las artesanas mexicanas.

Producción de leche.

Esta es una de las características productivas que han tomado auge en los últimos años en México. Los estudios iniciales se realizaron en el Borrego Chiapas hace varios años (Villalobos y Perezgrovas, 1989), encontrando un pico de lactación a los 15 días y una persistencia de hasta 150 días. Peralta *et al.* (2018) han profundizado en el tema de la producción láctea en la oveja Chiapas, haciendo un recuento de los estudios previos y a su vez



presentando los datos más recientes, con una producción medias de 209 ml día⁻¹, la cual fue decreciendo en tres periodos consecutivos de 40 días, que fueron de 290, 193 y 144 ml día⁻¹, respectivamente. Por su parte, López *et al.* (2007) realizaron el análisis fisicoquímico de la leche de la oveja Chiapas, encontrando 5.4% de proteína, 4.3% de caseína, 4.8% de lactosa y 3.7% de grasa.

Dichos valores pueden contrastarse con los obtenidos por Nava-García *et al.* (2019) en la oveja Criolla Obispo del estado de Guerrero, con cifras de 5.7% de proteína, 4.6% de lactosa y 2.5% de grasa, y con una producción media de 343 ml día⁻¹ durante un periodo de 12 semanas.

Consideraciones finales.

La información presentada en este capítulo hace énfasis en las razas locales mexicanas inscritas en el sistema de información de la diversidad de animales domésticos de la FAO, pero al mismo tiempo se hace un recuento de las “nuevas” razas locales de ovejas que se están estudiando y caracterizando en México. Se espera que el volumen de datos técnicos y socio-económicos que están generando las instituciones académicas pueda ser tomado en cuenta por las instancias que tienen representatividad ante la FAO, para que en su oportunidad se pueda enriquecer no sólo la información de las razas ya inscritas, sino incluir a las otras cinco razas locales aquí descritas brevemente.

Las razas locales de ganado lanar en México están siendo investigadas por diferentes instancias académicas, las que requieren de los apoyos correspondientes para proseguir con su importante labor; se espera que la existencia de una asociación civil como la Red Mexicana sobre Conservación de la Biodiversidad de Animales Domésticos (Red Mexicana CONBIAND, A.C.), ayude a consolidar los esfuerzos que, de manera independiente están llevando a cabo los grupos académicos. Algunos de estos grupos ya han interactuado de manera coordinada para alcanzar sus objetivos de investigación, y otros más se están integrando con la misma finalidad, por lo que en el futuro cercano deberán verse los resultados a través de publicaciones en revistas indizadas.

Las razas locales han estado sometidas a la amenaza de la extinción debido a que sus genes se diluyen continuamente por cruzamientos no controlados. Uno de los mecanismos para proteger el germoplasma de

esta amenaza es la criopreservación de material genético, con lo que las razas podrían recuperarse en casos de necesidad. El germoplasma del Borrego Chiapas ya se encuentra resguardado en el Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, y se recomienda que los grupos académicos que trabajan con las otras razas locales mexicanas puedan hacer lo mismo.

Literatura citada.

- Citlahua E; Vargas S; Casiano M, Xicohtencatl O. Perspectivas de la ovinocultura indígena en la Sierra de Zongolica, Veracruz, México. Tonal, una ventana a las culturas macehuales de la Sierra de Zongolica, Veracruz. 2005. Disponible en línea: <http://artesanastextiles.blogspot.com/2005/09/ovinocultura-indigena-de-la-sierra-de.html>
- Citlahua E, Vargas S. La cría de borregos en la Sierra de Zongolica, Veracruz. 2009. Disponible en línea: https://issuu.com/samuelvargaslopez/docs/8_la_cr_a_de_borregos
- FAO. 2007. Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos (DAD-IS). Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/dad-is/data/es/>
- Hernández I. Preservación de recursos genéticos de ovinos nativos en la Sierra Norte del Estado de Puebla, México. *Tesis doctoral*. El Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 2016.
- Hernández-Treviño T; Segura-Fernández R; Hernández-Zepeda JS; Romero-Arenas O; Vargas-López S; Reséndiz-Martínez R, Báez-Simón A. Primera caracterización fenotípica de la oveja local Kimichin en la Sierra Norte del estado de Puebla. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 2011;1:78-81.
- López-Gordillo JA. La diversidad y prácticas de manejo de los animales domésticos en la región de la Montaña del Estado de Guerrero. *Tesis de Maestría*. Posgrado en Desarrollo Sustentable de Zonas Indígenas. Colegio de Posgraduados, Campus Puebla, Puebla, Pue., México. 2010.
- López R, Delgadillo C, Oliva C, Pedraza P, Méndez A, Sánchez H, et al. Estudio preliminar de la composición de la leche del borrego

- Chiapas. *Memorias*. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. 2007.
- Martínez, R. D. El borrego “Obispo” de la Montaña de Guerrero. *Elementos BUAP*. 2016;103(35):39.
 - Nava-García A, Martínez-Rojero RD, Mastache-Lagunas ÁA, Ulloa-Arvizu R. Curva de rendimiento y composición de leche en ovejas criollas de la Montaña de Guerrero, México. *Ecosistemas y Recursos agropecuarios*. 2019;6:391-398.
 - Peralta M, Reyes ME, Méndez A. Producción de leche en la Borrega Chiapas, p. 241-250. En Perezgrovas, R. (editor) *Los Carneros de San Juan. Antecedentes históricos y panorama actual de la ovinocultura tzotzil*. FMVZ. Instituto de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2018. 281.
 - Perezgrovas R. La lana del *Tunim Chij*, el ‘Venado de Algodón’. 1ª edición. Serie Monografías N° 8. Instituto de Estudios Indígenas, UNACH y Fundación Produce Chiapas, A. C. 2005;363.
 - Perezgrovas R. *Los Carneros de San Juan. Antecedentes históricos y panorama actual de la ovinocultura tzotzil*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2018;261.
 - Perezgrovas R, Castro H. Diferente composición fenotípica en las tres variedades del borrego Chiapas. *Archivos de Zootecnia (España)*. 1998;47:201-205.
 - Perezgrovas R, Castro H. El borrego Chiapas y el sistema tradicional de manejo de ovinos entre las pastoras tzotziles”. *Archivos de Zootecnia (España)*. 2000;49(187):391-403
 - Perezgrovas R, Parés PM. Razas autóctonas de ganado lanar en Iberoamérica. Desarrollo histórico y características de la lana. Universidad Autónoma de Chiapas. Instituto de Estudios Indígenas. Red CONBIAND. Taller de Publicaciones SPAUNACH. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. 2013;435.
 - Perezgrovas R, Severino VH. Recursos zoogenéticos nativos y localmente adaptados en México”. *Memorias del Curso Internacional en Administración de bancos de Germoplasma*. Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo, JICA, INIFAP, CNRG. México. 2021.
 - Prescott WH. *Historia de la conquista de México*. Quinta edición. Colección Sepan Cuántos... México, D. F.: Editorial Porrúa. 2000;770.

- Redacción Ganadería.com. La Universidad Autónoma Chapingo presentó su genética ovina Criollo Chapingo. Diciembre 24, 2018. Disponible en línea: <https://www.ganaderia.com/destacado/La-Universidad-Autonomo-Chapingo-presento-su-genetica-ovina-Criollo-Chapingo>
- Rodríguez G, Zaragoza L, Perezgrovas R, Sánchez G, De Jesús K. Diagnóstico del sistema de producción agropecuaria en una micro-región de la Sierra Madre de Chiapas. Pérez N, Pinson E, Caballero F, Solís M, Esquinca H. (eds) Producción 2003-2006. Sistema Institucional de Investigación de la Universidad Autónoma de Chiapas. p. 16-21
- SAGARPA. Informe nacional de ayuda a la preparación del Segundo Informe sobre la Situación de los Recursos Zoogenéticos Mundiales para la Alimentación y la Agricultura. 2012. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/i4787e/i4787s108.pdf>
- Salinas-Ríos T; Hernández-Bautista J; Mariscal-Méndez A, Aquino-Cleto M, Martínez-Martínez A, Rodríguez-Magadán H. Genetic characterization of a sheep population in Oaxaca, Mexico: The Chocholteca Creole. *Animals*. 2021;11:1172.
- Sarmiento JF. Estudio zoométrico de los diferentes fenotipos de la oveja criolla de Los Altos de Chiapas. *Tesis de Licenciatura*. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 1989.
- SIAP. 2020. Población ganadera. Gobierno de México. Disponible en línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/564337/Inventario_2019_ovino.pdf
- Trujano O. Chapingo presenta una nueva raza criolla de ovinos. Universidad Autónoma Chapingo – Oficial. 2018. Disponible en línea: <https://www.facebook.com/ChapingoOficial/posts/2010574615632646>.
- Villalobos A, Perezgrovas R. Producción de leche de la borrega criolla de Los Altos de Chiapas". Cuadernos de Investigación No.4. Universidad Autónoma de Chiapas. Centro de Estudios Indígenas. 1989:1-38.



Recursos Caprinos en México

Gisela Fuentes-Mascorro

Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca

Introducción.

La producción en México de cabras lecheras se realiza en instalaciones, que pueden ir desde confinamiento total con ordeña tanto mecánica como manual, los sistemas mixtos que proporcionan algunas horas de pastoreo, suplementación y ordeño generalmente manual, hasta los que se basan solamente en pastoreo y ordeña manual. Con esta leche se producen principalmente: cajeta, dulces, quesos, yogurt y algunos productos para mercados muy específicos. La producción de carne se da generalmente en pastoreo, que puede ir desde el sistema trashumante que aún se práctica en la mixteca Oaxaqueña, extensivo en zonas marcadas de pastoreo por las autoridades locales, y un pastoreo restrictivo en zonas con condiciones socio políticas diversas.

En un mayor porcentaje, se reconoce que la producción cárnica es sostenida por cabras “criollas”, término que es aplicado de manera equivocada a cualquier animal que no cuenta con características suficientes para identificar la raza que conoce quién la nombra. La palabra *criollo* proviene del término portugués *crioulo*, vocablo empleado para designar a los esclavos nacidos en América (Significados, 2021). Al aplicarlo en animales, el término debe ser utilizado para referirse a aquellos que descienden de los traídos por los españoles, en la época de la Colonia, y que son la mayoría de los animales domésticos que conocemos ahora. Las cabras en México se han identificado por estudios con microsatélites como razas criollas puras a la Negra de Querétaro (Silva-Jarquín *et al.*, 2019) y la Pastoreña de Oaxaca (Domínguez *et al.*, 2018).

Las cabras productoras de carne como la Pastoreña, han podido mantenerse por 500 años en la zona de la Mixteca, debido a que tienen la capacidad para poder hacer largas caminatas hidratándose con el mismo alimento que consumen; la estructura de sus labios y cabeza, les permite ingerir las hojas de la vegetación a pesar de que la mayoría disponible son xerófitas en época de estiaje; los sistemas de producción bajo los cuales se

producen son: el trashumante, el extensivo y el familiar o de bajos insumos externos (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2021).

La producción nacional en los últimos años, está sustentada por pocos estados; destaca de manera particular Coahuila, que se ha posicionado como uno de los primeros estados productores tanto de leche como de carne (Figura 1). La producción de carne está soportada por los Estados de Coahuila, Guerrero, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas (Figura 2); la producción de leche se tiene registrada en muy pocos estados y básicamente está soportada por Coahuila y Guanajuato.

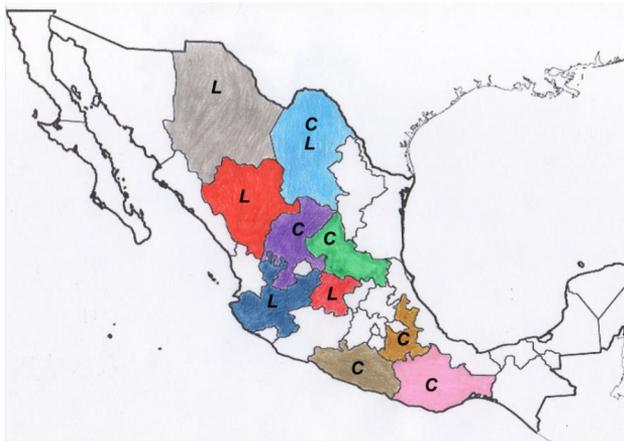


Figura 1. Principales estados productores de Leche (L) y Carne (C), de acuerdo con los datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.gob.mx/siap

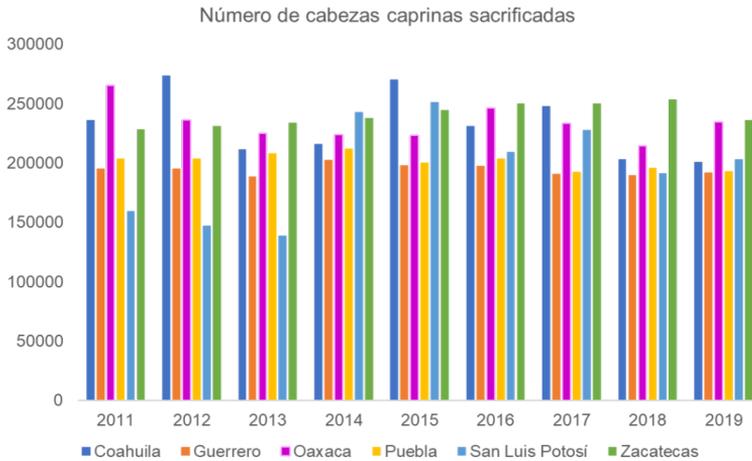


Figura 2. Principales estados productores de carne de cabra en México. Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.gob.mx/siap

Durango mantiene una producción menor pero constante, mientras Chihuahua y Jalisco, muy por debajo de los estados anteriores (Figura 3). Todos los estados productores, se encuentran ubicados en las zonas que van de hiper árido a semiárido (Figura 4), además se encuentran ubicados en rangos altos de pobreza; en 2018 se elevó, además, la vulnerabilidad por ingresos (Figura 5).

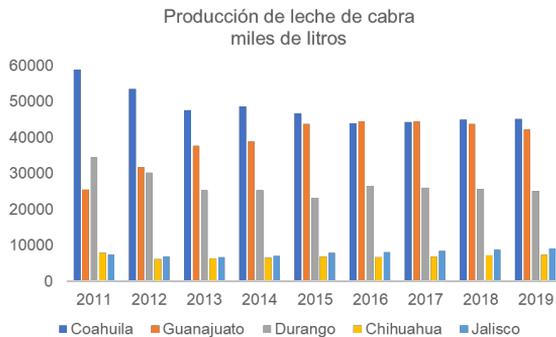


Figura 3. Estados productores de leche de cabra. Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.gob.mx/siap

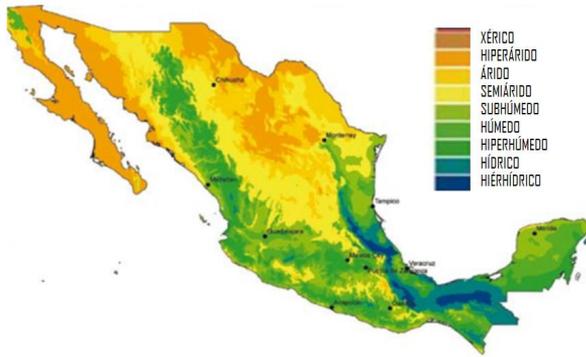


Figura 4. Zonas áridas de México. Figura adaptada de Verbist *et al.*, 2010

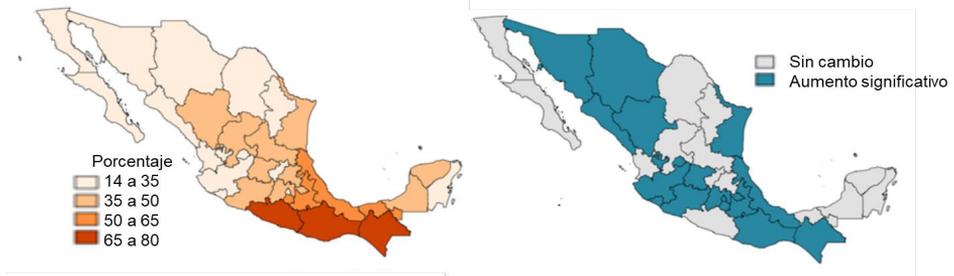


Figura 5. A la izquierda mapa de pobreza, a la derecha vulnerables por carencia económica para 2018. Fuente: CONEVAL, 2018.

Para los estados productores de leche emigraron 2,305,761 personas y para los productores de carne 4,019,679 (INEGI, 2020; Reporte, 2020). Es importante considerar que a pesar de que son estados productores de leche y carne de cabra, y son los que sostienen la producción nacional, siguen siendo pobres, vulnerables y con mayor migración.

Derivado de lo anterior, se puede plantear el cuestionamiento de ¿Por qué producir leche y carne de cabra es redituable en México?; si se analizan los precios de las Figuras 6 y 7, el litro de leche no alcanza los siete pesos,

aproximadamente treinta y dos centavos de dólar americano, y el kilo de carne por término medio a cincuenta y un pesos (aproximadamente dos dólares con treinta y un centavos de dólar americano). Comparado con las horas y recursos que se invirtieron para producirlos podemos entender por qué los caprinocultores mexicanos obtienen un mayor pago por su trabajo como migrantes. En la ciudad de Oaxaca el consumidor extranjero paga \$50.00 (cincuenta pesos) por un litro de leche de cabra, \$70.00 (setenta pesos) por un litro de yogurt de leche de cabra y \$250.00 por el kilogramo de carne de cabrito en canal; estos precios son justos para que el productor pueda tener un margen de ganancia mínimo que evite que emigre.

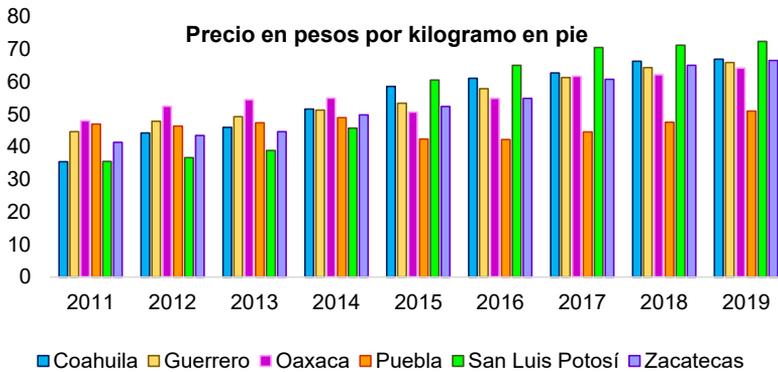


Figura 6. Precio alcanzado por kilogramo de cabra en pie en los estados productores. Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.gob.mx/siap

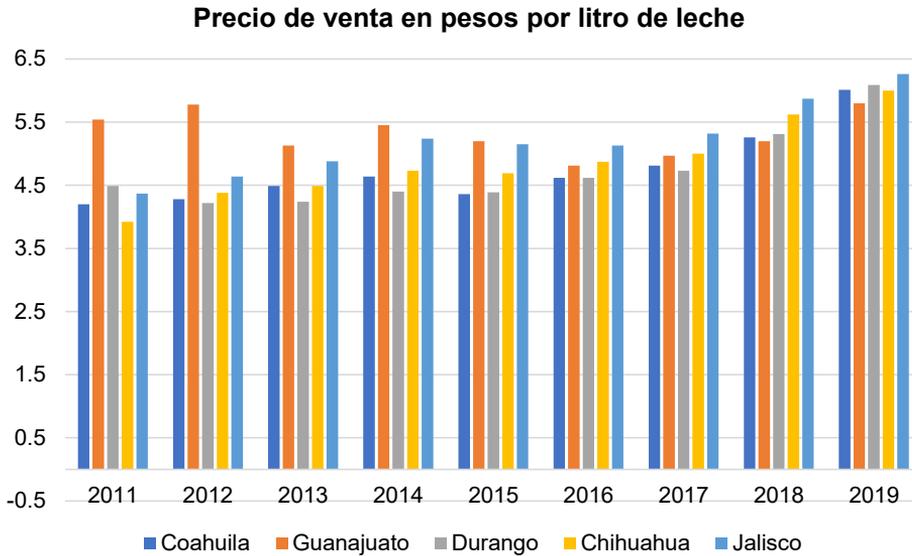


Figura 7. Precio alcanzado por litro de leche de cabra en los estados productores. Datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.gob.mx/siap

¿Por qué el precio que se paga por los productos es tan bajo?; sin duda es un problema multifactorial, y algunos de los factores que se han identificado son la falta de clasificación de canales de comercialización justos; un total desconocimiento del campo mexicano por las personas que dictan las políticas agropecuarias en México, que producen apoyos mal direccionados. Además, existe un gran desconocimiento de la importancia de la producción de cabras, desde el punto de vista económico, social y ecológico. Por otro lado, debido a sus hábitos alimentarios, las cabras contribuyen a la dispersión de semillas y el control de incendios. Es escaso el diagnóstico de las enfermedades de los caprinos que realmente están en México, faltan salas de sacrificio locales que lleven el producto hasta su empaque al vacío. Si la producción se realiza en terrenos áridos y agrestes, es ridículo hacer grandes rastros en áreas urbanas únicamente para la matanza, sin considerar el empacado al vacío para darle un valor agregado al producto.



¿Por qué es fundamental seguir produciendo leche y carne de cabra?

México importa el 41% de los alimentos para satisfacer su consumo nacional, a pesar de ser el noveno productor de alimentos del mundo y el octavo exportador de alimentos (Reporte, 2020); los números indican una incongruencia en la forma en que se desarrolla el sector agropecuario. Si estamos dentro de los diez países con mayor diversidad biológica, significa que no hemos volteado a ver el campo, con la intención de guiarlo hacia el camino correcto. La cabra presenta las siguientes ventajas:

- a) Es una tradición en las comunidades de zonas áridas, de pobreza extrema y altos índices de migración.
- b) La producción de leche se realiza principalmente en Coahuila y Guanajuato con el empleo de razas especializadas.
- c) La producción de carne depende de las cabras criollas, que están perfectamente adaptadas a los ecosistemas más agrestes.
- d) La cabra es considerada una consumidora adaptativa con selectividad alta (Morand y Sauvart, 1984), capaz de elegir entre un mayor rango de gramíneas, herbáceas, arbustos y árboles; en comparación con ovejas y vacas, es capaz de: cosechar las especies más disponibles (Pérez, 1988), de pararse sobre sus patas alcanzando mayor altura para el ramoneo e inclusive trepar los árboles para ramonear, de ingerir plantas con altos contenidos de taninos (Torres-Hernández y Maldonado-Jáquez, 2019). Kumar y Ashwani (1998) demostraron que las cabras son capaces de degradar la mimosina en un lapso de siete a ocho semanas de iniciado su consumo, adaptan su metabolismo a la calidad de los forrajes que consumen, emplean el rumen como un lugar de almacenamiento de agua sin comprometer el consumo de alimento, reducen la pérdida de agua fecal, urinaria y por evaporación, aumentan el tiempo de retención en el rumen, con un intestino de mayor tamaño, incrementan la degradación de urea (Freudengerger y Hunne, 1993; McSweeney, 1988), consumen plantas con sabores amargos, pastorean mientras van caminando, su olfato y tacto les permite tomar rápidamente la decisión de consumo y el tiempo para hacerlo (Moran-Fehr, 2005).
- e) La composición de la leche de cabra, de acuerdo con Rooden (2004) y Capra (2004), citados por Chacón (2005), proporciona 13% del requerimiento diario de calcio, y contiene selenio, ácido fólico,



vitamina A, riboflavina, con propiedades laxantes y alta capacidad amortiguadora; una unidad de grasa contiene 2.5 veces más energía que los carbohidratos comunes, con glóbulos de grasa de 2.5 μm , un contenido de ácidos grasos esenciales y de cadena corta adecuados para el corazón y factores bioactivos como la coenzima Q, de manera que cubre toda la proteína que un niño necesita desde que nace hasta los ocho años.

- f) La carne de cabra presenta mayor contenido de proteínas y menor contenido de grasa y colesterol, al compararse con la de ovino y bovino (Teixeira *et al.*, 2019), se considera a la ternura como un excelente índice de palatabilidad, por lo que se están estudiando las ventajas de las diversas razas locales de cabras, a través de la selección asistida por marcadores para conocer el transcriptoma (Shen *et al.*, 2021) que favorece las características de la carne y llevar la cruce y selección de cabras a este nivel.

Conservación y caracterización.

Un animal criollo, que ha vivido por 500 años en un ecosistema y aún se encuentra en él, está bien adaptado al lugar, de lo contrario, no existiría. Los animales domésticos criollos que viven en condiciones de pastoreo extensivo en las zonas agrestes del país, y se reproducen a pesar de la escasa intervención humana en los aspectos nutricionales y sanitarios, son altamente eficientes en ese ecosistema en el que viven; esto coincide justamente con los recursos que están en manos de los productores tradicionales. Introducir en estos sistemas “animales mejorados”, es el mayor error que podemos cometer, y esto lo demuestran todas las cruces improductivas que podemos encontrar en el campo mexicano.

Primero es necesario tener claridad en cuáles grupos de estos animales son razas puras, como ocurre con las cabras Negras de Querétaro y las Pastoreñas de la Mixteca; esto se logra con un estudio de microsatélites.

Se vuelve imperativo que el Centro Nacional de Recursos Genéticos, desarrolle la tecnología necesaria para llevar a cabo ensayos de proteómica, transcriptómica, metabolómica, cuyas herramientas permiten una mejor caracterización. Por otro lado, es necesario un programa nacional relacionado a la conservación de los recursos



genéticos animales con las universidades mexicanas que cuentan con la licenciatura de medicina veterinaria.

Actividades del CNRG.

El programa de conservación debería ser coordinado por el CNRG que además tenga las siguientes cualidades:

1. El CNRG realizaría el genotipado de los rebaños candidatos a estar constituidos por razas puras. De grupos raciales específicos.
2. La Red Mexicana CONBIAND cuenta con un gran número de investigadores a nivel nacional con un buen conocimiento de los grupos raciales, pues los han caracterizado de manera integral y ellos deberían ser parte fundamental en la elección de las poblaciones a muestrear.
3. Se cuenta con universidades y centros del INIFAP, con instalaciones para poder tener rebaños de los grupos de animales identificados como puros y realizar su evaluación, lo que producirá los datos cuantitativos para realizar los comparativos de producción.
4. Evaluación de los productos de estos grupos, realizando los comparativos en condiciones de campo y en las condiciones ideales en las que están en las instalaciones de las universidades y del INIFAP.
5. Una vez establecidos los grupos raciales y sus ventajas, iniciar con el diseño de cruzas que realmente producirán vigor híbrido.
6. De manera paralela se requerirá la caracterización de las especies vegetales que los animales consumen, incluyendo el valor nutricional de los mismos.
7. Diseño de las estrategias de producción sustentable de forraje nativo y rutas de pastoreo adecuadas, que permitan un manejo inteligente de los agostaderos.
8. Una vez evaluada la calidad de los productos a través de las ciencias *ómicas*, se deberán diseñar los procesos locales que permitan dar valor agregado a la producción.
9. Diseño y fomento de rutas cortas de consumo.
10. Acopio de productos a precio justo para la exportación de productos de alto valor a mercados que valoren y paguen el producto.
11. Será imperativo contar con laboratorios de diagnóstico, que realicen una amplia gama de pruebas.



12. Privilegiar el diseño de plato saludable que este constituido por los productos de consumo local.

Fortalezas y capacidades.

La caprinocultura es una actividad ancestral en las regiones productoras en México; es necesario prescindir chiveros para tener caprinocultores y esto se logrará, iniciando con el reconocimiento de los saberes ancestrales para plasmarlos y comprobarlos, evaluando a los animales que han estado en el campo mexicano, antes de importar las razas de otros países que sí valoran a sus animales nativos. Hay que comprender que la producción de leche de cabra es mejor con razas específicas, y se debe basar en ellas en las condiciones de bienestar adecuadas para los animales y que si la producción de carne se ha mantenido con las razas locales, se debe seguir haciendo con estas, además de seleccionar en las razas locales animales con línea lechera y fomentar el ordeño y consumo de la leche.

La producción pecuaria en México no puede ser medida con la misma regla, la riqueza biológica, cultural y social de este país, requiere también una diversidad de soluciones. La burocratización de los trámites provoca que se emplee más tiempo en cubrir todos los requisitos de papel que en el trabajo con el productor. Es necesario hacer una difusión atomizada de este programa que se propone, para que de manera voluntaria se generen centros de desarrollo, pero esto deber ir acompañado de un comercio justo, que permita que el productor sea quién reciba el pago justo por su trabajo.

Si no cambiamos lo que hemos hecho hasta ahora, llegará un día en que todos los alimentos de las ciudades sean importados y sólo los que estamos ligados a las actividades agropecuarias podamos consumir productos del campo mexicano.

Literatura consultada.

- Chacón VA. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*. 2005;16:239-252
- CONEVAL. Mapas de Pobreza 2008 – 2018. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo social. 2018.



file:///C:/Users/EQUIPO/AppData/Local/Temp/Rar\$Dla11844.33539/Mapas_pobreza_2008_2018.pdf

- "Criollo". En: Significados.com. Disponible en: <https://www.significados.com/respeto/> Consultado: Consultado: 22 de mayo de 2021, 06:11 pm
- Domínguez MMA, Pérez de la RJD, Landi V, Pérez de la RJ, Vázquez MEN, Martínez-Martínez A, Fuentes-Mascorro G. Genetic diversity and population structure analysis of the Mexican Pastoreña Goat. *Small Ruminant Research*. 2018;768:76-81
- Fuentes-Mascorro G, Ramírez JMP, Ortiz BR, Sánchez OM, Cruz-Matías J. La cabra pastoreña de la Mixteca. En *Cabras: pastoreña de la mixteca y criolla de Chihuahua*. UABJO. 2021:11.
- Freudenberger DO, Hunne ID. Effects of water restriction on digestive function in two macropodid marsupials from divergent habitats and the feral goat. *Journal of Comparative Physiology. B*. 1993;63:247-257.
- INEGI 2020. Población total inmigrante, emigrante y saldo neto migratorio por entidad federativa. https://www.inegi.org.mx/app/tabulados/interactivos/?px=Migracion_01&bd=Migracion
- Kumar GVP, Ashwani S. Phenotypic alterations in goats fed subabul (*Leucaena leucocephala*). *Indian Journal of Animal Science*. 1998;68:402-404.
- McSweeney CS. A comparative study of the anatomy of the omasum in domesticated ruminants. *Australian Veterinary Journal*. 1988;65:205-207
- Moran-Feh P. Recent developments in goat nutrition and application: A review. *Small Ruminant Research*. 2005;60:25-43
- Morand-Fehr O, Sauvant D. Alimentación de cabras. En *Alimentos y alimentación del ganado*. D.C. Church. Montevideo, hemisferio Sur. 1984:553-577.
- Pérez L. Comportamiento alimentario y actividades de cabras en pastoreo sobre campo natural. En *Producción Caprina*. 1988.
- Reporte 2020. Situación del sector agropecuario en México. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Cámara de Diputados 1-35.
- Shen J, Hao Z, Wang J, Hu J, Liu X, Li S, Ke N, *et al*. Comparative transcriptome profile analysis of *longissimus dorsi* muscle tissues

- from two goat breeds with different meat production performance using RNA-Seq. *Frontiers in Genomics*. 2021;11:619399
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2021. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
 - Silva-Jarquín JC, Andrade-Montemayor HM, Vera-Ávila HR, Durán-Aguilar M, Landi V, Martínez-Martínez A, Delgado BJV. Diversidad y estructura genética de una población de cabras criollas negras de tres municipios del estado de Querétaro, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2019;10:801-818
 - Teixeira A, Silva S, Rodrigues S. Advances in sheep and goat meat products research. *Advances of Food and Nutrition Research*. 2019;87:305–370.
 - Torres-Hernández G, Maldonado-Jáquez JA. Los caprinos criollos de América latina y el caribe: recurso genético local de gran importancia. XII Congreso de la Federación Iberoamericana de Razas Criollas y Autóctonas. V Ciclo Internacional de Conferencias Dr. Jorge de Alba. Veracruz. 2019:53-92
 - Verbist K, Santibáñez F, Gabriels D, Soto G. Atlas de zonas áridas de América Latina y el Caribe. Oficina Regional de Ciencia para América Latina. UNESCO. 2010;39



Capítulo 4

Recursos Genéticos Acuáticos

Carmen G. Paniagua Chávez, Miguel A. del Río Portilla, Fabiola Lafarga De la Cruz, Constanza del Mar Ochoa Saloma, Francisco J. García-De León, Wilfrido Contreras Sánchez, Ulises Hernández Vidal, Lenin Arias Rodríguez, Irene de los A. Barriga-Sosa

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
cpaniagu@cicese.mx

Introducción

El SINARGEN fue establecido como un mecanismo abierto e incluyente para resguardar, proteger, mejorar y aprovechar sustentablemente toda la riqueza genética de los sectores acuático, agrícola, forestal y pecuario de México y forma parte del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG). Este sistema opera a través de los subsistemas y redes (especie, temática o región) en las que participan instituciones nacionales. Debido a la importancia que tienen los Recursos Genéticos Acuáticos junto con los demás recursos genéticos en la soberanía alimentaria del país, la SAGARPA (ahora SADER), a través del Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) creó, en 2012, el Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA) que funciona como una red interinstitucional e interdisciplinaria para la conservación y aprovechamiento sostenible de los Recursos Genéticos Acuáticos (RGA) de especies con importancia acuícola, nativas o no de México. La Red de Recursos Genéticos Acuáticos (RRGA) tiene como metas orientar acciones hacia el cumplimiento de los objetivos del Programa de Uso Sustentable de Recursos Naturales para la Producción Primaria y apoyar a los objetivos establecidos en el Plan Nacional de Acción para la conservación de los RGA. Esta red está constituida por investigadores de diferentes instituciones académicas tales como el Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. (CICESE), la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco



(UJAT), la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), la Universidad Autónoma Metropolitana-iztapalapa (UAM-I), el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) y el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN).

Para llevar a cabo las acciones del SUBNARGENA se desarrolló el Plan Nacional de Acción para la Conservación y uso Sustentable de los Recursos Genéticos Acuáticos de México. Los objetivos de este plan son:

1. Asegurar la conservación de la diversidad de recursos genéticos acuáticos para las generaciones presentes y futuras.
2. Promover el intercambio y acceso de los recursos genéticos acuáticos en el sector acuícola y pesquero dentro de un marco legal.
3. Fortalecer los programas de conservación y mejorar la capacidad institucional.
4. Promover el desarrollo y uso sostenible de los recursos genéticos acuáticos para la seguridad alimentaria y el bienestar de los mexicanos.
5. Ayudar a las instituciones responsables del manejo de los recursos genéticos acuáticos, en el establecimiento, implementación y revisión regular de las prioridades nacionales en la conservación, desarrollo y uso sostenible de estos recursos.
6. Difundir el conocimiento, innovación y prácticas relevantes para la conservación y uso sostenible de los recursos genéticos acuáticos.
7. Desarrollar programas regionales, nacionales e internacionales en aspectos de educación, investigación y entrenamiento dirigidos a la conservación, desarrollo, inventario, monitoreo, caracterización genética y uso sostenible de los recursos genéticos acuáticos.
8. Promover la colaboración nacional e internacional para mejorar la conservación, intercambio y acceso de los recursos genéticos acuáticos
9. Sugerir puntos estratégicos para el desarrollo de políticas públicas que contribuyan a la mejor implementación y operación de los programas para la conservación, desarrollo y uso sostenible de los recursos genéticos acuáticos.
10. Sugerir estrategias para la obtención de financiamiento para el desarrollo, implementación y operación de los programas de

conservación, desarrollo y uso sostenible de los recursos genéticos acuáticos.

Algunas de las prioridades establecidas en este Plan Nacional de Acción son: (1) elaborar y establecer programas de conservación *in situ* y *ex situ*, *in vitro* o *in vivo*, (2) caracterizar genéticamente a los RGA, (3) determinar el riesgo sanitario, (4) desarrollar programas de reproducción para mejoramiento genético, (5) establecer y reforzar la competitividad institucional involucrada en la conservación de los RGA, (6) establecer y reforzar programas de intercambio de información, investigación y educación nacional e internacional, (7) desarrollar y reforzar la capacidad de los recursos humanos, (8) reforzar la cooperación internacional, (9) establecer y reforzar las redes nacionales e internacionales, entre otras. Todas estas acciones están encaminadas para lograr un uso racional de los RGA y beneficiar a la sociedad.

Uno de los principales logros obtenidos con los esfuerzos del SUBNARGENA es la creación y equipamiento de tres bancos de germoplasma periféricos que cuentan con la infraestructura necesaria para realizar acciones de conservación de los RGA *ex situ*: el banco del noroeste ubicado en CICESE-Campus Ensenada, Baja California, el banco del sureste ubicado en Villahermosa, Tabasco y coordinado por UJAT y el banco ubicado en el centro del país en la Unidad de Transferencia Tecnológica de CICESE en Tepic, Nayarit (CICESE-UT3) (Figura. 1). El objetivo de estos bancos es recabar la mayor cantidad de muestras de germoplasma para alcanzar las metas establecidas en el Plan Nacional de Acción del SUBNARGENA.



Figura. 1. Bancos periféricos del SUBNARGENA en la República Mexicana.

Además de lo anterior, se ha consolidado la RRGa mediante la participación de sus integrantes (investigadores e instituciones) en la proposición y ejecución de proyectos de investigación, en donde han participado no sólo investigadores sino también estudiantes de licenciatura y posgrado, y que han resultado en un gran número de publicaciones técnicas y científicas en revistas y congresos nacionales e internacionales sobre diferentes aspectos de los RGA.

Justificación.

Los recursos genéticos, definidos como todo material de origen animal, vegetal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia que tengan un valor real o potencial (CBD, 1992), requieren ser conocidos para su conservación y uso sustentable. Particularmente, aquellos recursos que se encuentren en riesgo o que tengan un valor comercial local, nacional o internacional, así como las comunidades que dependen de las mismas. La distribución efectiva de beneficios implica que las comunidades locales que dependen de estos recursos naturales para obtener alimentos, medicinas, combustible y materiales de construcción puedan continuar haciéndolo en el presente y en futuras generaciones.

La conservación de los recursos genéticos vegetales y animales ha sido un tópico muy importante, sobretodo en la última década. Guías y protocolos internacionales se han desarrollado en torno a estos recursos desde hace

más de 20 años. En este contexto, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha generado varios documentos relevantes, entre los que destaca el relacionado con el estatus mundial de los recursos genéticos vegetales y animales (FAO 2010, 2019a). Sin embargo, a pesar de que los RGA son el sector alimentario con mayor crecimiento en los últimos años, poca atención se ha dirigido a su conocimiento, conservación y uso sustentable. En 2013, la Comisión de los Recursos Genéticos para la Alimentación y Agricultura de la FAO indicaron que, a pesar de la contribución crucial de los RGA a la seguridad alimentaria del mundo, la información sobre estos recursos es escasa, incompleta e inadecuada (FAO, 2013). Fue así que en 2015 se formó la comisión para elaborar el primer informe mundial del estatus de los RGA. Este primer reporte publicado en 2019 (FAO, 2019b), incluye elementos de conservación, uso sustentable y equitativo de los recursos, entre otros tópicos, y servirá de información base para inventariar de los recursos acuáticos del país y del mundo (FAO 2019b).

Problemática.

México posee un grupo de investigadores e instituciones de muy alto nivel capaces de desarrollar estrategias para cumplir con la enorme tarea de generar conocimiento científico, inventariar y organizar los RGA que permitan su uso equitativo y sustentable. Sin embargo, una de las principales problemáticas que ha enfrentado este grupo es el discontinuo financiamiento para lograr sus objetivos. Lo anterior se debe a la carencia de la entrada en vigor de planes transexenales que trasciendan a las políticas económicas y administrativas gubernamentales, lo que significa que en ciertos sexenios las políticas de conocer los RGA es una prioridad, mientras que en otros no. Otra problemática tiene que ver con el mundo de las economías del conocimiento. Dado que los RGA representan un capital natural, estos poseen un uso potencial en la medida que sean descubiertos y caracterizados, si se desconocen, simplemente pasan desapercibidos. La necesidad de conocer nuevas alternativas de desarrollo para la explotación y uso de los RGA atrae a investigadores extranjeros que cuentan con mucho más financiamiento e infraestructura, generando competencia desleal o se establece una dependencia tecnológica sin precedentes.

Usuarios y beneficiarios potenciales.

Uno de los principales usuarios de los RGA es sin duda el sector acuícola y pesquero, principalmente proveedores de la industria alimentaria de pescados y mariscos a nivel nacional (Figura 2). Además de los diversos grupos étnicos que se encuentran en el territorio nacional, los cuales utilizan estos recursos como fuente principal de proteína. Sin embargo, dado que existe un gran número de especies silvestres, tanto marinas como de aguas continentales, que se encuentran impactadas negativamente, como es el caso de los corales, camarones silvestres, peces de manglares entre otros, la producción pesquera y acuícola se ha visto afectada reduciendo así los beneficios para estos sectores. Consecuentemente, es inminente la planeación de programas de conservación de los recursos genéticos para que estos beneficios no se pierdan y que las futuras generaciones de México tengan la oportunidad de seguirlas usando.



Figura 2. La pesca y la acuicultura, dos de los sectores más beneficiados con la conservación de los recursos genéticos acuáticos.

Otro sector que usa y se beneficia de los RGA es la industria farmacéutica y biotecnológica. Por ejemplo, en México existen peces del género *Xiphophorus* con un alto interés para el estudio de cáncer de piel, estos peces de agua dulce han sido ampliamente investigados por grupos extranjeros y poco de sus resultados han sido aplicados a la medicina nacional (<https://www.xiphophorus.txstate.edu/>). Otro ejemplo es la lapa gigante, *Megathura crenulate*, un gasterópodo marino poco estudiado,

pero con un gran impacto en la industria farmacéutica, ya que a partir de la hemolinfa se extrae y comercializa la proteína denominada *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH), ampliamente utilizada en el tratamiento del cáncer, Alzheimer e inmunosupresión (Figura 3). Las empresas dedicadas a la extracción de esta proteína a partir de organismos vivos son empresas que cotizan en la bolsa con un alto valor (Biosyn, Stellar Biotechnologies, Sigma-Aldrich, Thermo-Fisher Scientific, G-Bioscience). Este uso en biotecnología médica es para México ampliamente desconocido y claramente se requiere de mayor atención por grupos de investigadores trabajando de forma multidisciplinaria.



Figura 3. Ejemplo de especies acuáticas importantes en medicina para investigación y combatir diversos tipos de cáncer. Panel izquierdo, peces de agua dulce (*Xiphoporus hellerii* y *X. maculatus*). Panel derecho, gasterópodo marino, lapa gigante (*Megathura crenulata*).

En general, los logros que se han obtenido hasta el momento por la RRGAs del SUBNARGENA que son de gran beneficio para los usuarios son:

- 1) Establecimiento y fortalecimiento de tres bancos periféricos de germoplasma en el país (Figura 1).
- 2) Conservación *ex situ* de germoplasma de diferentes especies acuáticas tales como trucha de San Pedro Mártir, bacalao negro, ostión del Pacífico, abulón rojo, lenguado de California, pez blanco, camarón blanco, totoaba y diferentes especies de microalgas entre otras especies.
- 3) Caracterización genética de diferentes especies de abulón rojo y de truchas nativas mexicanas, pez blanco, totoaba, bacalao negro, jureles, entre otros.
- 4) Investigación e innovación, ejemplos de esto es la producción de protocolos de criopreservación de productos sexuales especie-específicos, lo cual ha dado lugar a la innovación con resultados positivos como lo es el desarrollo de patentes. Particularmente el desarrollo de un protocolo específico para la vitrificación de la masa espermática de camarón blanco,



y un sistema para la maduración de ostión y obtención de semilla en todo el año. También, se han diseñado herramientas no invasivas útiles que ayudan a la identificación del sexo y desarrollo de la gónada como lo es el ultrasonido. Se está desarrollando marcadores genéticos para trazabilidad y mejoramiento asistido con marcadores en jureles. Asimismo, se han realizado investigaciones usando la tecnología moderna de secuenciación masiva de última generación para analizar transcriptomas en abulón rojo, truchas nativas, etc. y se ha caracterizado y publicado el mitogenoma de diferentes especies, que está alimentando la base de datos de RGA para el subsistema. Además, se determinó el tamaño genómico de alrededor de 20 especies de importancia biológica y comercial.

5) Desarrollo de recursos humanos en diferentes niveles académicos. Hasta el momento se ha capacitado personal en diferentes instituciones nacionales e internacionales relacionadas a la conservación *ex situ* de germoplasma y la generación de marcadores genéticos especie-específicos para diferentes aplicaciones en acuicultura (trazabilidad, selección asistida por marcadores genéticos, estimación de endogamia, etc.) y pesquerías (identificación de stock poblacionales, estructura genética poblacional y grado de conectividad genética de poblaciones). Se han ofrecido cursos especializados relacionados a estudios de genómica y transcriptómica en organismos acuáticos. Además, se han ofrecido cursos relacionados al cultivo de diferentes especies tales como el cultivo de trucha de San Pedro Mártir, abulón, erizo y jureles. Cabe destacar que la red ha impulsado las colaboraciones con otros países como Colombia, Chile, Honduras, Panamá, Venezuela, Rusia, Estados Unidos, Francia, Australia, entre otros, algunos de los cuales han solicitado cursos y estancias académicas relacionadas a la conservación de Recursos Genéticos Acuáticos. También se han formado estudiantes de todos los niveles académicos (licenciatura, maestría y doctorado) en el área de conservación y usos sustentables de RGA.

6) Se ha implementado diferentes programas de divulgación de la ciencia, uno de ellos es el vaivén de la ciencia que es un programa de divulgación desarrollado con fondos de CONACyT y promovido por CICESE para difundir la ciencia al público en general a nivel regional y nacional. Con este programa se ha participado en diferentes foros de divulgación municipal, estatal y nacional. A parte de este programa, cada investigador que participa en la RRG ha hecho esfuerzos para difundir las investigaciones de estos temas en sus respectivas entidades. Se ha



participado en programas de radio y televisión local y en otros estados como Campeche y Chihuahua. Se participó en el libro de la CONABIO que trata sobre el capital natural del Estado de Baja California Sur, el cual contiene una sección de diversidad genética en donde se desarrollan temas de los RGA del estado.

7) Colaboración nacional e internacional. Además de contar con una red nacional de expertos se tienen colaboraciones internacionales con expertos de otros países como: Estados Unidos, Rusia, Francia, Alemania, Colombia, Honduras, Panamá, Venezuela, Perú, Chile, por mencionar algunos. La colaboración con estos países ha sido activa. Por ejemplo, se ha colaborado con el USDA-Animal Germplasm Program—Aquatic Chapter; las Universidades Nacionales de Panamá y Honduras. Las colaboraciones se han establecido en los diferentes temas en donde los investigadores de la RRGa son expertos, como es la criopreservación de productos sexuales, la implementación de métodos moleculares para sus aplicaciones en Acuicultura y Pesquerías, y de la taxonomía de diferentes organismos, entre otros.

Métodos de conservación.

La conservación *ex situ in vivo* es una técnica para conservar la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales como pueden ser los zoológicos, acuarios, organismos en cautiverio o jardines botánicos (CBD 1992). Esta técnica requiere del mantenimiento de los organismos en hábitats artificiales y tienen como consecuencia costos económicos asociados al mismo como es necesidad de infraestructura, equipamiento y capacitación de personal. Por otra parte, existen costos biológicos tales como la necesidad de los organismos de adaptarse a los hábitats artificiales, un posible deterioro de la diversidad genética, depresión endogámica y acumulación de alelos deletéreos, una alternativa de esta práctica de conservación son las áreas naturales protegidas. Por otra parte, la conservación *ex situ-in vitro* es una técnica para conservar la biodiversidad biológica en bancos de germoplasma o de genes. A diferencia de la conservación *ex situ-in vivo*, los bancos de germoplasma se convierten en repositorios donde se pueden resguardar gametos, células germinales o embriones que pueden ser utilizadas en los programas de mejoramiento genéticos de especies de importancia económica, así como en el restablecimiento de poblaciones de especies amenazadas o en peligro de extinción. En la conservación *ex situ-in vitro*

es necesario desarrollar protocolos específicos para cada especie y tipo de tejido a conservar. Asimismo, la estandarización de las metodologías es otro punto que necesita ser atendido en lo relacionado a la conservación de los recursos genéticos acuáticos ya que la mayoría de los métodos aún no se encuentran estandarizados.

La conservación *ex situ in vitro* es llevada a cabo por un proceso de congelación de las células a ultra bajas temperaturas (-196 °C) llamado criopreservación o crioconservación. Este procedimiento es similar al que se usa en la ganadería. Sin embargo, debido a que la tasa de domesticación ha sido más rápida en especies acuáticas que terrestre, se requiere desarrollar procedimientos especies-específicos y tejido específicos para su conservación (Figura 4). En el SUBNARGENA se han diseñado protocolos específicos para el germoplasma de diferentes especies (Cuadro 1 y 2). El diseño de los protocolos de criopreservación contempla no sólo encontrar las soluciones crioprotectoras óptimas, sino también los dispositivos en donde colocar la muestra y el equipo en donde se realizará el congelamiento.



Figura 4. Diferencia en la toma de muestra para el esperma de un crustáceo, camarón blanco, (panel izquierdo) y el esperma de un pez, bacalao negro, (panel derecho). Las características físicas del esperma de camarón blanco son su alta viscosidad, adherencia y poco volumen (~20 µL), mientras que en bacalao negro es muy fluido y puede contener mayor volumen, varios mililitros.

Cuadro 1. Lista de especies de organismos acuáticos resguardados en el banco periférico del noroeste del Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA). Utilizando métodos de congelación simplificados o utilizando una cámara de congelación programable.

Nombre científico	Nombre común	Célula criopreservada
<i>Anaplopora fimbria</i>	Bacalao negro	Esperma
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostión del pacífico	Esperma, huevos, larvas
<i>Chirostoma humboldianum</i>	Pez blanco	Esperma
<i>Haliotis rufescens</i>	Abulón rojo	Esperma
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Camarón blanco	Masa espermática
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mejillón del mediterráneo	Esperma
<i>Oncorhynchus mykiss nelsoni</i>	Trucha de San Pedro Mártir	Esperma
<i>Paralichthys californicus</i>	Lenguado de California	Esperma
<i>Seriola lalandi</i>	Jurel aleta amarilla	Células germinales
<i>Totoaba mcdonaldii</i>	Totoaba	Esperma, células germinales

Cuadro 2. Lista de cepas de microalgas del cepario de CICESE las cuales fueron congeladas utilizando un método simplificado y estandarizado para todas las cepas.

Especie criopreservada	Clave de la cepa
<i>Amphora</i> sp.	AMX4
<i>Chaetoceros muelleri</i>	CHM3
<i>Chlorella</i> sp.	CLX4
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	DUT3
<i>Isochrysis</i> sp.	ISX4
<i>Nitzschia laevis</i>	NIL3
<i>Nannochloropsis oculata</i>	NNO2
<i>Navicula</i> sp.	NVX2
<i>Pavlova lutheri</i>	PAL3
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	PHT1
<i>Scenedesmus</i> sp.	SCX4
<i>Synechococcus elongatus</i>	SYE1
<i>Tetraselmis suecica</i>	TES2
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	THP2

El utilizar equipo donde se obtengan tasas de congelamiento controladas es esencial para algunas especies; sin embargo, se han buscado otros métodos simplificados para poder realizar la congelación en campo. En este caso, se ha realizado la congelación o vitrificación de células en cajas de hule espuma, la cual ha sido exitosa para algunas especies o tipos celulares (Figura 5).



Figura 5. Criopreservación de microalgas utilizando un método simplificado. Panel izquierdo, muestras de diferentes especies de microalgas. Panel derecho, congelación en una caja de hule espuma (31 cm X 23.5 cm X 22.5 cm de grosor) la cual contenía 5 cm de nitrógeno líquido. Las microalgas se mezclaron con 10% de DMSO y se colocaron en pajillas francesas de 0.5 mL para ser luego colocadas en una rejilla la cual fue situada a 9 cm por encima del nitrógeno líquido para ser congeladas con el vapor de nitrógeno líquido por 10 min.

Caracterización genética de los RGA.

México es considerado el cuarto país megadiverso (Sierra Jiménez *et al.* 2014) y, por consiguiente, tiene una gran riqueza genética asociada a las especies que allí habitan. Desafortunadamente, el conocimiento del acervo genético de las especies acuáticas, tanto silvestres como cultivadas, ha sido limitado por carecer de las herramientas moleculares para su análisis. En poco más de dos décadas con el advenimiento de métodos cada vez más sofisticados, la caracterización genética se ha vuelto una rutina de trabajo (McAndrew y Napier 2011; Casey *et al.* 2016; MacKenzie y Jentoft 2016), siendo la limitante el financiamiento para lograr objetivos deseables en este tema.

La caracterización genética requiere de herramientas moleculares para (1) conocer la diversidad genética (ej. dentro y entre las poblaciones) (2) desarrollar programas de mejoramiento (mediante la selección de reproductores asistida por marcadores moleculares, evaluación de tasas de endogamia, trazabilidad genética de productos de la pesca y acuicultura, (3) resolver incertidumbres taxonómicas. Conocer la diversidad genética de un organismo auxilia en la toma de decisiones para conservar y usar sustentablemente un recurso genético, como ejemplo: el desarrollo de marcadores específicos ha permitido hacer más eficientes los programas de manejo acuícola de especies de importancia económica como: salmones, truchas, tilapias, carpas y camarón, entre otros (Duchesne y Bernatchez 2007; Palaioikosta *et al.*, 2013; Roberge *et al.*, 2008; Robledo *et al.*, 2018). A pesar de que el sector alimentario más creciente en

el mundo viene de especies acuáticas (FAO, 2020) y que los recursos genéticos acuáticos enfrentan cambios ecológicos y climáticos, en un futuro próximo, la posibilidad de encarar el impacto de estos cambios sobre el potencial de utilización de la biodiversidad acuática depende del conocimiento de los potenciales evolutivos de cada especie en particular y ello requiere de un conocimiento profundo de la diversidad genética de las especies, y dentro de las especies, dentro y entre poblaciones. Este conocimiento contribuirá a la toma de decisiones para la evaluación y conservación de los RGA.

Por lo anterior, desde hace varios años, la RRGa se encuentra realizando un gran esfuerzo en la caracterización genética de varias especies utilizando el arsenal de marcadores genéticos disponibles en la ciencia actual, tal como la secuenciación masiva de última generación con la que se obtienen marcadores del tipo microsatélites y polimorfismo de nucleótido simple (SNPs), además de ensamblar genomas mitocondriales y de cloroplastos completos, estos últimos en microalgas. Hasta el momento se han obtenido 35 mitogenomas (Cuadros 3 y 4), un gran número de marcadores microsatélites y SNPs para diversas especies (Cuadros 5 y 6) y tres genomas del cloroplasto de las especies *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Chaetoceros sp.*

Cuadro 3. Mitogenomas obtenidos para especies acuáticas de importancia biológica y comercial generados por la RRGa.

Nombre científico	Nombre común
<i>Anoplopoma fimbria</i>	Bacalao negro
<i>Atractosteus tropicus</i>	Pejelagarto
<i>Chirostoma humboldtianum</i>	Pez blanco
<i>Cyprinodon macularius</i>	Perrito del desierto
<i>Herichthys minckleyi</i>	Mojarra de Cuatro Ciénegas
<i>Petenia splendida</i>	Tenguayaca-mojarra
<i>Pterois volitans</i>	Pez león
<i>Stegastes flavilatus</i>	Damisela
<i>Xenotoca variata</i>	Pintada
<i>Carcharodon carcharias</i>	Tiburón blando
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Tiburón sedoso
<i>Carcharhinus leucas</i>	Tiburón toro
<i>Narcine entemedor</i>	Raya eléctrica gigante

Zapteryx exasperata Raya guitarra

Octopus fitchi Pulpo pigmeo del Pacífico

Octopus mimus Pulpo de Gould

Panopea generosa Almeja generosa

Panopea globosa Almeja generosa

Porites panamensis Coral de dedos

Cuadro 4. Mitogenomas en preparación de especies acuáticas de importancia biológica y comercial generados por la RRGa.

Nombre científico	Nombre común
Peces teleósteos	
<i>Fundulus lima</i>	Cachorrillo del desierto
<i>Oncorhynchus chrysogaster</i>	Trucha dorada
<i>Oncorhynchus mykiss nelsoni</i>	Trucha de San Pedro Mártir
<i>Paralichthys californicus</i>	Lenguado de California
<i>Seriola dorsalis</i>	Jurel aleta amarilla de California o de Castilla
Moluscos	
<i>Haliotis corrugata</i>	Abulón amarillo
<i>Haliotis cracherodii</i>	Abulón negro
<i>Haliotis fulgens</i>	Abulón azul
<i>Haliotis rufescens</i>	Abulón rojo
<i>Lobatus gigas</i>	Caracol gigante
<i>Octopus bimaculoides</i>	Pulpo
<i>Octopus defilippi</i>	Pulpo de brazos largos
<i>Saxidomus nuttalli</i>	Almeja mantequilla
<i>Tivela stultorum</i>	Almeja pismo
Microalgas	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	Diatomea planctónica
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Diatomea planctónica
<i>Chaetoceros sp.</i>	Diatomea planctónica

Cuadro 5. Microsatélites obtenidos para especies acuáticas de importancia biológica y comercial generados por la RRGAs.

Nombre científico	Nombre común
<i>Peces teleóstitos</i>	
<i>Anoplopoma fimbria</i>	Bacalao negro
<i>Astyanax mexicanus</i>	Sardina ciega y mexicana
<i>Carcharhinus falciformis</i>	Tiburón seda
<i>Chirostoma humboldtianum</i>	Pescado blanco
<i>Merluccius productus</i>	Merluza del Pacífico
<i>Micropterus salmoides</i>	Lobina negra
<i>Oncorhynchus chrysogaster</i>	Trucha dorada
<i>Oncorhynchus mykiss nelsoni</i>	Trucha de San Pedro Mártir
<i>Seriola rivoliana</i>	Jurel pez fuerte
<i>Totoaba macdonaldi</i>	Totoaba
<i>Moluscos</i>	
<i>Octopus mimus</i>	Pulpo de Gould
<i>Stomolophus spp.</i>	Medusa bola de cañón

Cuadro 6. Polimorfismo de simple nucleótido (SNP) en preparación de especies acuáticas de importancia biológica y comercial generadas por la RRGAs.

Nombre científico	Nombre común
<i>Peces teleóstitos</i>	
<i>Astyanax mexicanus</i>	Sardina ciega y mexicana
<i>Oncorhynchus mykiss nelsoni</i>	Trucha de San Pedro Mártir
<i>Seriola dorsalis (Ialandi)</i>	Jurel de Castilla
<i>Seriola rivoliana</i>	Jurel pez fuerte
<i>Moluscos</i>	
<i>Haliotis corrugata</i>	Abulón amarillo
<i>Haliotis cracherodii</i>	Abulón negro
<i>Haliotis fulgens</i>	Abulón azul
<i>Haliotis rufescens</i>	Abulón rojo

Actividades del CNRG.

Hasta el momento, el CNRG contiene alrededor de 2000 accesiones de germoplasma de especies acuáticas con valor alimenticio. Se espera realizar intercambios nacionales e internacionales con el objeto de ser utilizados en caso de perder recursos genéticos debido a una catástrofe o ser utilizados en programas de mejoramiento genético.

Fortalezas y capacidades del área.

La RRGAs es una de las grandes fortalezas del SUBNARGENA y en la conservación y uso sustentable de los RGA de México. Esta red se



encuentra integrada por instituciones que cuentan con especialistas en diversas áreas tales como genética, reproducción, patología, acuicultura, pesca, economía y propiedad intelectual, entre otras, que contribuyen activamente a cumplir con los objetivos establecidos por la Convención de la Biodiversidad Biológica y el protocolo de Nagoya. Además de ayudar a definir las guías nacionales que ayuden a conservar, mejorar y distribuir de manera equitativa los RGA de México.

Específicamente, los miembros de la RRGa contribuyen en: (1) *establecimiento de programas de mejoramiento genético y uso sustentable*. Uno de los impactos más importantes en la que ha incidido esta red es apoyando la administración de la pesca, particularmente en identificación de stock pesqueros. Por ejemplo, el caso inédito de las pesquerías de merluza, en donde recientemente se ha generado un proyecto de ley (NOM-020-SAG/PESC-2019) para normar las pesquerías de esta especie en el Golfo de California (DOF 2019) basado en información generada por investigaciones de esta red. Por otra parte, en el ámbito de la acuicultura, esta red ha contribuido en programas de mejoramiento genético y criopreservación de productos sexuales para el uso sustentable de los RGA. Por ejemplo, en especies donde el objetivo es generar líneas genéticas mejoradas, tales como en abulón rojo, camarón, tilapia y trucha arco iris se pueden criopreservar sus gametos o células germinales y estos se pueden utilizar en fertilización asistida para la producción de líneas genéticas mejoradas. Debido a que la pesca y la acuicultura representan uno de los sectores alimentarios que ha mostrado un mayor crecimiento en los últimos años, surge el interés por desarrollar programas de mejoramiento genético de especies acuícolas para incrementar su producción. Por lo tanto, la criopreservación de gametos, larvas y células germinales y los estudios sobre diversidad genética son requisitos esenciales que apoyan el impulso de ambas actividades para beneficio de la sociedad, (2) conservación de recursos genéticos con valor alimentario y de especies amenazadas o en peligro de extinción, (3) la búsqueda de usos biotecnológicos es algo de lo que poco se menciona pero que ha mostrado gran potencial para las industrias farmacéuticas, y conservación ambiental.

De acuerdo con FAO (2020), el porcentaje de poblaciones explotadas a niveles biológicamente insostenibles incrementó del 10% en 1974 al 34.2%



en 2017. Igualmente, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza indicó que un tercio de los peces que se encuentran en aguas mexicanas se encuentran en peligro de extinción (Lyons *et al.*, 2020). En este contexto, los miembros de la RRGa han desarrollado protocolos de conservación *in situ* y *ex situ* para especies amenazadas o en peligro de extinción. Algunas especies en las que se ha trabajado son la trucha de San Pedro Martir, *Oncorhynchus mykiss nelsoni*; la trucha dorada mexicana *Oncorhynchus chrysogaster*, Totoaba, *Totoaba macdonaldi*; bacalao negro, *Anaplopoma fimbria*, mojarra de Cuatro Ciénegas, *Herichthys minckleyi* y pez blanco, *Chirostoma humboldtianum*. Existe una gran cantidad de especies silvestres que son un importante recurso genético no sólo como un recurso alimentario sino también, como un recurso que se puede utilizar en las áreas biotecnológicas y biomédicas de las cuales no se conoce o no está inventariado, pero se requiere de evaluar su diversidad genética. En este contexto, miembros de la red han realizado gran esfuerzo para obtener información sobre su biología, ecología y genética para así resguardar su biodiversidad y tener un uso sustentable de los mismos. El cambio climático ciertamente impactará las pesquerías y la acuicultura, por lo tanto, la conservación de los recursos genéticos es pieza clave como una estrategia para la adaptación y mitigación ante este cambio. Por otra parte, el estudio del cambio climático usando como modelo especies de importancia comercial puede ayudar a entender el impacto y desarrollar estrategias específicas para mitigar sus efectos. La conservación de poblaciones acuáticas silvestres tanto de cuerpos de agua dulce, salobre o marina puede ser llevada a cabo diseñando áreas protegidas manejadas efectivamente, así como valorar la idoneidad de las áreas naturales actualmente reconocidas como protegidas. Conociendo la estructura y conectividad genética de las poblaciones, los expertos en conservación tienen herramientas sólidas para contribuir a las acciones de transfaunación de los recursos genéticos acuáticos de un sitio a otro para auxiliar los programas de conservación *in situ* o *ex situ*. Por otra parte, existe una necesidad urgente de expandir la conservación *in situ* y ser complementada con la conservación *ex situ* con particular atención a recursos genéticos acuáticos que tengan potencial en la adaptación al cambio climático. En este contexto, el SUBNARGENA contiene equipo e instalaciones del estado del conocimiento donde miembros de la red pueden desarrollar estrategias en la adaptación y mitigación de los recursos genéticos que encaran el cambio climático. En conclusión, la

conservación de los RGA es un área emergente que debe ser atendida ya que está estrechamente relacionada a satisfacer la demanda alimenticia, obtener biomoléculas para su aplicación en biomedicina y biotecnología y resguardar la megadiversidad de nuestro país.

Literatura consultada.

- ONU. Convenio sobre la Diversidad Biológica. 1992. 30.
- Casey J Jardim E, Martinsohn JTH. The role of genetics in fisheries management under the E.U. common fisheries policy. *Journal of Fish Biology* 2016;89:2755–2767.
- DOF. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-020-SAG/PESC-2019, Especificaciones para regular el aprovechamiento de merluza (*Merluccius productus*) en aguas de jurisdicción federal del litoral del Océano Pacífico y el Golfo de California. 2019.
- Duncheshe P, Bernatchez L. Individual-based genotype methods in aquaculture. In: *Aquaculture Genome Technologies*. Zhanjiang (John) Liu (Ed.) Blackwell Pub. Asia. 2007:87-108.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. 2020.
- FAO. The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture, J. Bélanger & D. Pilling (eds.). FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. 2019a. 572.
- FAO. The State of the World's Aquatic Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. 2019b.
- FAO. Status of preparation of the state of the world's aquatic genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture assessments. Fourteenth Regular Session. Rome. 2013. 12.
- FAO. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma. 2010.
- Lyons TJ, Máiz-Tomé L, Tognelli M, Daniels A, Meredith C, Bullock R, Harrison I. (eds.), Contreras-MacBeath T, Hendrickson DA, Arroyave J, Mercado Silva N, Köck M, *et al.* The status and distribution of freshwater fishes in Mexico. Cambridge, UK and Albuquerque, New Mexico, USA: IUCN and ABQ BioPark. 2020.



- MacKenzie S, Jentoft S. Genomics in Aquaculture. Academic Press, 2016:304.
- McAndrew B, Napier J. Application of genetics and genomics to aquaculture development: current and future directions. Journal of Agricultural Science. 2011;149:143-151.
- Palaiokostas C, Bekaert M, Khan MG, Taggart JB, Gharbi K, McAndrew BJ, Penman DJ. Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using RAD sequencing. PLoS One. 2013;8:10.1371.
- Roberge C, Normandeau E, Einum S, Guderle H, Bernatchez L. Genetic consequences of interbreeding between farmed and wild Atlantic salmon: insights from the transcriptome. Molecular Ecology 2008;17:314–324.
- Robledo D, Palaiokostas C, Bargelloni L, Martínez P, Houston R. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. Reviews in Aquaculture. 2018;10:670–682.
- Sierra Jiménez CL, Sosa Ramírez J, Cortés-Calva P, Breceda Solís Cámara A, Íñiguez Dávalos LI, Ortega-Rubio A. México país megadiverso y la relevancia de las áreas naturales protegidas. Investigación y Ciencia. 2014;22:16–22.

Capítulo 5

Recursos Genéticos Agrícolas y Forestales

Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez, Juan Manuel Pichardo González, Gabriela Sandoval Cancino, Martín Quintana Camargo, Carlos Iván Cruz Cárdenas, Francisco Fabián Calvillo Aguilar
Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP.
cruz.esmeralda@inifap.gob.mx

Introducción.

México es un país reconocido como un importante centro de diversidad de especies vegetales, muchas de las cuales son exclusivas del territorio nacional. También es considerado centro de origen, domesticación y diversificación de muchos cultivos de importancia regional, nacional y mundial (Aragón y De la Torre, 2015). Se estima que México posee entre el 10 y 12% de la diversidad del mundo y está en 2° lugar en reptiles, 3° en mamíferos y 5° en plantas vasculares (Sarukhán *et al.*, 2009; World Resources Institute, EarthTrends). Además, se tienen registradas 94, 412 especies entre plantas y animales y en cuestión de especies agrícolas se tienen 118 especies de 70 géneros y 39 familias (Harlan, 1971; Martínez-Meyer *et al.*, 2014).

El CNRG-INIFAP tiene el propósito de conservar de manera apropiada y sistemática las colecciones de germoplasma (semillas, plántulas, tejidos, células somáticas, gametos, embriones, ácidos nucleicos, etc.), como reserva estratégica para la conservación, mejoramiento e investigación, para el uso racional en beneficio de la sociedad, y en el caso de un evento catastrófico, prevenir la pérdida de genes y asegurar la sobrevivencia de las especies.

Laboratorio Agrícola Forestal.

En el laboratorio Agrícola-Forestal los objetivos para la conservación a largo plazo son: a) tener un duplicado de respaldo para las colecciones

activas de germoplasma del país; b) contar con una fuente de variabilidad genética para su reintroducción en las poblaciones *in vivo*, cuando sea requerido; c) tener la posibilidad de reconstituir una raza o población cuando sea requerido, especialmente después de eventos catastróficos; y poder desarrollar nuevos genotipos o poblaciones experimentales, contando con una fuente de ácidos nucleicos para estudios moleculares.

Para el cumplimiento de estos objetivos de la conservación, se tienen cuatro cuartos fríos para preservación de plantas *in vitro* bajo condiciones de mínimo crecimiento, dos cuartos para especies tropicales (24 °C), y dos para especies templadas (18 °C), con una capacidad en volumen de 396.4 m³, con una capacidad estimada de 198,000 plántulas (500 accesiones/m³). También se cuenta con 10 contenedores de nitrógeno líquido para la conservación de accesiones a largo plazo de muestras de material vegetal, semen, embriones, oocitos, larvas, líneas microbianas, etc., con la capacidad para 60,000 muestras/contenedor.

El laboratorio Agrícola-Forestal cuenta con dos secciones:

a) semillas ortodoxas y b) *in vitro* y crioconservación de tejido vegetal

Sección semillas ortodoxas.

México ocupa el cuarto lugar en biodiversidad por tener la mayor diversidad de especies, ya que alberga el 10% de la biodiversidad del planeta y se clasifica entre los países más ricos en cuanto a endemismo, (Sarukán *et al.*, 2009; CONABIO y SEMARNAT 2009).

Nuestro país es un importante centro de diversidad vegetal con una alta proporción de diversidad endémica. Es considerado también un centro de origen, domesticación y diversificación de muchos cultivos de importancia nacional y global (De la Torre *et al.*, 2018).

La diversidad vegetal de México incluye a más de 25,000 especies de plantas vasculares (Casas *et al.*, 2007). Se ha reportado que en México entre 600 y 700 especies son utilizadas por grupos indígenas practicando un manejo *in situ* con el cual contribuyen a su protección (Caballero *et al.*, 1998) y al menos 142 especies han sido domesticadas (Perales y Aguirre, 2008).

La Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal (EMCV) 2012-2030 (CONABIO, 2012), que se deriva del Convenio sobre Diversidad Biológica (CBD, 1992), reconoce la necesidad de un mayor conocimiento sobre la diversidad vegetal de México, lo que permitirá la definición de sistemas



efectivos para la conservación y uso sustentable de los recursos genéticos. Además, el Objetivo 9 de la Estrategia Global para la Conservación Vegetal (GSPC por sus siglas en inglés) (CBD, 2010), establece que la conservación del 70% de la diversidad de cultivos y otras especies de importancia socio-económica debería alcanzarse para el año 2020, por lo que es importante fortalecer las acciones de conservación, caracterización y evaluación de los recursos fitogenéticos.

En cuanto a la conservación de los recursos genéticos en México, la creación del CNRG es un elemento central de la estrategia de conservación *ex situ* de los Recursos Genéticos del país; Esto incluye: semillas, plantas, tejidos, células, gametos, embriones y DNA; se considera a las colecciones de germoplasma del CNRG como una reserva estratégica para conservación, mejoramiento e investigación, para su uso racional en beneficio de la sociedad y, en caso de una catástrofe, para prevenir la pérdida irreparable de los recursos genéticos, a fin de asegurar la conservación de especies útiles a la población.

La política del CNRG es fomentar la conservación, caracterización, evaluación, validación, mejoramiento, manejo, reproducción y aprovechamiento sustentable de la riqueza genética agrícola, forestal, microbiana, pecuaria y acuícola existente en el país. En particular, aquéllas de importancia biológica o económica para la producción de alimentos, fibras, madera y combustibles, entre otros bienes. En este sentido, el CNRG conserva los recursos genéticos de importancia para México desde la perspectiva agroalimentaria, económica, ambiental y cultural, asimismo, contribuye a la protección y el uso ordenado racional y sustentable de dichos recursos.

Recursos fitogenéticos.

En cuanto a su uso, la FAO (1996) define a los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA) como el material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura.

La inclusión de los recursos genéticos forestales en esta definición obedece a una convención del sistema de las Naciones Unidas, por la cual considera los RFAA en sentido amplio, incluyendo en ellos a los recursos forestales (FAO, 2014).



Bancos de germoplasma.

Los bancos de germoplasma son depósitos de recursos fitogenéticos que proporcionan la materia prima para el mejoramiento de los cultivos (Rao *et al.*, 2007). Estos recursos cumplen una función vital en el desarrollo sostenible de la agricultura en tanto ayudan a aumentar la producción de alimentos y a combatir el hambre y la pobreza. Las semillas que se almacenan en los bancos de germoplasma son un recurso vital e irremplazable, una herencia que se debe conservar para proveer opciones a la agricultura en el futuro, en un mundo que afronta el cambio climático y otros desafíos. La conservación sostenible de los recursos genéticos, depende del trabajo eficaz del personal de los bancos de germoplasma, cuyo papel es crítico para garantizar que el germoplasma se conserve de manera efectiva y eficiente. Este personal debe aplicar procedimientos adecuados al manejo de las semillas para garantizar que éstas sobrevivan y estén disponibles para las generaciones actuales y futuras (Rao *et al.*, 2007).

Seguir los procedimientos adecuados en el manejo de las semillas en un banco de germoplasma, es fundamental para conservar los recursos fitogenéticos a largo plazo, de manera eficiente y efectiva en costos. Estos procedimientos garantizan que las semillas almacenadas sean de la más alta calidad y alcancen su máxima longevidad. El objetivo de un banco de germoplasma, es mantener accesiones de alta viabilidad durante períodos prolongados. Los avances en la biología de las semillas durante las últimas décadas, han permitido comprender mejor la fisiología de las semillas y su comportamiento en almacenamiento, haciendo de ellas el medio más fácil y conveniente de conservación a largo plazo. Esto ha llevado al desarrollo de técnicas para manejar adecuadamente las semillas y prepararlas para el almacenamiento (Rao *et al.*, 2007).

Conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos en la modalidad de semillas ortodoxas.

En el campo de los recursos fitogenéticos, el comportamiento fisiológico en almacenamiento de las semillas de una especie y su longevidad, determinan las técnicas para su conservación. Por tratarse de un método práctico y económico, el almacenamiento en forma de semilla es el preferido para conservar el 90% de los seis millones de accesiones



mantenidos en colecciones *ex situ* en todo el mundo (Rao *et al.*, 2007). Éste es el principal método de conservación de las especies que producen semillas ortodoxas, es decir, que resisten la desecación a contenidos de humedad bajos y el almacenamiento a temperaturas muy bajas. La mayoría de las especies cultivables y forrajeras, y muchas especies arbóreas producen este tipo de semilla. Las técnicas para conservar semillas ortodoxas se han perfeccionado durante varias décadas, e incluyen el secado de las semillas hasta lograr un contenido de humedad bajo (3-7% de peso fresco, dependiendo de la especie) y el almacenamiento en recipientes herméticos, a bajas temperaturas, preferiblemente a -18 °C o menos (FAO/IPGRI, 1994).

Los protocolos para la conservación de semillas ortodoxas dependerán si es una colección base o una colección activa.

Colección base: Para la conservación de semillas ortodoxas a largo plazo, más de 10 años, se requiere realizar la desecación de las semillas a 15 °C y 10 - 15% de humedad relativa, hasta alcanzar un contenido de humedad entre el 4-7%, las semillas se deben envasarse en recipientes herméticos y su conservación se realiza en cuartos fríos a -18 °C (Rao *et al.*, 2007).

Colección activa: Conservación de semillas ortodoxas a mediano plazo, menos de 10 años. La desecación de las semillas se lleva a 7-8% de humedad y una temperatura de almacenamiento entre 0 y 10 °C. Estas son colecciones que suelen utilizarse con diversos fines, tales como investigación básica, caracterización o programas de mejora (Rao *et al.*, 2007).

La conservación de recursos fitogenéticos en México.

En 2006, Molina y Córdova publicaron el Segundo Informe Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, el cual mostró que en ese tiempo en México se conservaban *ex situ* 276,945 accesiones de germoplasma. Para la conservación de semillas ortodoxas había 22 cuartos fríos con una capacidad total de almacenamiento de 2354 m³, de los cuales 1273 m³, es decir, un 54% eran usados para la conservación de 54,945 accesiones. No obstante, solamente unos pocos estaban operando en condiciones adecuadas para el almacenamiento a largo plazo (en cuartos fríos a menos de 0°C). Otras 52,268 accesiones fueron conservadas por los investigadores, en diferentes instituciones, en

almacenes con condiciones ambientales no controladas. Asimismo, otras 69,931 accesiones estaban resguardadas en colecciones de trabajo y también en almacenes a temperatura ambiente (Molina y Córdova, 2006).

Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos en el INIFAP conservados en la modalidad de semillas ortodoxas.

Entre los años 2012 y 2013, el CNRG llevó a cabo un estudio con el propósito de conocer el estado que guarda la conservación de recursos genéticos conservados en el INIFAP. Este estudio mostró que en esos años 78,066 accesiones de semillas ortodoxas de 34 especies agrícolas de 17 géneros eran conservadas en cámaras frías en diferentes Campos Experimentales del INIFAP (De la Torre *et al.*, 2018).

Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos en la modalidad de semillas en el CNRG-INIFAP.

Desde el comienzo de la operación del CNRG la colección de semillas en el banco de semillas ortodoxas del CNRG se conformó por 7,300 accesiones de maíz que envió el CIMMYT para su resguardo, así como 8,000 accesiones de varios cultivos como girasol, frijol, algodón chile, entre otros que se repatriaron del Laboratorio Nacional para la Preservación de Recursos Genéticos del ARS-USDA Fort Collins, CO y alrededor de 3,000 accesiones de frijol, calabaza, tomate de cáscara entre otros y algunas especies forestales y forrajeras. Esta colección inicial de semillas en el CNRG está conformada por 17,846 accesiones de 98 géneros de 277 especies (De la Torre *et al.*, 2018; González-Santos, 2016).

Asimismo, del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) se han repatriado 4,455 accesiones de frijol de varias especies como *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L. *Phaseolus lunatus* L, entre otras varias especies (De la Torre *et al.*, 2018).

Actualmente se tienen 26,723 accesiones de especies agrícolas, forestales y forrajeras. Dentro de las especies agrícolas resguardadas en el banco de germoplasma de semillas ortodoxas del CNRG se pueden mencionar cultivos como maíz, frijol, trigo, calabaza, chile, tomate, amaranto, entre muchas otras. También se resguardan semillas de diferentes especies forrajeras tanto nativas como introducidas, se pueden mencionar algunos géneros como *Bouteloua*, *Leucaena*, *Eragrostis*, *Panicum*, entre varios otros.

Hasta antes de 2014 no se tenía establecida una colección nacional de recursos genéticos forestales en México. Por ello, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) y el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP del 2014 al 2018 pusieron en marcha el proyecto “Fomento y operación del subsistema de recursos genéticos forestales dentro del CNRG”, el cual incluyó cinco componentes, uno de los cuales es la “Colección Nacional de Recursos Genéticos Forestales”.

Con la ejecución de ese proyecto, se logró establecer la colección de especies forestales más completa del país y su registro ante SEMARNAT como colección científica, con impacto para todo el país, pues instituciones académicas, organizaciones e instituciones de investigación, pueden acudir a esta colección con fines académicos, de investigación y de establecimiento de especies. Como parte de las 26,723 accesiones, a la fecha se tienen conservadas en cámara fría semillas de 1,367 accesiones de 109 especies forestales de 71 géneros que corresponde a la Colección Nacional de Recursos Genéticos Forestales.

Dentro de las especies forestales se pueden mencionar especies de algunas coníferas como *Pseudotsuga mensiezii* (Mirb.) Franco, *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen, *Pinus patula* Schltld. et Cham., *Pinus pseudostrobus* Lindl., entre otras. También a especies de climas áridos y semiáridos como árboles del género *Acacia*, *Prosopis*, entre otros.

La mayor parte de las accesiones de semilla en el CNRG están documentadas en la plataforma de datos pasaporte GRIN-Global (De la Torre *et al.*, 2018). A la fecha se sigue trabajando en la captura y documentación de las accesiones que han ingresado en los años recientes. Actualmente se está trabajando en la implementación de una plataforma de datos pasaporte que ha sido creada exprofeso para el CNRG, la cual abarca todos los subsistemas de recursos genéticos (agrícola-forestal, acuático-pecuario, microbiano y de ADN y genómicas). Se espera para el mediano plazo, todas las accesiones de recursos genéticos del CNRG estén documentadas en dicha plataforma.

La colección de semillas ortodoxas del banco de germoplasma de semillas ortodoxas del CNRG-INIFAP, es una colección pública, por lo tanto, está sujeta a distribuirse a las instituciones de investigación, universidades, organizaciones, productores, y público en general, para los fines de



investigación, educación, mejoramiento genético o regeneración. No obstante, el procedimiento para el uso y distribución se realizará a través de una firma de Acuerdo de Transferencia de Materiales (ATM) que se firma entre el INIFAP y la parte solicitante de recursos genéticos.

Evaluación de la calidad física y fisiológica de las semillas de las accesiones resguardadas en el CNRG-INIFAP.

En el Laboratorio Agrícola Forestal Sección Semillas Ortodoxas que le da vida al Banco de Germoplasma de Semillas Ortodoxas del CNRG-INIFAP, desde la recepción de las accesiones hasta su resguardo a largo plazo, todo el procesamiento se realiza con altos estándares de calidad, hecho que se hace patente en la evaluación de la calidad de semillas, ya que el laboratorio está acreditado ante la Entidad Mexicana de Acreditación (ema) con el ensayo “ES-SO Evaluación de la calidad física y fisiológica de semillas” bajo la norma NMX-EC-17025-IMNC-2018 (ISO/IEC 17025:2017) relacionada con laboratorios de ensayo y calibración. Los análisis que tienen alcance en la acreditación son: análisis de pureza física, peso de mil semillas, determinación del contenido de humedad, análisis de la integridad física de las semillas con el equipo de rayos X, evaluación de la germinación y evaluación de la viabilidad con el método de tetrazolio. Por lo anterior, las semillas de todas las accesiones que ingresan para resguardo al CNRG son evaluadas en cuanto a su calidad, acondicionadas, conservadas y resguardadas con altos estándares de calidad.

Recepción y registro de accesiones.

Cuando se reciben accesiones de semillas para resguardo en el Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, las muestras deben ingresar con una solicitud de resguardo debidamente requisitada y los datos pasaporte de éstas. Asimismo, a la llegada de las accesiones se realiza una inspección visual a cada una de ellas, para determinar si las accesiones recibidas se encuentran libres de agentes patógenos como hongos o insectos. Las accesiones recibidas son almacenadas en una cámara de almacenamiento temporal de germoplasma a una temperatura de 4 °C y de ahí se llevan a la evaluación de la calidad de semilla conforme se van procesando (Pichardo-González *et al.*, 2018).

Evaluación de calidad física.

a) *Limpieza de las semillas.* La limpieza de semillas es la eliminación de desechos, material inerte, semillas dañadas e infectadas, y semillas de otras especies con el fin de mejorar la calidad de las muestras para almacenamiento. Las semillas se limpian tan pronto llegan al banco de germoplasma (Figura 1) (Rao et al., 2007).

b) *Análisis de pureza.* Durante el análisis de pureza, cada fracción de semilla 'pura' de la muestra de trabajo se separa de la materia inerte y de otras semillas. Los bancos de germoplasma deben buscar la pureza absoluta, es importante establecer estándares tan altos como del 95% para la proporción de semilla pura en las accesiones (Rao et al., 2007).

c) *Peso de mil semillas.* El peso de mil semillas es utilizado para calcular la densidad y el número de semillas por contenedor o recipiente. El peso de mil semillas da una idea del tamaño de las semillas, así como su estado de madurez (ISTA, 2017).

d) *Determinación del contenido de humedad.* A todas las semillas que ingresan a la colección de semillas ortodoxas se les determina el contenido de humedad con la finalidad de tomar decisiones en cuanto a su conservación. Se utiliza el método del horno (ISTA, 2017) y el método de la termobalanza (Pichardo-González et al., 2018).



Figura 1. Evaluación de la calidad física de semillas: Análisis de pureza y determinación del contenido de humedad

e) *Evaluación de la integridad física con el equipo de rayos X.* Mediante la evaluación de la integridad física de las semillas con el equipo de rayos X (Figura 2), en cada accesión se determinan las proporciones (porcentajes) de semillas llenas, vacías, dañadas por insecto y dañadas por manejo mecánico, características que son importantes para el estado de las semillas en cuanto a integridad física (ISTA, 2017).

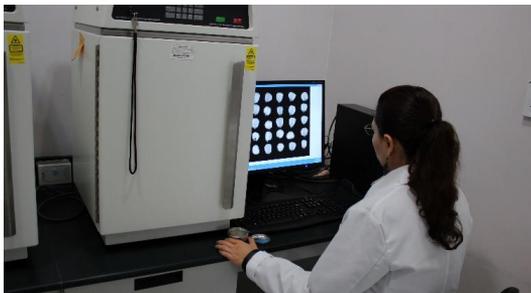


Figura 2. Evaluación de la integridad física de las semillas con el equipo de rayos X.

Evaluación de calidad fisiológica.

a) *Evaluación de la germinación.* A todas las accesiones de semilla que se resguardan en el CNRG se les realiza una evaluación de la germinación (Figura 3). Este análisis se hace para determinar qué proporción de las semillas de una accesión germina en condiciones favorables y produce plántulas normales, es decir, plántulas con estructuras esenciales con raíces, brotes y suficiente reserva de alimento capaces de desarrollarse en plantas reproductivamente maduras (Rao *et al.*, 2007).



Figura 3. Evaluación de la germinación de semillas en el CNRG

b) *Evaluación de la viabilidad por el método de tetrazolio.* Es muy importante que las semillas almacenadas en un banco de germoplasma puedan producir plantas cuando se les siembre en el campo. Por tanto, estas deben tener una viabilidad alta al inicio del almacenamiento y mantenerla durante el proceso de conservación. Esta evaluación se realiza principalmente por medio de tinción de las semillas con sales de tetrazolio, el cual es un método colorimétrico que permite una estimación rápida de la viabilidad de muestras de semilla y distinguir aquellas con dormancia de semillas muertas (ISTA, 2017).

Almacenamiento, conservación y regeneración de germoplasma.

a) *Secado y Envasado.* Las accesiones que se conservan como semillas ortodoxas son introducidas en la cámara de secado hasta que alcanzan un contenido de humedad de entre el 5 y 6%, dependiendo de la especie. Posteriormente se realiza el envasado de estas en envases de PET de 250 mL o de 1 L dependiendo de la cantidad de semilla de la accesión, incluyendo una bolsita de plástico perforada con gel de sílice y se sellan herméticamente. La identificación de las accesiones se realiza colocando en los envases dos etiquetas auto adheribles previamente impresas con la información de datos pasaporte disponible para su correcta identificación (Pichardo-González *et al.*, 2018).

b) *Almacenamiento y conservación a largo plazo.* El almacenamiento es la preservación de las semillas en condiciones ambientales controladas para que mantengan la viabilidad durante períodos prolongados (Figura 4). La longevidad de las semillas depende de su calidad inicial, del contenido de humedad y de la temperatura durante el almacenamiento. En general, un contenido de humedad bajo y una temperatura baja reduce la pérdida de viabilidad en las semillas. Para prolongar la viabilidad de las semillas durante el almacenamiento, se pueden emplear diferentes combinaciones de contenido de humedad y temperatura. (Rao *et al.*, 2007). El Banco de Germoplasma de Semillas Ortodoxas del CNRG es una colección base, por lo que la conservación de las semillas es a largo plazo. Las accesiones que se resguardan están conservadas en una cámara fría a -18 °C (Pichardo-González *et al.*, 2018).



Figura 4. Almacenamiento a largo plazo de las accesiones de semilla en cámara fría (-18 °C).

c) *Regeneración de germoplasma.* La regeneración es la renovación de las accesiones de germoplasma mediante la siembra y la cosecha de semillas con las mismas características de la muestra original (Rao *et al.*, 2007). El monitoreo de la viabilidad para la regeneración de las accesiones de semilla se recomienda realizar cada cinco años, contados a partir de la fecha de ingreso al banco de germoplasma y cuando se detecte que la viabilidad haya bajado considerablemente estas semillas se regenerarán (Pichardo-González *et al.*, 2018). A la fecha los géneros en los que más se hecho regeneración de sus accesiones en el banco de germoplasma de semillas ortodoxas del CNRG han sido *Phaseolus* y *Zea*, gracias a proyectos de investigación que se han llevado a cabo, en los cuales la regeneración de germoplasma de estos géneros ha sido uno de los objetivos.

Sección Cultivo *in vitro* y Crioconservación de tejido vegetal.

La conservación y el uso sustentable de los recursos genéticos de plantas es importante para satisfacer y asegurar en el futuro la demanda alimentaria (Ahmed *et al.*, 2010).

Existen diferentes técnicas para la conservación *in vitro* de especies vegetales dentro del banco de germoplasma del CNRG-INIFAP. Se pueden clasificar según su duración, a corto plazo y a largo plazo. En la primera se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* que fomenten el crecimiento reducido del explante a conservar; en la segunda técnica se utiliza principalmente la crioconservación (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, permite mantener las plántulas en bancos de germoplasma *in vitro*, libres de patógenos, en espacio reducido, a bajo

costo y condiciones controladas que facilitan el manejo a corto y largo plazo de material vegetal además de facilitar el intercambio de germoplasma (Rayas *et al.*, 2002), particularmente, de especies con propagación vegetativa.

La conservación en condiciones de crecimiento mínimo o de lento crecimiento, es la técnica que consiste en la modificación del ambiente en condiciones *in vitro*, modificando el medio de cultivo, temperatura o luz, retardando significativamente el crecimiento de los tejidos sin causar efectos negativos en la viabilidad de los mismos (Domínguez *et al.*, 2008). Mediante esta técnica se puede conservar a los explantes por nueve o más de diez meses en cultivo *in vitro*, tiempo en el cual se retrasa el crecimiento y se disminuyen los intervalos de subcultivo (Rayas *et al.*, 2002; Rayas *et al.*, 2013). Sin embargo, en el CNRG se han conservado hasta por dos años explantes de vainilla, en donde se retrasa el crecimiento adicionando sorbitol y manitol al medio de cultivo.

Así como menciona Watt *et al.* (2000) el crecimiento mínimo puede ser alcanzado por cambios en el potencial osmótico de las células en cultivo, como se hizo con la vainilla conservada en el CNRG. El potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en los explantes, conforme sea más negativo, menor será la adsorción de agua y por consecuencia habrá una baja disponibilidad de nutrientes (Rayas *et al.*, 2013). Por ejemplo, en accesiones de *Agave spp.* en el medio de cultivo se adicionaron agentes osmóticos como el manitol y el sorbitol (50 gL^{-1}), lo cual redujo la tasa de crecimiento *in vitro* de los tejidos, medida como incremento en peso fresco, y prolongar así el tiempo entre subcultivos de 75 días a 10 meses, y sin afectar su viabilidad ni su capacidad de regenerar plantas completas (Pérez Molphe-Balch *et al.*, 2012).

La conservación en condiciones de crecimiento mínimo también se utiliza para el intercambio de material vegetal. La técnica que se utiliza es de encapsular con perlas de alginato de calcio los brotes de guayaba (*Psidium guajava* L.) obtenidos de plántulas cultivadas *in vitro* (Rai *et al.*, 2008).

No sólo con la modificación del medio de cultivo se puede retrasar el crecimiento del explante vegetal. También se puede lograr un crecimiento lento mediante bajas temperaturas ($10 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y baja intensidad de luz (2.5



$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ densidad de flujo cuántico) además de combinaciones con agentes osmóticos (sacarosa, sorbitol y manitol) los cuales tuvieron éxito en la conservación de regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (Srivastava *et al.*, 2013). Sin embargo, también depende de la especie a conservar, por ejemplo, en accesiones de piña (*Ananas comosus*), se ha conservado sólo en un medio básico MS al 50%, sin reguladores de crecimiento y en condiciones ambientales que retrasan el crecimiento (temperaturas de 21 ± 2 °C, fotoperiodo de 12 horas) (Souza *et al.*, 2006).

Por otro lado, es posible que sólo con variaciones de temperatura se pueda retrasar el crecimiento del explante. Tejido de *Gmelina arborea* Roxb. ex Sm. se mantuvo en medio Murashige y Skoog (1962), 30 gL^{-1} de sacarosa, 8 gL^{-1} de agar y con un pH de 5.7, con una temperatura de 18°C (Cruz y Gómez, 2017). Esto también depende de la especie, ya que, si las especies son tropicales, conservándolas a bajas temperaturas se reduce el crecimiento.

Otra especie forestal conservada en condiciones de crecimiento mínimo es la caobilla (*Swietenia humilis* Zucc.), en medio Murashige y Skoog (1962), 15 gL^{-1} de sacarosa, 15 gL^{-1} de manitol a $24^\circ\text{C} \pm 2$ (Cruz *et al.*, 2019). La conservación de especies vegetales en condiciones de crecimiento mínimo *in vitro* debe ser estudiada para cada una de las especies que ingresen a las instalaciones del CNRG-INIFAP. Cada una de ellas presentan características particulares lo que las hace únicas y de eso va a depender el método de conservación.

Si bien la conservación *in vitro* a mediano plazo de germoplasma vegetal es de suma importancia, para contar con una estrategia de conservación integral de especies recalcitrantes es necesario implementar técnicas de conservación a largo plazo.

En el Laboratorio Agrícola-Forestal sección Cultivo *in vitro* y Criopreservación de Tejidos Vegetales del CNRG-INIFAP, se utiliza la técnica de criopreservación de tejidos vegetales para llevar a cabo la conservación a largo plazo del germoplasma vegetal. La criopreservación es la reducción y subsecuente interrupción de las funciones biológicas de materiales biológicos mediante la reducción de temperatura con nitrógeno líquido (-196 °C) manteniendo la viabilidad (Niino y Arizaga,



2015). Desde el primer reporte exitoso de criopreservación en plantas (Sakai, 1960), han surgido diferentes métodos para llevar a cabo la criopreservación de especies vegetales que cuentan con grandes beneficios como el mantenimiento de la estabilidad genética y viabilidad del tejido, reducción de costos para la conservación de germoplasma a largo plazo y eficiencia en almacenamiento (Engelmann, 2004). El laboratorio de cultivo *in vitro* y crioconservación de tejido vegetal, tiene como objetivo la conservación a mediano y largo plazo de especies recalcitrantes, las cuales carecen de semillas viables o las semillas presentes no se pueden conservar a bajas temperaturas y bajo contenido de humedad (Roberts, 1973; Berjak y Pammenter, 2002).

Para llevar a cabo este objetivo, se hace uso de diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de plantas que permiten conservar a mediano y largo plazo el germoplasma vegetal (Sánchez y Jimenéz, 2010).

Conservación a mediano plazo de especies recalcitrantes mediante crecimiento mínimo.

Para el desarrollo de la técnica de conservación en condiciones de crecimiento mínimo en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* y Crioconservación de Tejido Vegetal, se realizan los siguientes procedimientos.

En caso de que la muestra a conservar llegue en condiciones de *in vitro*, se realiza una inspección visual por parte del responsable de prueba, esto con el fin de identificar posibles problemas de contaminación, fracturas del envase o el sello, enfermedades en el explante, o cualquier otro factor o anomalía que pueda comprometer la integridad de la accesión. Si no se detecta nada fuera de lo normal, las muestras recibidas entran a una etapa de cuarentena en alguno de los cuartos de conservación a una temperatura de 24-28 °C durante 40 días, esto con motivo de determinar la viabilidad del tejido. Si durante este tiempo presenta algún inconveniente, se solicita al usuario enviar otra replica de accesiones, en caso de no presentar problemas sanitarios las muestras son identificadas por el personal del laboratorio con un rótulo que contiene la siguiente información: nombre de la accesión, fecha de siembra y las iniciales del apoyo técnico que realice este proceso. En caso que la cantidad de material no sea suficiente para dar inicio al ensayo, comienzan con la etapa de multiplicación y después pasa a la etapa de crecimiento mínimo.



Para las muestras que no son *in vitro*, se les realiza el proceso de establecimiento, después, si la cantidad de material no es el suficiente para desarrollar el ensayo, las muestras son pasadas a una etapa de multiplicación, para luego continuar con la etapa de crecimiento mínimo.

Establecimiento de material vegetal.

El protocolo para la desinfección del tejido vegetal para el establecimiento en condiciones *in vitro*, varía dependiendo del tipo de tejido, procedencia y condiciones en las cuales se recibe en el laboratorio.

Así mismo, se pueden agregar agentes surfactantes como son Tween 80 o 20, fungicidas ó bactericidas; en distintas concentraciones y tiempo de exposición con el fin de lograr un exitoso establecimiento del material.

Preparación del material vegetal para el ensayo de crecimiento mínimo.

Después de pasar el periodo de cuarentena exitosamente, tanto el material vegetal enviado en condiciones de *in vitro*, o el material establecido *in vitro* en el laboratorio, que no presente contaminación o enfermedad, se procede a evaluar si cuenta con la longitud mínima necesaria para realizar el ensayo de crecimiento mínimo. La longitud que se requiere es de al menos un centímetro.

Esta evaluación se realiza dentro del laboratorio en un área aséptica. Se miden los explantes con un vernier digital, sin sacarlos del tubo ni romper el sello de la tapa. Se selecciona el material que cumple con la longitud para realizar el ensayo.

Siembra de tejidos vegetales.

La siembra se realiza dentro de la cabina de flujo laminar con el material de disección dentro de la cabina. Se identifican con un código los tubos con cada tratamiento y repetición que se va a evaluar, se disectan los explantes, para homogeneizar la talla de los explantes evaluados al tratamiento (Figura 5). Una vez terminada la siembra de todos los tratamientos los tubos son sellados y son separados por tratamiento. Se etiqueta con los datos: especie, fecha y tratamiento y los tubos se almacenan en el cuarto de conservación correspondiente



Figura 5. Explantes en condiciones *in vitro* para realizar ensayos de crecimiento mínimo

Almacenamiento de los explantes.

El almacenamiento promedio es de 3 a 12 meses para la evaluación de los tratamientos, sin embargo, los explantes de ensayo pueden ser conservados en el CNRG por medio de un convenio en el cual el cliente se compromete a cubrir los costos de conservación ó alguna otra modalidad en la cual el material vegetal de ensayo quede protegido (Figura 6). En el CNRG se tienen conservadas en condiciones de crecimiento mínimo especies como, chayote, vainilla, papa, cedro rojo, caoba, caobilla, Gmelina.



Figura 6. Conservación en condiciones de crecimiento mínimo de chayote (foto izquierda, arriba); de vainilla (foto de derecha, arriba) y de cedro rojo (foto de abajo)

Conservación a largo plazo de especies recalcitrantes mediante criopreservación de tejidos vegetales.

En el Laboratorio de Cultivo *In Vitro* y Criopreservación de Tejidos Vegetales del CNRG-INIFAP se ha implementado el uso de los métodos V y D-crioplaca (Yamamoto *et al.*, 2011; Niino *et al.*, 2013) los cuales, además de contar las diferentes ventajas antes mencionadas de las técnicas de criopreservación, al estar basadas en el uso de crioplacas de aluminio (Figura 7), permiten que las muestras al adherirse en los pozos de la crioplaca queden estáticas durante las fases de inmersión del proceso de criopreservación, lo cual disminuye la dificultad técnica requerida para usar éstos métodos para conservación de germoplasma. Por otro lado, las crioplacas permiten altos índices de enfriamiento y calentamiento de los explantes, lo cual se refleja en altos porcentajes de rebrote (Niino *et al.*, 2017).

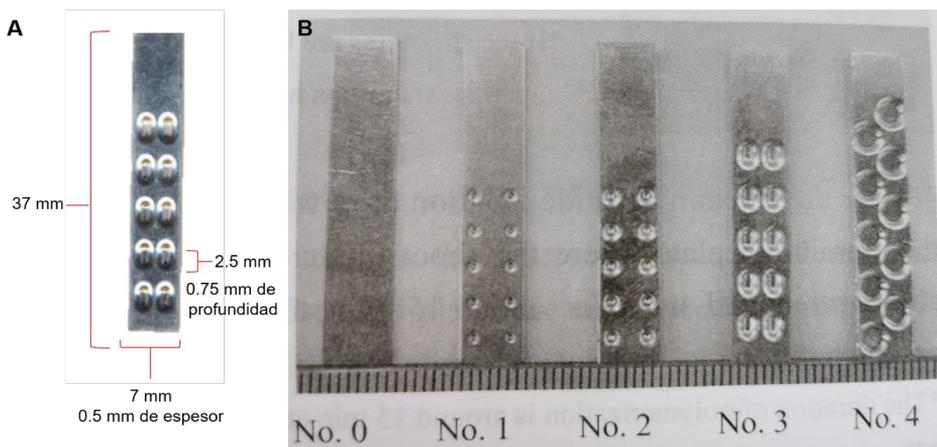


Figura 7. Crioplacas de aluminio. (A) Dimensiones, (B) Modelos.

Para establecer un protocolo de criopreservación en el Laboratorio de Cultivo *In Vitro* y Criopreservación de Tejidos Vegetales del CNRG-INIFAP se siguen los pasos descritos a continuación:

Establecimiento de tejido vegetal en condiciones *in vitro*.

Inicialmente, todo el material vegetal que ingresa al laboratorio es revisado por los expertos técnicos para cerciorarse que el tejido vegetal esté vivo, descartar contaminación evidente por patógenos y cuente con datos pasaporte. Enseguida se le asigna un número de accesión, y se



desinfecta con soluciones de detergente, etanol y cloro comercial. Una vez desinfectado, el material se siembra en medio de cultivo estéril, se incuba en condiciones controladas (24 ± 2 °C; 16 horas luz) y, después de varios días, se evalúa el material para descartar aquellos explantes contaminados.

Obtención de tejido vegetal para criopreservación.

Ya con el material vegetal libre de contaminantes, los explantes se subcultivan en medio de cultivo adicionado con bajas concentraciones de BA (6-bencilaminopurina) para obtener brotes y así contar con suficiente material para criopreservar. El tejido ideal para llevar a cabo la criopreservación de una especie son los meristemos apicales, ya que están formados de células pequeñas, no conectadas con haces vasculares y con multiplicación muy activa, lo cual hace menor la probabilidad de contaminación y mayor la probabilidad de respuesta aún después de ser sometidas a estrés. Dependiendo del método de criopreservación que se llevará a cabo, se cortan meristemos de 1 mm^3 en el caso de V-crioplaca y de $1.5\text{-}2.5 \text{ mm}^3$ en el caso de D-crioplaca. Lo anterior se debe a que, en el caso de V-crioplaca, se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO) en la solución vitrificante, compuesto que en contacto prolongado resulta tóxico para las células, por lo cual los meristemos deben tener el tejido vegetal mínimo para conservar la viabilidad celular.

Cuando se criopreserva tejido para su conservación a largo plazo, se consideran 100 meristemos por accesión, es decir, 10 crioplacas con 10 meristemos cada una.

Precultivo.

Una vez que se cortan los meristemos, estos se incuban 24 horas en medio de cultivo adicionado con altas concentraciones de sacarosa (normalmente 0.3 M) y bajo condiciones controladas. En éste paso las moléculas de sacarosa entran en las células reemplazando las moléculas de agua y así se evita que al momento en el que el tejido entra en contacto con el nitrógeno líquido se formen cristales de agua que pueden lisar la célula y perder viabilidad de ésta.

Adhesión de meristemos.

Una vez que los meristemos pasaron por el precultivo, se toma la crioplaca de aluminio y se colocan $2 \mu\text{L}$ de alginato de sodio al 2 % en cada pozo.



Enseguida, se coloca un meristemo por pozo después para lo cual la crioplaca se recubre con solución 0.1 M de cloruro de calcio (CaCl_2) por 15 minutos para llevar a cabo la polimerización.

Osmoprotección.

Después de que los meristemos se adhieren a las crioplacas, éstas se sumergen por 30 minutos en solución de carga (LS por sus siglas en inglés) la cual puede contener desde 0.4 hasta 1.6 M de sacarosa además de 2 M de glicerol. Las moléculas de sacarosa y glicerol juegan un papel importante al entrar a la célula vegetal y conferir osmoprotección a éstas, ya que al ser éstas mayoría al interior de la célula, evitan que el tamaño de la célula se incremente debido a la formación de cristales de agua al entrar en contacto con nitrógeno líquido y que dichas células se lisen y pierdan viabilidad.

Vitrificación o deshidratación.

Hasta éste punto, el proceso de V y D-crioplaca es el mismo, pero después de pasar por la solución de carga, se llevan a cabo los pasos a los cuales las técnicas les deben su nombre. En el caso de V-crioplaca, los meristemos se sumergen en solución vitrificante (usualmente PVS2; Sakai *et al.*, 1990) durante un rango de 20 a 30 minutos para evitar toxicidad por DMSO y el agua intracelular remanente entra en estado amorfo, lo cual impide la formación de cristales de agua. En el caso de D-crioplaca, los meristemos se colocan en cajas Petri que contienen silica gel o gel de sílice y el tejido se deshidrata físicamente durante un rango de 30 a 150 minutos dependiendo de la especie, lo cual extrae el agua necesaria para evitar la formación de cristales de agua intracelulares.

Inmersión en nitrógeno líquido.

Una vez que el tejido está vitrificado o deshidratado, se toman las crioplacas y se sumergen directamente en el nitrógeno. Al llevarse a cabo la congelación ultrarrápida, se reduce la probabilidad de formación de cristales de agua intracelular. El tejido permanece al menos una hora en el nitrógeno y después de éste tiempo, el metabolismo celular se para completamente, por lo cual después de una hora el tejido se puede conservar por tiempo indefinido.



Recalentamiento.

Cuando se desea recuperar los meristemos, estos se sacan del NL y se sumergen directamente en la solución de recalentamiento por 15 minutos. Dicha solución contiene entre 1 y 1.2 M de sacarosa y se encuentra a temperatura ambiente. Las altas concentraciones de sacarosa de la solución de recalentamiento impiden la formación de cristales de agua en la parte externa del tejido, así como también ayudan a reactivar a las células que salen de la criopreservación.

Recuperación.

Una vez recalentado el tejido, los meristemos se separan de la crioplaca y se colocan en medio de cultivo adicionado con 0.2 gL^{-1} de BA. Los explantes se incuban en oscuridad a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante tres días y después se colocan en fotoperiodo de 16 horas luz a la misma temperatura controlada. Después de que el tejido se reactiva, se puede seguir con el proceso de cultivo *in vitro* respectivo de cada especie para obtener plantas completas regeneradas y funcionales.

En siete años de investigación, se han desarrollado en el Laboratorio de Cultivo *In Vitro* y Criopreservación de Tejidos Vegetales protocolos de criopreservación basados en el uso de crioplaquetas de aluminio para cinco especies forestales (cordia, caobilla, cedro, caoba, gmelina) y cinco agrícolas (papa, chayote, vainilla, aguacate y ajo). Es importante reiterar que cada protocolo de criopreservación es específico para cada especie, por lo cual la labor realizada en el laboratorio es trascendente, ya que permite conservar germoplasma vegetal recalcitrante de importancia para México y el mundo.

Servicios del área.

En el Laboratorio Agrícola-Forestal sección *in vitro* y crioconservación de tejido vegetal se ofertan los siguientes servicios:

1. Conservación de tejido vegetal en condiciones de crecimiento mínimo.
2. Conservación de tejido vegetal en crioconservación
3. Multiplicación masiva de tejido vegetal.
4. Establecimiento de tejido vegetal en condiciones de *in vitro*.



En el Laboratorio Agrícola-Forestal sección semillas ortodoxas se ofertan los siguientes servicios:

1. Análisis de pureza física de semillas
2. Peso de mil semillas
3. Determinación del contenido de humedad de semillas.
4. Análisis de la integridad física de semillas con el equipo de rayos X.
5. Evaluación de germinación de semillas
6. Evaluación de la viabilidad de semillas por el método de tetrazolio.
7. Almacenamiento temporal de semillas
8. Almacenamiento en la modalidad de caja negra.

Depósito de Recursos genéticos agrícolas y forestales.

Para el depósito de los recursos genéticos agrícolas y forestales dentro del Laboratorio Agrícola-Forestal:

1. El usuario debe enviar una solicitud al Director del CNRG de preferencia en papel membretado. La solicitud deberá elaborarse en los siguientes términos:
 - a) Depósito: indicar lo que se desea ingresar a la colección de Semillas Ortodoxas del CNRG, una justificación breve del depósito, el tipo de depósito (donación, depósito restringido, caja negra, almacenamiento temporal), o si es una especie de propagación vegetativa o con semilla recalcitrante, realizar la solicitud (CM-PI-R-01).
 - b) Servicio: indicar cuál o cuáles serán los servicios que solicita, las accesiones (muestras) de semilla que enviará e información de contacto.
2. El Responsable del Laboratorio de Recursos Genéticos Agrícola Forestal, sección: Semillas Ortodoxas o de *in vitro* y Crioconservación de Tejido Vegetal enviará al usuario la siguiente documentación, la cual deberá ser completada y entregada/enviada junto con las accesiones a depositar:
 - a) Solicitud de resguardo, la cual contiene información general de envío.
 - b) ES-SO-R/018 Datos pasaporte (Formato de datos pasaporte en Excel para su llenado).
 - c) ES-SO-DI/002 Guía para el embalaje y envío de material
 - d) ES-SO-DI/003 Guía para el llenado de los documentos



- e) CM-PI-DI-02 Guía de embalaje y envío de material, sección *in vitro* y crioconservación de tejido vegetal.
3. El usuario podrá realizar la entrega de las muestras en las instalaciones del CNRG o podrá enviarlas a través de un servicio paquetería. Los costos generados del envío serán responsabilidad del usuario.
4. Si la accesión para depósito cumple satisfactoriamente con los criterios establecidos en la evaluación documental, pre-analítica y analítica se notificará al usuario que su material será ingresado dentro de la Colección de Semillas Ortodoxas del CNRG.
5. Cuando las accesiones han sido aceptadas para depósito, el Director del CNRG enviará al usuario una carta de recepción de la o las accesiones para su depósito y/o resguardo.

Las accesiones de semillas se pueden enviar en sobres "*tipo coin*", bolsas de papel o bolsas de plástico según la cantidad de semilla o tamaño de las semillas, pueden ser enviadas en una caja de cartón sellada, además deben estar bien identificados para su correcto envío, recepción y procesamiento.

En la solicitud de resguardo se hacen sugerencias de la cantidad de semillas a enviar según tamaño. Sin embargo, cuando es donación o resguardo no hay un límite para el envío de material a resguardar, ya que muchas veces las accesiones constan de poca semilla. En este caso la cantidad de semilla estará en función a su disponibilidad.

Por otra parte, en la sección *in vitro* y Crioconservación de Tejido Vegetal, una vez que esté aceptada la solicitud para la conservación del tejido, el material vegetal enviado deberá estar perfectamente sellado en viales (si es que ya se encuentra en condiciones de *in vitro*) de preferencia deben de ser de plástico para evitar fracturas en el transporte. El empaque se hará con plástico anti impacto, dentro de una caja de cartón o hielera desechable. Debidamente etiquetados todos los viales y con una hoja de referencia donde se especifique el material que se envía, procedencia, cantidad y cliente.

Las muestras no deberán pasar más de 48 h en su traslado al CNRG, es por eso que se recomienda su envío en día lunes y evitar el fin de semana o días festivos. Todo esto con el fin de no comprometer la calidad, sanidad y vitalidad de las muestras.



Si el material vegetal son varetas, deberán ser enviadas debidamente etiquetados individualmente con cinta masking tape y marcador indeleble. Las plantas madre deben ser identificadas con un documento de referencia donde se especifique el material que se envía, procedencia, cantidad y cliente. Para las varetas se recomienda rociar fungicidas de contacto, en toallas de papel y con estas envolver las muestras, con el fin de prevenir la proliferación de hongos y la contaminación.

En el caso de las semillas, los paquetes se envían selladas con seguridad; se recomienda una caja resistente y asegurar el empaque con cinta ancha para evitar que se rompa o desfonde.

Para el envío de plantas-madre se recomienda se etiqueten individualmente, si el traslado será con sustrato o tierra, deberá ser vía terrestre. Por otra parte, por vía aérea se debe sacar la planta de raíz y quitar la tierra sin causar ningún daño. Se empaquetan al igual que las varetas en toallas de papel envolviendo las muestras, con el fin de prevenir la proliferación de hongos y la contaminación.

Por último, las cápsulas de orquídeas se empaquetan en un sobre de papel con su identificación, después con plástico o burbujas de aire anti impacto. En caso de que los materiales no vengan en las condiciones de empaque sugeridas o lleguen fuera de horario de servicio del laboratorio: lunes a viernes de 8 am a 4 pm, el CNRG no se hace responsable de la calidad del procedimiento y puede rechazar el material, a menos que el cliente asuma la responsabilidad por escrito vía correo electrónico se procede con el ensayo.

Ensayos acreditados por la EMA.

El Laboratorio Agrícola-Forestal está acreditado ante la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) con el ensayo “ES-SO Evaluación de la calidad física y fisiológica de semillas” bajo la norma NMX-EC-17025-IMNC-2018 (ISO/IEC 17025:2017) relacionada con laboratorios de ensayo y calibración. Los análisis que tienen alcance en la acreditación son: análisis de pureza física, peso de mil semillas, determinación del contenido de humedad, análisis de la integridad física de semillas con el equipo de rayos X, evaluación de la germinación y evaluación de la viabilidad por el método de tetrazolio. Por lo anterior, las semillas de todas las accesiones que ingresan para resguardo al CNRG son evaluadas en cuanto a su calidad, acondicionadas, conservadas y resguardadas con los estándares de calidad.

En la sección *in vitro* y crioconservación de tejido vegetal se encuentra acreditado con el ensayo “CM-PI Conservación de tejido vegetal en condiciones de crecimiento mínimo” también bajo la norma NMX-EC-17025-IMNC-2018 (ISO/IEC 17025:2017).

Literatura consultada.

- Ahmed M, Anjum MA, Shah AH, A. Hamid. *In vitro* preservation of Pyrus germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pakistan Journal of Botany. 2010;42:1639-1650.
- Aragon-Cuevas F, De La Torre FJ. Conservación de las especies subvaloradas como recursos genéticos agrícolas. Revista Digital Universitaria. 2015;16:art37.
- Berjak P, Pammenter NW. Orthodox and recalcitrant seeds. Tropical tree seed handbook. USDA. 2002. 137-147.
- Caballero J, Casas A, Cortés L. et al. Patrones en el conocimiento, uso y manejo de plantas en pueblos indígenas de México. Revista de Estudios Atacameños. 1998;16:182-196.
- Casas A, Otero-Arnaiz A, Pérez-Negrón E. et al. *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. Annals of Botany. 2007;100:1101-1115.
- CONABIO y SEMARNAT. Cuarto Informe Nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica (CBD). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D.F. 2009.
- CONABIO. Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal: 2012-2030 2012. Disponible en: www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/EstrategiaMexConservacionVegetal.pdf. (accesado el 6 de agosto de 2020).
- Convenio sobre Diversidad Biológica (CBD). Naciones Unidas 1992. 1992:30.
- Convention on Biological Diversity (CBD). The Strategic Plan for Biodiversity 2011-2020 and the Aichi Biodiversity Targets. 2010. Disponible en línea en: <https://www.cbd.int/sp>.
- Cruz E. J. y Gómez LA. 2017. Conservación *in vitro* de *Gmelina arborea* Roxb. ex Sm. en condiciones de crecimiento mínimo. XIII Congreso Mexicano de Recursos Forestales. Linares, N. L.
- Cruz EJ, Gómez LA, Pichardo JM. Conservación de material vegetal de caobilla (*Swietenia humilis* Zucc.) a mediano plazo por el método

- de crecimiento mínimo. VI Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UAT. Tlaxcala, México. 2019.
- De la Torre SJF, González SR, Cruz GEJ, Pichardo GJM, Quintana CM, Contreras TAR, Cadena IJ. Crop Relatives in Mexico: an overview of richness, importance and conservation status. *In: North American Crop Wild Relatives, Volume 1. Conservation Strategies* (Greene SL, Williams KA, Khoury CK, Kantar MB, Marek LF, eds.). Springer International Publishing AG. U.S.A .2018:63-96.
 - Domínguez MS, González M, Rosales C, Quiñones C, Delgadillo S, Mireles SJ, Pérez EM. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y Ciencia*. 2008;16:53-62.
 - Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2004;40:427-433.
 - FAO. Plan de Acción Mundial para la Conservación y la Utilización Sostenible de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura y la Declaración de Leipzig. 1996. 64.
 - FAO. The State of the World's Forest Genetic Resources. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 2014:291.
 - FAO/IPGRI. Normas para Bancos de Genes. FAO y el IPGRI, Roma, Italia. 1994.
 - González-Santos R. Diagnóstico y análisis de pertinencia de las políticas públicas en relación con los recursos fitogenéticos en México. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí, México. 2016:175.
 - Harlan JR. Agricultural origins: centers and noncenters. *Science*. 1971;174:468-74.
 - International Seed Testing Association (ISTA). International Rules for Seed Testing. Rules 2017.
 - Martínez-Meyer E, Sosa-Escalante JE, Álvarez F. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2014;85:S1-S9.
 - Molina JC, Córdova TL. (eds). Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura: Informe Nacional 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. Chapingo, México. 2006;172.

- Niino T, Arizaga MV. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. *Breeding Science*. 2015;65:41-52.
- Niino T, Matsumoto T, Yamamoto S, Maki S, Tanaka D, Engelmann, F. Manual of cryopreservation Methods using Cryo-plate. Plant tissue Culture and Cryopreservation Group. 2017;6-26.
- Niino T, Yamamoto SI, Fukui K, Martínez CRC, Arizaga MV, Matsumoto T, Engelmann F. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plates. *CryoLetters*. 2013;34:549-560.
- Perales HR, Aguirre JR. Biodiversidad humanizada. *In: Conocimiento actual de la Biodiversidad, Capital Natural de México*. CONABIO México. 2008;565-603.
- Pérez MB, Esparza MJ, Pérez RME. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2012;35:279-287.
- Pichardo-González JM, Quintana-Camargo M, Cruz-Cárdenas CI, Torres-García E, Román-Martín MR. Técnicas de laboratorio utilizadas para el análisis de calidad y conservación de semillas de tomate de cáscara. Publicación especial Núm. 3. Centro Nacional de Recursos Genéticos. CIRPAC-INIFAP. Tepatitlán de Morelos, Jal. México. 2018:65.
- Rai MK, Jaiswal VS, Jaiswal U. Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm Exchange. *Scientia Horticulturae*. 2008;118. 33-38.
- Rao NK, Hanson J. Dulloo ME, Ghosh K, Novell D, Larinde M. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia. 2007.
- Rayas A, Mederos V, García M, López J, Cabrera M, Ventura J, *et al.* Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal*. 2002;2:249-251.
- Rayas A, Cabrera M, Santos A, Basail M, López J, Medero V, Beovides Y. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2013;15:167-171.
- Roberts EH. Predicting the storage life of seeds. *seed science and technology*. 1973;1:499-514.

- Sakai A. Survival of the twig of Woody Plants at- 196° C. Nature, 1960;185:393-394.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus Sinensis* Osb Var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification, Plant Cell Report. 1990;9:30–33.
- Sánchez-Chiang N, Jiménez VM. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía Mesoamericana. 2010;21:193-205.
- Sarukhán J, Koleff P, Carabias J, Soberón J, Dirzo R. Llorente-Bousquets J, De La Maza J. Capital natural de México: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Síntesis. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2009;100.
- Souza FVD, Soares TL, Cabral JRS, Reinhardt DH, Cardoso JL., Benjamin DA. Slow-growth conditions for the *in vitro* conservation of pineapple germplasm. ISHS Acta Horticulturae 2006;702:41-45.
- Srivastava M, Purshottam DK, Srivastava AK, Misra P. *In vitro* conservation of *Glycyrrhiza glabra* by slow growth culture. International Journal of Bio-Technology. 2013;3:49-58.
- Watt M, Thokoane N, Mycock D, Blakeway F. *In vitro* storage of Eucalyptus grandis germplasm under minimal growth conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000;61:161-164.
- World Resources Institute, EarthTrends. Disponible en: http://pdf.wri.org/wrr05_full_hires.pdf
- Yamamoto SI, Rafique T, Priyantha WS, Fukui K, Matsumoto T, Niino T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. CryoLetters. 2011;32:256-265.



Capítulo 6

El Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos

Lily Xochilt Zelaya Molina, Noemí Yael López Cordero, Hugo Alberto Zaldívar López, Juan Lara Aguilera, Miguel Salas Morán, Ismael Fernando Chávez Díaz, Ramón Ignacio Arteaga Garibay
Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP.
zelaya.lily@inifap.gob.mx

Introducción.

Los recursos genéticos microbianos son incalculables e indispensables para el mantenimiento de los ecosistemas del planeta, debido a que están involucrados en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida, como los de nitrógeno, carbono, potasio, etc. (Philippot *et al.*, 2005; Jha y Subramanian, 2016; Rubin-Blum *et al.*, 2019). Además, son imprescindibles para cualquier organismo multicelular, al participar de forma benéfica e inherente en sus funciones vitales, como es el caso de los microorganismos de la filósfera y rizósfera de las plantas, y aquellos miembros de la microbiota del tracto digestivo y piel de animales, en ambos casos participan en la protección contra radicales libres, adquisición de nutrientes, entre muchas otras actividades (Ezenwa *et al.*, 2012; Weyens *et al.*, 2015; Gopal y Gupta, 2016; Berry y Loy, 2018).

En la actualidad, esto ha generado que los recursos genéticos microbianos se consideren indispensables para el desarrollo de los sectores agrícola, pecuario, forestal, farmacéutico, industrial, alimentario, entre otros, de México y todo el mundo. Es el caso de cepas microbianas que se emplean en bioinsumos para el desarrollo sustentable del campo agrícola y recuperación de suelos forestales (Herrmann y Lesueur, 2013), microorganismos que modifican los patrones de digestión del ganado bovino (Hamilton-Miller, 2003), bacterias acidolácticas que mejoran la calidad de los ensilados (Broberg y col., 2007), actinobacterias productoras



de metabolitos secundarios que son antibióticos, antifúngicos o anticancerígenos que se utilizan en el desarrollo de medicamentos (Manivasagan *et al.*, 2016), cepas de levaduras empleadas en la producción de bebidas alcohólicas (Jung *et al.*, 2012), bacterias fermentadoras implicadas en procesos de fermentación de alimentos y bebidas a base de agua o leche (Leroy y De Vuyst, 2004; Widyastuti y Febrisiantosa, 2014), etc. Desde las primeras implementaciones del aprovechamiento de estos recursos, la prioridad siempre ha sido el beneficio de la humanidad.

Considerando la relevancia de todos estos recursos genéticos, el Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos del CNRG-INIFAP ha implementado diversas estrategias y metodologías para la obtención, evaluación, caracterización, cuantificación, identificación, criopreservación y liofilización de organismos y/o comunidades microbianas, principalmente de cepas o comunidades microbianas de importancia en la seguridad alimentaria del país.

Aislamiento, selección y caracterización de microorganismos.

Las técnicas de aislamiento de microorganismos se eligen con base en la naturaleza del ambiente de interés, las características del microorganismo deseado y su densidad. Cuando la densidad microbiana es alta, se emplean técnicas como diluciones en serie, estría cruzada o vaciado en placa; cuando la densidad es baja se puede emplear la técnica de impronta. La selección del medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo dependerá de sus características metabólicas, esto es: productores de ácidos orgánicos, enzimas amilolíticas, proteolíticas o quitinolíticas, degradadores de sustratos poco solubles o tóxicos, resistentes a condiciones extremas de pH, temperatura, presión osmótica, etc. La siembra del microorganismo en los medios adecuados se realiza por diversas técnicas: agotamiento, aislamiento o estría cruzada; en cuadrantes; masiva y punción (Hernández *et al.*, 2003).

Las características que se consideran para el aislamiento y selección de cepas es su morfología colonial y microscópica, estabilidad genética, tipo de cultivo, requerimientos nutricionales y de oxígeno, productividad, rendimiento, facilidad de recuperación, entre otros (Maldonado *et al.*, 2007). En ciertas ocasiones, para el aislamiento del microorganismo deseado se realiza un cultivo de enriquecimiento previo, para que prolifere el microorganismo de interés e impedir el desarrollo del resto de



poblaciones, controlando los factores nutricionales y ambientales y considerando aspectos visibles como morfología colonial y microscópica, halos de vire de indicadores de pH, halos de hidrólisis de sustratos o inhibición de microorganismos de prueba.

La caracterización implica describir la morfología microscópica y macroscópica, la determinación de la actividad metabólica del microorganismo y su comportamiento frente a diferentes condiciones, ya que diversos factores físicos y químicos pueden modificarla, y se mide por ejemplo: la producción de biomasa, el tiempo de crecimiento, la resistencia a metabolitos secundarios o a sustancias que pueden ser antimicrobianos o bacteriostáticos, la actividad enzimática, resistencia a cambios de pH y temperatura, producción de metabolitos que interfieren (Porres y Ruíz, 2018). Otras técnicas que pueden facilitar la caracterización o hacer estudios de inferencia fenotípica, son técnicas de genotipificación como RAPD, BOX-PCR, SSR e ISSR.

Determinación y cuantificación de microorganismos.

Existen varias estrategias para contabilizar a los microorganismos en muestras ambientales o de cualquier procedencia. El método de conteo en placa por plaqueo consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 100µl de cada dilución en una caja de Petri; las cajas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento; este método tiene un buen límite de detección, pero consume tiempo para hacer las diluciones y realizar los plaqueos (Baker, 1990). La determinación del Numero Más Probable (NMP), se aplica en bacterias que son difíciles de aislar, pero que se pueden detectar por la actividad metabólica que presentan, como bacterias fijadoras de nitrógeno y coliformes (Karp, 1991).

En la metodología de vaciado en placa, 1 ml de cada una de las diluciones seriadas se añade a las cajas de Petri, inmediatamente se vacía el medio de cultivo a punto de gelificar (45 °C). El goteo en placa consiste en colocar 20 µl de cada una de las diluciones seriadas en medio de crecimiento y contar el número de colonias presentes después del tiempo de incubación. Una metodología más económica es el goteo en placa 6x6, aquí las diluciones seriadas se colocan en una placa multipozos y se



inoculan en el medio con ayuda de una pipeta multicanal, por lo que se procesan seis muestras a la vez (ICMSF, 1984).

Análisis microbiológicos.

Este ensayo determina el riesgo para la salud animal o humana de los microorganismos de una muestra, estableciendo una aproximación a la presencia y concentración de mesofílicos aerobios, hongos, levaduras, coliformes totales y fecales, así como cepas de *Enterococcus*, *Salmonella* y *Staphylococcus*. Los grupos de bacterias coliformes totales y fecales se determinan por la técnica de NMP; se como prueba presuntiva y después se evalúa si los cultivos contienen coliformes fecales (IMViC) (MacFadin, 2002; NMX-EC-17025-IMNC-2006, Feng *et al.*, 2012). El método para la determinación de *Salmonella* se basa en cinco etapas básicas: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, selección en medios sólidos, identificación bioquímica, y serotipificación, descritas previamente en varias normas oficiales nacionales e internaciones, así como diversas publicaciones científicas (MacFadin, 2002; NMX-EC-17025-IMNC-2006, Feng *et al.*, 2012; OMS, 2010). El método para la identificación de mesofílicos aerobios se realiza en agar nutritivo o agar tripton-extracto de levadura; las cajas de Petri ya plaqueada con las diluciones seriales se incuban a 35 °C por 48h (NOM-008.SCFI-1993).

Los hongos y levaduras se evalúan en agar papa dextrosa, tres diluciones seriadas se plaquean en las cajas de Petri que se incuban a 25 °C; después de 3-5 días se cuentan las colonias para reportar la presencia UFC/g o ml (NOM-111-SSA1-1994). Respecto a *Enterococcus*, también se utiliza la técnica del NMP, brevemente: se emplea caldo selectivo de azida dextrosa, que se inocula con diluciones hasta 10^{-7} , los tubos inoculados se incuban a 35 °C por 24-48 h. Los tres tubos más turbios se escogen para hacer un pase a medio selectivo para *Enterococcus*, después de un periodo de incubación las colonias que se observan de color café a negro y un halo café, se siembran en caldo BHI con 6.5% de NaCl y se incuban a 45 °C; el desarrollo en este medio confirma la presencia de *Enterococcus* (NOM-210-SSA1-2014). *Staphylococcus aureus* se determina al transferir la muestra y las diluciones hasta 10^{-3} en agar Baird Parker. Las cajas de Petri se incuban a 36 °C por 44-48 h. Las colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, con halo claro, se seleccionan para realizar tinción Gram en búsqueda de



cocos Gram+, las cepas seleccionadas se evalúan con la prueba confirmativa de coagulasa en BHI (NOM-210-SSA1-2014).

Análisis de calidad microbiológica de biofertilizantes.

En respuesta a la necesidad de generar cultivos agrícolas limpios, con trazas mínimas o nulas de agroquímicos que afecten la salud humana a largo plazo y deterioren los recursos naturales, el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, recuperadores del suelo o inhibidores del crecimiento de fitopatógenos, ha generado la necesidad de implementar análisis dirigidos a evaluar la calidad microbiológica de agro-productos que contengan estos microorganismos. Los biofertilizantes comerciales comúnmente están conformados por bacterias y hongos. Los análisis de calidad comprueban la concentración e identificación de los microorganismos declarados en el producto y la inocuidad del producto.

La evaluación de calidad microbiológica consiste en la preparación de muestras y sus diluciones para aislar, purificar e identificar los microorganismos. El número de diluciones que se preparan e inoculan depende de la concentración del (los) microorganismo(s) declarado(s) en la etiqueta del producto. El aislamiento se realiza dispersando las diluciones en el medio de cultivo adecuado para cada microorganismo, incubando los medios a 28 °C, y purificando las cepas morfologías coloniales diferentes. Las cepas puras se caracterizan e identifican mediante métodos convencionales basados en la detección de características fenotípicas del microorganismo (tienen como ventaja un bajo costo y por lo tanto son más asequibles), se basan en describir características observables como morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. Adicionalmente, para la identificación de bacterias se recomiendan realizar tinciones de Gram y Schaeffer–Fulton, y las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y oxidación-fermentación (O/F).

La inocuidad de un producto garantiza que su uso no afecte la salud de usuarios y consumidores; aunque es un concepto más conocido para alimentos, también se aplica para la fabricación de medicamentos, suplementos alimenticios y productos elaborados a base de microorganismos. Entre los microorganismos de riesgo que pueden estar presentes en un biofertilizante están los microorganismos coliformes y



cepas de *Salmonella* spp. Los grupos de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*, son microorganismos indicadores de prácticas higiénicas inadecuadas que se evalúan en la microbiología de productos; el método microbiológico para hacer su determinación es la técnica de Número más Probable (NMP o diluciones en tubo múltiple) (MacFadin, 2002; Hernández-Domínguez *et al.*, 2008). Primero se determina la presencia de coliformes como prueba presuntiva, y después se comprueba si los cultivos que contienen coliformes contienen coliformes fecales y al final se confirma la presencia de *E. coli*; adicionalmente, la identificación bioquímica de *E. coli* es con las pruebas bioquímicas de Indol, Movilidad, Voges-Proskauer y Citrato (IMViC) (MacFadin, 2002; NMX-EC-17025-IMNC-2006, Feng *et al.*, 2012). El método para la determinación de especies *Salmonella* se basa en cinco etapas básicas: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, selección en medios sólidos, identificación bioquímica, y serotipificación, descritas previamente en varias normas oficiales nacionales e internacionales, así como diversas publicaciones científicas (MacFadin, 2002; NMX-EC-17025-IMNC-2006, Feng *et al.*, 2012; OMS, 2010).

Identificación de microorganismos por análisis filogenético.

En las últimas décadas la identificación de microorganismos por métodos fenotípicos ya no es suficiente, es necesario realizar análisis de relaciones ancestro-descendencia apoyados en técnicas de biología molecular de secuencias de uno o varios genes constitutivos (Fernández *et al.*, 2010). En el caso de procariones el gen 16S rRNA, por sus características de funcionalidad esencial, ubicuidad, propiedades evolutivas, presencia de regiones variables y regiones conservadas (adecuadas para el diseño de iniciadores universales), es el marcador molecular más utilizado para la identificación de estos microorganismos a nivel de género y en ocasiones especie (Case *et al.*, 2007). En eucariotes el marcador más empleado es la región transcrita interna (región ITS), que incluye el espacio transcrito interno 1, el gen 5.8S rRNA, y el espacio transcrito interno 2, los cuales son parte del cistrón del ADN ribosómico nuclear (Schoch *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015); esta región también contiene zonas muy conservadas y divergentes, gran número de copias dentro de cada cistrón y varios cistrones en el mismo o diferentes cromosomas; las regiones variables de esta región son las que permiten asignar el espécimen al grupo taxonómico más cercano



mediante un análisis filogenético, generalmente a nivel de género y en ocasiones de especie (Rodríguez *et al.*, 2004).

Para realizar una identificación a nivel de especie o subespecie, distinguir entre especies estrechamente relacionadas, definir clonalidad entre cepas y evaluar diversidad intraespecífica, es necesario utilizar diferentes marcadores moleculares de genes constitutivos ya sea mediante un árbol filogenético, un análisis multilocus ((MLSA/MLST, por sus siglas en inglés: multi-locus sequence analysis/typing) o un análisis de código de barras (DNA barcoding). Dependiendo del género o grupo/complejo de especies al cual pertenece el microorganismo son los genes o marcadores moleculares que se utilizarán, por ejemplo: *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, y *phaC* para el complejo de especies de *Burkholderia cepacia* (Gautam y col., 2016); *argS*, *dnaN*, *dnaQ*, *era*, *gltA*, *gyrB*, *ppnK*, *rpoB*, y *rpoD* para *Pseudomonas putida* (Ogura *et al.*, 2019); *recF*, *sucC*, *gdpD* and *yhfL* para *Bacillus thuringiensis* (Rabha *et al.*, 2018); y microsatélites en el género *Neurospora* (Corcoran *et al.*, 2014).

La técnica para la identificación molecular de microorganismos mediante el análisis de genes se basa en la amplificación y secuenciación de dichos genes a partir de DNA de un cultivo puro (Fraga *et al.*, 2004). Los fragmentos de DNA se amplifican por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos para cada gen. La amplificación se confirma al observar con una electroforesis en gel de agarosa las bandas de DNA del tamaño esperado (Poggi *et al.*, 2009). Posteriormente, los amplicones se secuencian con una reacción de PCR tipo Sanger y electroforesis capilar (Fernández *et al.*, 2010).

La edición y análisis de secuencias es el primer paso, ya con las secuencias editadas se comparan en bases de datos como GenBank, MicroSeq, rdp, etc., para obtener una base de datos de genes y después se realizan alineamientos para generar un árbol filogenético con cualquier programa que realice reconstrucciones filogenéticas (Petti, 2007; Rong y Huang, 2014). Para los análisis MLST, las estadísticas de cada locus se pueden resumir en START2, MEGA y DnaSP, la asignación de perfiles alélicos o tipos de secuencias (STs, por sus siglas en inglés: sequence types) con bases de datos de MLST, como AgdbNet MLSTdBNet, mlstdbNET, y BIGSdb; para comparar árboles filogenéticos se emplean PAUP y TreeCmp, y si es necesario definir agrupamientos basado en alelos o complejos utilizar



programas como SplitTree4, MLSTdBNet y eBURSTv3 (Maiden, 2006, Rong y Huang, 2014; Gautam *et al.*, 2016; Tsang *et al.*, 2017).

Identificación de bacterias mediante el sistema Vitek MS.

La técnica MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry, en español: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) permite la identificación de microorganismos por espectrometría de masas mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales. Lo anterior, a través de un espectro de masas específico para cada género y especie, que se compara con los espectros incluidos en la base de datos de referencia del equipo (Patel, 2015; Maldonado *et al.*, 2018). La identificación de microorganismos mediante la técnica MALDI-TOF puede aplicarse a bacterias, hongos y levaduras.

La muestra debe estar embebida en una matriz orgánica cristalizada sobre una superficie de metal, y un láser de UV 337 nm es la fuente de ionización que genera iones tras bombardear con fotones la muestra en condiciones de alto vacío. El área irradiada se calienta dando lugar a la desorción de los iones de la fase sólida a la fase gaseosa. La muestra ionizada y vaporizada crea una nube de gas entre dos electrodos, el campo eléctrico formado se emplea para acelerar la muestra hasta el detector. La separación de los iones se produce según el tiempo de vuelo, es decir, los iones más ligeros tienen mayor aceleración y llegan primero al detector, generando así un perfil específico del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), llamada también huella digital de la masa de los péptidos (peptide mass fingerprinting). Este parámetro se compara con una base de datos de espectros construida a partir de cepas de referencia del sistema VITEK®MS que posee dos configuraciones para la comparación de gráficos VITEK®MS IVD y VITEK® MS Research Use Only (RUO).

En comparación con otras técnicas de identificación, el sistema MALDI-TOF permite obtener resultados en cuestión de minutos, requiere poca muestra, es reducido el costo de reactivos y no requiere una identificación presuntiva del microorganismo.



Análisis de las comunidades bacterianas mediante secuenciación masiva.

Debido a la necesidad de estudiar a mayor profundidad la diversidad microbiana de los ecosistemas, se han desarrollado y mejorado estrategias que permiten la identificación de microorganismos cultivables y no cultivables mediante herramientas moleculares y análisis bioinformáticos, lo cual ha permitido comprender un número importante de procesos biológicos y describir nuevos *phyla* microbianos (Escalante-Lozada *et al.*, 2004; Mendes *et al.* 2011; Cordero, 2012). En el caso de bacterias, ya no es necesario cultivarlas, basta con obtener y caracterizar el DNA metagenómico para la identificación de casi el 100% de las comunidades bacterias presentes en un determinado ecosistema (Escalante-Lozada *et al.*, 2004).

La secuenciación masiva es una técnica de costo relativamente bajo con la generación de una gran cantidad de información, es una tecnología que ha revolucionado la forma de cómo se realiza la investigación en microbiología, ha pasado de un ámbito exclusivamente de laboratorio a uno computacional, con la aplicación ineludible de la bioinformática.

En la actualidad existe un gran número de plataformas para secuenciación masiva, una de ellas es la de Ion Torrent y Ion S5 (ThermoFisher), una tecnología de semiconductores que utiliza “chips” capaces de detectar cambios de pH o iones H⁺ liberados por la polimerasa tras la incorporación de un nucleótido a la cadena molde (Fujimoto *et al.*, 2014). Esta tecnología se basa en la secuenciación de bibliotecas templadas que se construyen a partir de la amplificación de fragmentos de una longitud de 400 pb de las regiones hipervariables V2, V3, V4 V6, V7, V8, V9 del gen 16S rRNA con el uso del sistema comercial 16S metagenomics (ThermoFisher) (Suárez, 2017). Los análisis bioinformáticos pueden realizarse con la plataforma IonServer (ThermoFisher) o mediante análisis de programas de análisis com QIIME en Ubuntu, entre otros.

Estrategias de conservación.

Los métodos de conservación a largo plazo son ideales para la preservación de los recursos genéticos microbianos debido a que minimizan el metabolismo de las células sin matarlas y garantizan la estabilidad genética de las cepas, los dos métodos por excelencia son la



congelación y liofilización. La conservación a largo plazo no sólo es una herramienta para la caracterización de microorganismos sin afectación de la morfología, fisiología o genética; sino que es necesaria para garantizar la investigación, docencia y aplicaciones industriales a futuro.

Para el desarrollo de cualquier método de preservación, es importante conocer el mecanismo fisiológico por el cual las células pueden soportar los procesos de desecación y congelación para reducir o detener su actividad vital, así como poder revertirla. El entendimiento de estos mecanismos permite realizar una conservación adecuada para mantener la pureza del cultivo durante todo el proceso de conservación, mantener una viabilidad de las células del cultivo del 70 al 80%, y garantizar la estabilidad genética de los cultivos.

Durante los procesos de criopreservación y liofilización, las células se someten a temperaturas tan bajas que se producen cristales de hielo tanto en la suspensión como en el interior de las células, esto induce cambios biofísicos y bioquímicos que producen diferentes daños a la célula hasta su muerte. En este sentido, el uso de agentes crioprotectores como la leche descremada, yema de huevo, glicerol, dimetilsulfóxido, polivinilpirrolidona, dextrán, etc. es crucial para reducir los efectos negativos de la nucleación del hielo, y con frecuencia se utilizan en concentraciones del 15 al 20%. La elección y concentración de los crioprotectores está en función del tipo de microorganismo. Además, se deben considerar otras condiciones como la velocidad de congelación gradual y de descongelación, en función de las necesidades específica de diversos grupos de microorganismos (García y Uruburu, 2000; Prakash y col, 2013).

Criopreservación.

La criopreservación se refiere a la preservación de materiales biológicos a temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ultracongeladores) o $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrógeno líquido). El manejo del material biológico a estas temperaturas garantiza la protección del proceso de la desnaturalización de las proteínas y el DNA; además, ralentiza el metabolismo celular. En el caso de la criopreservación en nitrógeno líquido, los crioviales pueden almacenarse sumergidos en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) o en su fase de vapor (-135 a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$).

La criopreservación es un buen método de conservación y requiere de equipos especiales y personal calificado en el manejo de sustancias



peligrosas, como el nitrógeno líquido. Además de las instalaciones necesarias para evitar fallos en el sistema que incrementen la temperatura de almacenamiento (García y Uruburu, 2000).

Liofilización.

La liofilización es un proceso mediante el cual se lleva el agua de estado sólido a vapor sin pasar por la fase líquida, esto se consigue congelando el agua libre de las células y eliminándola mediante alto vacío (García y Uruburu, 2000; Arencibia-Arrebola *et al.*, 2008). Es el método de conservación a largo plazo de bajo costo, mantenimiento y facilidad del manejo y transporte de los cultivos liofilizados; es adecuado para la preservación de la mayoría de las bacterias y algunas levaduras, que pueden sobrevivir por más de 40 años, pero no es útil para la preservación de hongos con hifas vegetativas (Prakash *et al.*, 2013; Arencibia-Arrebola, *et al.*, 2008).

El proceso consta de tres etapas, la congelación del producto para asegurar que toda el agua en su interior pasa al estado sólido, considerando las propiedades de la solución para lograr una composición fija (punto eutéctico); el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación que se logra al bajar temperatura (menor a 0 °C) y alto vacío (presión menor a 0.00603 atm); y el secado secundario por encima de los 0 °C sin romper el alto vacío, con lo que se logra remover el agua que queda ligada (humedad residual) (Arencibia-Arrebola *et al.*, 2008). La liofilización es un método más complejo que la congelación que requiere de equipo especializado (liofilizador) y de la correcta elección de crioprotectores. También se debe conocer: características fisicoquímicas del medio de suspensión, tipo de microorganismo, estado fisiológico del cultivo, condiciones del cultivo, concentración del microorganismo, atmósfera en el tubo, grado de deshidratación, temperatura durante la sublimación, condiciones de almacenamiento, entre otros (García y Uruburu, 2000; Arencibia-Arrebola *et al.*, 2008).

Conclusiones.

El Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos realiza los servicios descritos previamente, ya que cuenta con las instalaciones, equipamiento y personal capacitado para su realización. Además de desarrollar líneas de investigación involucradas a la seguridad alimentaria del país, en las que se emplean las mismas técnicas descritas.

Literatura consultada.

- Arencibia-Arrebola DF, Rosario-Fernández LA, Gámez-Menéndez R. Métodos generales de conservación de microorganismos. La Habana, Cuba: Finlay. 2008.
- Baker FJ, Breach MR. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1990:676.
- Berry D, Loy A. Stable-isotope probing of human and animal microbiome function. Trends Microbiology. 2018;26:999-1007.
- Broberg A, Jacobsson K, Ström K, Schnürer J. Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. Applied Environment of Microbiology. 2007;73:5547-5552.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. Applied Environment of Microbiology. 2007;73:278-288.
- Corcoran P, Dettman JR, Sun Y, Luque EM, Corrochano LM, Taylor JW, Lascoux M, Johannesson H. A global multilocus analysis of the model fungus *Neurospora* reveals a single recent origin of a novel genetic system. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2014;78:136-147.
- Cordero-Ramírez JD, López-Rivera R, Calderón-Vázquez CL, Figueroa-López AM, Martínez-Álvarez JC, Leyva-Madrigal KY, Cervantes-Gámez RG, Maldonado-Mendoza IE. Microorganismos asociados a la rizósfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. Rev Mex Biodivers. 2012;83: 712-730.
- Escalante LA, Gosset LG, Martínez J, Bolivar ZF. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Agrociencia. 2004;38:583-92.
- Ezenwa VO, Gerardo NM, Inouye DW, Medina M, Xavier JB. Animal behavior and the microbiome. Science. 2012;338:198-199.
- Feng P, Weagant SD, Grant MA. Manual Analítico Bacteriológico, Capítulo 4, La enumeración de *E. coli* y las bacterias coliformes. 2012.
- Fernández OA, García DC, Saéz NJA, Valdezate RS. Procedimientos en microbiología clínica. España. Seimc. 2010. ISBN-978-84-614-7932-0.

- Fraga NJ, Rodriguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández CA. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2004;56:208-213.
- Fujimoto M, Moyerbrailean GA, Noman S, Gizicki JP, Ram ML, Green PA, Ram JL. Application of Ion Torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity. *PLoS One* 2014;9:e107534.
- García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*. 2000;30:12-16.
- Gautam V, Patil PP, Kumar S, Midha S, Kaur M, Kaur S, Singh M, Mali S, Shastri J, Arora A, Ray P, Patil PB. Multilocus sequence analysis reveals high genetic diversity in clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex from India. *Scientific Reports*. 2016;6:35769.
- Gopal M, Gupta A. Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. *Frontiers of Microbiology*. 2016;7:1971.
- Hamilton-Miller JMT. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal and Antimicrobiology Agents*. 2003;22:360-366.
- Herrmann L, Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2013;97:8859-8873.
- Hernández A, Alfaro I, Arrieta R. *Microbiología Industrial*. San José, CR: EUNED. 2003;269.
- Hernández-Domínguez C, Hernández-Anguiano AM, Cháidez-Quiroz C, Rendón-Sánchez G, Suslow T. Detección de *Salmonella* y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón "Cantaloupe". *Agricultura Técnica en México*. 2008;34:75-84.
- ICMSF. *Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis Microbiológicos*. 2da edición, Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1984;1.
- Karp G. *Biología Celular y Molecular*. 2ª Ed. McGraw Hill. México. 1991; 746.
- Jha Y, Subramanian RB. Regulation of plant physiology and antioxidant enzymes for alleviating salinity stress by potassium-mobilizing bacteria. En *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture*. Springer, New Delhi. 2016. 149-162.

- Jung MJ, Nam YD, Roh SW, Bae JW. Unexpected convergence of fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters. *Food Microbiology*. 2012;30: 112-123.
- Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends of Food Science and Technology*. 2004;15:67-78.
- Li X, Xu J, He Y, Shen S, Zhu J, Shen Z. The complete nuclear ribosomal DNA (nrDNA) cistron sequence of *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal Applied Phycology*. 2016;28:663-669.
- MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA
- Maiden M.C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review Microbiology*. 2002;60:561-588.
- Maldonado C, Alvarez EL, Catellanos J. Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM). Proyecto GEM-BM “Desarrollo de capacidades para impletar en Colombia el Protocolo de Cartagena en bioseguridad – convenio de diversidad biológica”. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander VonHumboldt. Impresión ARFO. Bogotá D.C. 2007. 70.
- Maldonado N., Robledo C., Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas en Microbiología Clínica*. 2018;22:35-45.
- Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: a review. *Critical Review in Microbiology*. 2016;42:209-221.
- Mendes R, Kruijt M, Bruijn I, Dekkers E, Van Der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, *et al.* Deciphering the rhizosphere microbiome for disease suppressive bacteria. *Science*. 2011;332: 1097-1100.
- Norma Oficial Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-1993. Sistema general de unidades de medida.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos”.



- Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. "Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismo indicadores. Determinación de organismos patógenos. Método alternativo para la estimación de Enterococos fecales en agua. Técnica de tubos múltiples".
- Norma Oficial Mexicana HOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de organismos patógenos. Método de referencia para la estimación de *S. aureus*".
- FAO. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Comité de expertos de la OMS en especificaciones de preparaciones farmacéuticas. Reporte 44 Ginebra. Organización Mundial de la Salud. Serie de reportes técnicos No. 957. 2010.
- Ogura K, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T. A multilocus sequence typing scheme of *Pseudomonas putida* for clinical and environmental isolates. Scientific Reports. 2019;9: 1-7.
- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clinical Chemistry. 2015;61:100-11.
- Petti AC. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. Clinical Infectious Disease. 2007;44:1108-1114.
- Philippot L, Germon JC. Contribution of bacteria to initial input and cycling of nitrogen in soils. In Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer, Berlin, Heidelberg. 2005:159-176.
- Poggi MH, Guzmán DAM, García CP, Lagos LM. PCR universal o de amplio espectro: Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. Revista Médica de Chile. 2009;137: 1122-1125.
- Porres N, Ruiz E. 2018. Microbiología clínica. 285.
- Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation, FEMS Microbiological Letter. 2013;339:1-9.
- Rabha M, Acharjee S, Sarmah BK. Multilocus sequence typing for phylogenetic view and vip gene diversity of *Bacillus thuringiensis* strains of the Assam soil of north east India. World Journal Microbiology Biotechnology. 2018;34:103.

- Rodríguez TA, Xoconostle CB, Valdés M. Molecular ecology of ectomycorrhizal fungi. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2004;27:267-278.
- Rong X, Huang Y. Multi-locus sequence analysis: taking prokaryotic systematics to the next level. In *Methods in Microbiology*. Academic Press. 2014;41:221-251.
- Rubin-Blum M, Dubilier N, Kleiner M. Genetic evidence for two carbon fixation pathways (the Calvin-Benson-Bassham cycle and the reverse tricarboxylic acid cycle) in symbiotic and free-living bacteria. *mSphere*. 2019;4:e00394-18.
- Suárez MA. Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Especializada en Quimioterapia*. 2017;30:305-311.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceeding National Academic Science of the U.S.A.* 2012;109:6241-6246.
- Tsang AK, Lee HH, Yiu SM, Lau SK, Woo PC. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny. *Science Report*. 2017;7:1-12.
- Weyens N, Thijs S, Popek R, Witters N, Przybysz A, Espenshade J, Gawronska H, Vangronsveld J, Gawronski SW. The role of plant-microbe interactions and their exploitation for phytoremediation of air pollutants. *International Journal of Molecular Science*. 2015;16:25576-25604.
- Widyastuti Y, Febrisiantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Science*. 2014;5:435-442.

Capítulo 7

Colección de Microorganismos del CNRG INIFAP

Ramón Ignacio Arteaga Garibay, Lily Xochilt Zelaya Molina, Ismael Fernando Chávez Díaz, Noemí Yael López Cordero, Hugo Alberto Zaldívar López, Juan Lara Aguilera, Miguel Salas Morán
Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP
arteaga.ramon@inifap.gob.mx

Introducción.

Actualmente, en México se tiene el registro de 18 colecciones reconocidas por la Federación Mundial de Colecciones de Cultivo, e históricamente se han realizado esfuerzos por crear una colección de microorganismos que sea de relevancia nacional, en 1972, a iniciativa del Dr. Carlos Casas Campillo, fundador y entonces jefe del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), se inició la creación de la Colección de Cultivos Microbianos con el propósito de tener una colección de microorganismos de importancia biotecnológica, la cual además de tener la ventaja de contar con cultivos puros, se pudieran utilizar para colaborar al desarrollo de la enseñanza, ciencia y tecnología. La Colección de Cultivos Microbianos se integró formalmente en 1974 y tres años después fue reconocida y aceptada por el Centro Mundial de Datos de Microorganismos de la WFCC (WDCM). En 1994 el Dr. Carlos del Río Estrada propuso la creación del Centro Nacional de Cultivos Microbianos (CENACUMI) para la Secretaría de Salud y Asistencia (SSA), como una forma de desarrollar un Catálogo Nacional que permitiese el intercambio de cepas entre quienes manejan cultivos y colecciones microbianas de México. En el año 2000 la Colección de Cultivos Microbianos se descentralizó del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería y pasó a ser una entidad independiente dentro del esquema organizacional del

Departamento de Servicios Experimentales y Bibliográficos del CINVESTAV (Rodríguez Guzmán *et al.*, 2010).

En el año 2002 en colaboración con el Departamento Ingeniería Eléctrica del CINVESTAV, se publica el primer catálogo de cepas para consultas en línea, siendo el único en ese momento en Latinoamérica, este sistema de consulta fue denominado como Micro-500 y fue desarrollado en colaboración por Jovita Martínez, Sergio Zepeda, Juan Carlos Estrada y Sergio Chapa.

En el año 2008, la Dirección General de Vinculación y Desarrollo Tecnológico de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la Dirección del Sistema Nacional de Investigación y Transferencia Tecnológica, propusieron a un grupo de investigadores, conformar el Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM) y llevar a cabo tres objetivos (Rodríguez *et al.*, 2010):

- 1) Elaborar un diagnóstico nacional sobre el estado actual de los recursos genéticos microbianos;
- 2) Elaborar y proponer de un Plan Nacional de Acción sobre los recursos genéticos microbianos en México y, por último,
- 3) Fortalecer y desarrollar las capacidades a nivel nacional sobre recursos genéticos microbianos.

En este contexto y en el marco de las reglas de operación de los programas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el Comité Técnico Nacional de SAGARPA instruyó a la Subsecretaría de Agricultura para iniciar las actividades conducentes a la conformación del Sistema Nacional de Recursos Genéticos, proyecto del cual se derivaron los siguientes componentes (Rodríguez *et al.*, 2010):

- a) definición e integración de los mecanismos de coordinación de los tres nuevos subsistemas: pecuario, microbiano y acuícola;
- b) creación y fortalecimiento de redes del subsistema agrícola, y
- c) creación del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG-INIFAP).

En el caso particular de los microorganismos, que además de ser ubicuos y poseer una gran diversidad morfológica, ecológica, fisiológica y molecular, éstos juegan un papel integral y, a menudo, único en el funcionamiento de los ecosistemas para mantener una biosfera

sustentable y productiva. Además de ser elemento esencial en procesos industriales y biotecnológicos (Prakash *et al.*, 2013 Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). A nivel mundial existen bancos de cultivos microbianos que son repositorios de colecciones de varios microorganismos, los cuales a menudo son denominados “Bancos de Cultivos o Colecciones de Cultivos” los cuales proveen abundantes recursos a diferentes profesionistas relacionados con los microorganismos (Kirsop y Doyle, 1991). En este contexto, en el CNRG se cuenta con la infraestructura necesaria dentro del Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos para estudiar la diversidad microbiana y conservar esta diversidad a través de la “Colección de Microorganismos del CNRG” (CM-CNRG).

La Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP (CM-CNRG) (Figura 1), fue creada en el año 2012 con el objetivo de conservar germoplasma microbiano relacionado con la seguridad agroalimentaria de la población mexicana. A partir de ese momento el curado de la CM-CNRG quedó bajo la responsabilidad del Dr. Ramón Ignacio Arteaga Garibay, dando inicio a una etapa de crecimiento y diversificación de la colección, a través de programas de cooperación interinstitucional y tiene definidos los siguientes objetivos:

- Realizar investigación y desarrollo en procesos de conservación de microorganismos.
- Conservar y resguardar cepas de microorganismos a largo plazo mediante procesos de conservación *ex situ*.
- Proveer servicios relacionados con identificación, suministro, depósito y manejo de microorganismos.
- Capacitar y asesorar a profesionales de los sectores público y privado relacionados con manejo de recursos genéticos microbianos.
- Contribuir en la formación de recursos humanos de alto nivel en el campo de la conservación *ex situ* germoplasma microbiano.
- Fomentar la divulgación del conocimiento acerca de los recursos genéticos incluidos los relacionados con microorganismos.



Figura 1. Logotipo oficial de la Colección de Microorganismos del CNRG-INIFAP.

La máxima organización que representa las colecciones de cultivos es la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés), fundada en 1963, es una federación de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) y una comisión de la Unión Internacional de Ciencias Biológicas (IUBS), y tiene la responsabilidad de promover y propiciar el desarrollo de las colecciones de cultivos de microorganismos y cultivos de células (WFCC, 2010; Snell *et al.*, 1991). A nivel latinoamericano existe la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC), que surgió, a finales de los años noventa, por iniciativa de varios investigadores voluntarios dentro de diversas reuniones científicas con el fin de combinar esfuerzos para contribuir a un uso racional de los recursos genéticos microbianos en beneficio de toda la sociedad (WFCC, 2010).

Las colecciones de cultivos.

Las colecciones de cultivos tienen la tarea ser custodios de los recursos genéticos *ex situ*, y que constituyen el mecanismo por el cual se asegura la diversidad microbiana, debido a que desempeñan un papel clave en la conservación de recursos genéticamente estables (Hawksworth *et al.*, 1990). De esta manera se puede disponer de recursos microbianos mantenidos y preservados según los intereses de la comunidad científica. Las colecciones de cultivos microbianos tienen funciones básicas como: la conservación *ex situ* de organismos, custodiar recursos nacionales, suministro de recursos viables como base para el desarrollo de la ciencia, recibir depósitos sujetos a publicación y ofrecer servicios de depósito seguros y confidenciales. Además, pueden prestar servicios de identificación, de referencia taxonómica, de información y consultas profesionales, de entrenamientos e instrucción y apoyo especializado en innumerables áreas, realizar programas de investigación y establecer

bases de datos y redes de información (Hunter-Cevera y Belt, 1996, Gonzalez y Jiménez, 2013).

Definición y alcances.

La CM-CNRG es una colección gubernamental creada con el interés de mantener un repositorio de microorganismos como medio para garantizar la disponibilidad inmediata y efectiva del inventario de la diversidad genética microbiana con aplicaciones agroalimentarias. Posee la capacidad científico-técnica para garantizar la preservación *ex situ* de la diversidad de microorganismos provenientes de diferentes actividades en las industrias alimenticia, agrícola y pecuaria; así como para la oferta de servicios a escala regional, nacional e internacional.

En este sentido la CM-CNRG cumple con los objetivos y lineamientos de la Federación mundial de Colecciones de Cultivo (WFCC siglas en ingles) y cuenta con el número de registro 1006 del Centro Mundial de Datos de Microorganismos de la WFCC (WDCM siglas en ingles), además también cuenta con el registro ante la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivo (SI-56), La Colección de Microorganismos del CNRG INIFAP (CM-CNRG) fue creada para desarrollar la estrategia de conservación del microorganismos de importancia agroalimentaria y tiene alrededor 2650 accesiones y 5000 unidades de germoplasma de microorganismos (bacterias, virus, cianobacterias, actinomicetos, hongos y levaduras) y que han sido clasificados y preservados conforme a las directrices de FAO (Beed *et al.*, 2011) en cuatro ámbitos principales (Figura 2):

- 1) Agrícola forestal: microorganismos promotores de crecimiento, productores de metabolitos, control biológico, procesos agroindustriales entre otros
- 2) Pecuario: Probióticos: biorremediación, rumen y microorganismos patógenos.
- 3) Industria alimentaria: Producción de alimentos, deterioro de alimentos y probióticos.
- 4) Alimenticios: Hongos comestibles, microalgas y proteína microbiana que incluyen bacterias, cianobacterias, actinomicetos, hongos y levaduras, entre otros.

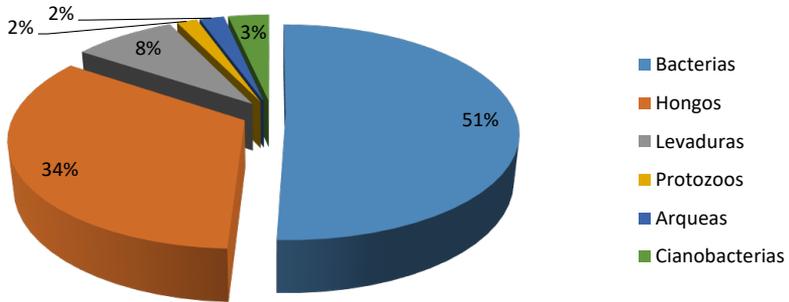


Figura 2. Distribución de los grupos de microorganismos conservados en la CM-CNRG.

Desde su creación la CM-CNRG ha experimentado un crecimiento sostenido, como resultado de los múltiples esfuerzos del SUBNARGEM y el INIFAP, por rescatar colecciones de nodos regionales y conformar una colección nacional moderna y funcional, con capacidades técnicas y científicas para responder a los compromisos regionales, nacionales e internacionales.

Estructura organizacional.

La organización del proyecto original cuenta con el financiamiento del Gobierno Mexicano a través del INIFAP, y ha servido para alcanzar los objetivos y metas iniciales del CNRG-INIFAP. Sin embargo, el crecimiento en la demanda de servicios y la necesaria diversificación de actividades del LRGM y por ende de la CM-CNRG, incluidas las actividades de identificación y caracterización de microorganismos a nivel molecular, ha llevado al establecimiento de una estructura administrativa con perspectivas de crecimiento presupuestario. La organización jerárquica para el funcionamiento de la CM-CNRG se describe en la Figura 3.

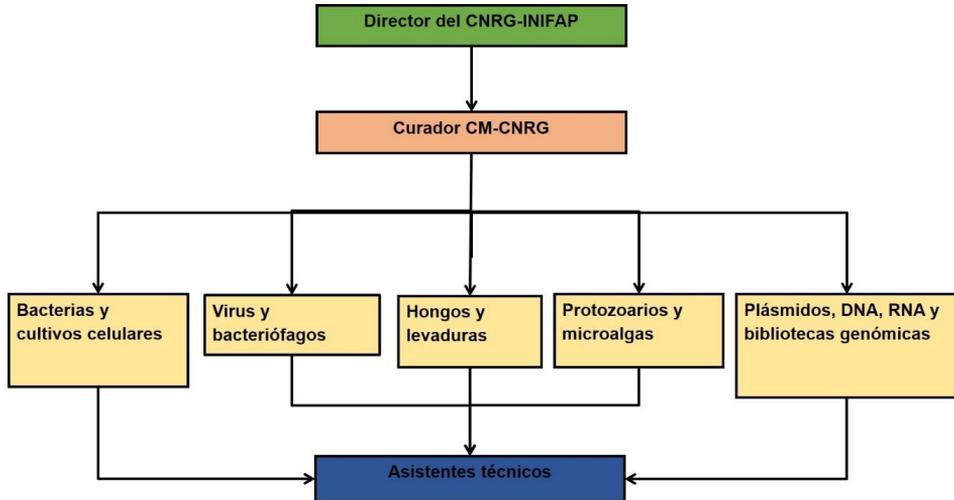


Figura 3. Esquema organizacional de la colección de Microorganismos del CNRG-INIFAP.

El manejo, el procesamiento, edición y difusión de la información sobre los microorganismos depositados en la CM-CNRG, se realiza mediante la implementación de cuatro actividades fundamentales (Parra *et al.*, 2006).

- a) Registro computarizado de la información de los cultivos que se resguardan.
- b) Edición y distribución de un catálogo impreso y electrónico.
- c) Manejo y transmisión de datos de y hacia los sistemas internacionales de registro (WDCM, FELACC, entre otros).
- d) Desarrollo y actualización de la página web de la CM-CNRG

Funciones de la CM-CNRG.

Conservación.

El Laboratorio de Recursos Genéticos Microbianos es el sector responsable de los procedimientos y desarrollo de técnicas para la preservación y almacenamiento de microorganismos que ingresan a la CM-CNRG, basados en la liofilización, ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, vitrificación y criopreservación en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cuales garantizan al máximo la estabilidad genética, una alta viabilidad y disposición inmediata. (Day *et al.*, 1995, Chase DR. 1998).



Investigación.

Uno de los objetivos de la CM-CNRG es la generación de nuevo conocimiento a través de proyectos de investigación, institucionales e interinstitucionales, relacionados con el adecuado aprovechamiento de los recursos genéticos microbianos de México.

Servicios.

Se cuenta con la capacidad e infraestructura para ofertar y cubrir servicios de identificación, suministro, depósito (público, restringido y de patente), manejo de microorganismos, análisis microbiológicos de alimentos, materias primas y otros productos, análisis de inocuidad de alimentos y evaluación sanitaria en general.

Formación de recursos humanos.

Capacitación y asesoría de profesionales de los sectores público y privado relacionados con los recursos genéticos microbianos, formación de recursos humanos de alto nivel en el campo de la conservación *ex situ* de germoplasma microbiano y fomento hacia la divulgación del conocimiento acerca de los recursos genéticos.

Colaboración y vinculación científica.

Actualmente se se colabora con una red académica y de investigación con instituciones como la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN), el Colegio de Postgraduados (COLPOS), los diferentes campos experimentales del INIFAP y otros organismos públicos y privados tanto nacionales e internacionales.

Servicios ofertados por la CM-CNRG.

La infraestructura de la CM-CNRG permite ofertar diversos servicios relacionados con la conservación de microorganismos de interés para el sector público y privado, que brevemente se describen a continuación.

Depósito público de cepas de microorganismos.

Las cepas depositadas, en esta modalidad están disponibles para la comunidad científica nacional e internacional, como acervo de microorganismos para los diferentes ámbitos, económicos, académicos, investigación y agroalimentarios etc.



Depósito restringido (cajas negras).

Éste es un servicio especial de almacenamiento a largo plazo de microorganismos donde la distribución de estos es restringida según las instrucciones del depositante. La CM-CNRC mantiene las cepas y asegura su viabilidad, la autenticidad es responsabilidad del depositante. Cualquier información relativa al depósito y la naturaleza del microorganismo depositado es tratada con absoluta confidencialidad.

Depósito de patente.

La CM-CNRC es la primera institución en México y la segunda en América Latina que cumple con los requisitos de infraestructura y equipamiento presente en el LRGM con la adquisición del nombramiento como Autoridad Depositaria Internacional (ADI) por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) bajo la regulación del tratado de Budapest sobre reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con propósitos de procedimientos de patentes. (Tratado de Budapest 1997).

Liofilización y crioconservación por solicitud.

Es un servicio que consiste en llevar a cabo la conservación de las cepas por solicitud expresa del solicitante para un número determinado de cepas ya que en muchos de los casos no cuentan con la infraestructura para realizar estos procesos de conservación.

Identificación fenotípica y genotípica de cepas.

Este servicio está diseñado para realizar la identificación confiable de microorganismos acorde a los estándares internacionales para los diferentes tipos de microorganismos, basados en métodos microbiológicos tradicionales, miniaturizados (API® y BBL® Crystal) y automatizados (espectrometría de masas) como el Vitek™ MS e incluye el empleo de técnicas moleculares, como la secuenciación parcial o total del gen 16S DNA para procariontes y de los espaciadores internos del transcrito (ITS) para eucariontes, con los que se permite la caracterización y tipificación de los diferentes grupos de microorganismos.

Distribución de cepas de referencia y certificadas.

Este servicio tiene como propósito la distribución de cepas de microorganismos denominados de referencia, mismos que se les conoce

la trazabilidad y permiten ser utilizados para la validación de procesos en el área de microbiología este tipo de cepas que son requisito indispensable como referencia para procesos de la industria alimentaria, farmacéutica e industrial según lo solicitan algunos documentos como la Farmacopea Mexicana, y el Codex Alimentario entre otros.

Análisis microbiológicos.

La infraestructura de la CM-CNRG tiene la capacidad de realizar análisis microbiológicos de alimentos, materias primas y otros productos, análisis de inocuidad de alimentos, identificación fenotípica y evaluación sanitaria en general.

Capacitación.

Las instalaciones del CNRG-INIFAP poseen un complejo académico para la impartición de cursos, seminarios, simposios y demás eventos científicos relacionados con la capacitación y formación de profesionales de alto nivel.

Estrategias de conservación en la CM-CNRG.

Para realizar cualquier método de conservación, es importante conocer el mecanismo fisiológico por el cual las células pueden soportar los procesos de desecación y criopreservación, denominado anabiosis. (Beech y Davenport, 1971, Mier *et al.*, 2002, Godínez y Calderón, 2004). La anabiosis es el estado y la capacidad de los organismos de reducir o detener su actividad vital, así como, de revertirla. Las características de esta condición son:

- a) ausencia o reducción al máximo del metabolismo;
- b) preservación de su estructura por largo tiempo;
- c) ausencia de cantidades apreciables de agua libre en fase líquida;
- d) incremento en la resistencia a las condiciones extremas;
- e) capacidad de recobrar la actividad vital.

En la CM-CNRG se emplean al menos dos métodos de conservación a largo plazo; ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ultracongeladores; criopreservación y vitrificación a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido; además de la liofilización, los cuales permiten conservar la identidad genética y la viabilidad de los cultivos (Gibson y Khoury, 1986).



Conservación por congelación o criopreservación.

Las células se congelan en una suspensión líquida con un agente crioprotector como puede ser: leche, yema de huevo, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), polivinilpirrolidona (PVP), dextrán, etc. (Hatt 1980; Ertrola *et al.*, 1994) Al eliminar la disponibilidad de agua se limita el crecimiento celular, es un buen método de conservación, sin embargo, requiere de aparatos especiales y personal calificado en el manejo de sustancias peligrosas como el nitrógeno líquido. Además, existe el peligro de que algún fallo en el sistema produzca el incremento de la temperatura de almacenamiento (Day *et al.*, 1995).

Hay cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método:

1. Edad de las células
2. Velocidad en la congelación y descongelación
3. Temperatura de almacenamiento
4. Empleo de agentes crioprotectores

Conservación por liofilización.

La liofilización se consigue congelando el agua libre de las células y eliminándola mediante alto vacío, sin subir la temperatura de la célula ya que se afectaría la viabilidad del microorganismo (García y Uruburu, 2003; Arcibia *et al.*, 2008).

Es un método más complejo que la congelación y que requiere de equipo especializado (liofilizador) y la elección adecuada de crioprotectores. Sin embargo, es muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y envío de las cepas, ya que pueden ser almacenadas a temperatura ambiente (18-20 °C) (Adams, 1996, García y Uruburu, 2003)

Algunos factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización son:

1. Tipo de microorganismo
2. Concentración celular
3. Temperatura durante la sublimación
4. Grado de deshidratación alcanzado
5. Atmósfera de oxígeno en el tubo
6. Condiciones de almacenamiento



Una desventaja de la liofilización es que no todos los organismos resisten este proceso ya que su contenido de agua es alto. Algunos hongos filamentosos no se pueden liofilizar por lo tanto hay que recurrir a otros métodos (García y Uruburu, 2003 Rico *et al.*, 2004).

Existen métodos alternativos para la conservación de microorganismos que no resisten la congelación y/o sublimación, por lo que se desarrollan otros protocolos alternativos de conservación a mediano plazo en la CM-CNRG, como son:

- I. Mantenimiento en medios mínimos, limitando el crecimiento por bajas concentraciones de nutrientes.
- II. Aceite mineral, con el cual se cubre el medio de cultivo limitando la disponibilidad de oxígeno y limitando el crecimiento.
- III. Soluciones de agua destilada o solución salina estéril, que limitan la disponibilidad de nutrientes.

Control de calidad del germoplasma en la CM-CNRG.

En la admisión de las accesiones a la CM-CNRG destacan los acuerdos entre el depositario y la colección, el manejo de la base de datos de la colección, las bases establecidas para los acuerdos de transferencia de material, fichas de depósito, la disponibilidad en el catálogo público y los manuales de procedimientos para la recepción, evaluación, ingreso y manejo de cada tipo de acción.

El usuario debe solicitar el servicio de depósito vía correo electrónico, mediante un oficio dirigido al Curador de la CM-CNRG. Si la solicitud es aprobada por ambas partes, se elabora una cotización del servicio requerido para enviarla al usuario vía correo electrónico. Una vez acordadas las condiciones del servicio, el usuario envía una copia del oficio de Solicitud de servicio, así como copia de comprobante de pago del servicio, vía electrónica y solicita el formato de Depósito de Cepas, el cual se debe completar y reenviar por el usuario junto con las cepas.

Todos los paquetes con contenido microbiológico que son enviados al LRGM para su análisis y depósito, se reciben en el área de recepción de germoplasma del CNRG-INIFAP donde se realiza la inspección visual, en la cual se determina si está en condiciones adecuadas, una vez aprobado se traslada al área de cuarentena del LRGM bajo las condiciones que proporciona el usuario en la solicitud y se registra en el control de

muestras. Si las muestras no cumplen con los criterios de la inspección visual, se rechazan y se informa al usuario vía correo electrónico el rechazo de las muestras. El usuario tiene la opción de solicitar la devolución de sus muestras, en un plazo no mayor a 10 días hábiles. La devolución se realiza de manera personal en las instalaciones del CNRG. Si el plazo se vence y el cliente no recoge sus muestras, éstas se desechan de acuerdo con Manual de procedimientos para el manejo, tratamiento y disposición final de residuos biológicos.

Durante la cuarentena se revisa que toda la documentación se encuentre completa para proceder a la siguiente etapa que es el análisis de la viabilidad y pureza de la muestra, así como al de estabilidad genética, de no estar completa se le pide al usuario que la complete a la brevedad. Si se aprueban estos análisis se da paso a la comprobación de la asignación taxonómica de la cepa por medios fenotípicos y genotípicos, con esto concluyen los análisis de la cepa y, en caso de ser acreditados, se procede a hacer el depósito de la cepa dentro de la colección, asignando un código de colección y emitiendo una Carta Certificado de Depósito, lo cual permite firmar los acuerdos de transferencia de material (ATM), contratos y convenios, dando por terminado el proceso de ingreso de germoplasma a la colección.

Conclusiones.

La conservación de los recursos genéticos microbianos es una de las alternativas viables para garantizar sus aplicaciones en la agricultura y la alimentación, en este contexto la CM-CNRG ha desarrollado un papel importante en la estrategia de conservación de estos importantes recursos naturales, la visión a futuro incluye; mejorar y optimizar las actividades de conservación, documentación y caracterización, entre otras, que permitirá incorporar nuevas accesiones y mejorar los servicios existentes, ante el creciente impulso de la ciencia y la tecnología.

Literatura consultada.

- Adams GDJ. Lyophilization of vaccine in: methods in molecular medicine. 1996:167-184.
- Aguirre-Acosta CE, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. Biodiversidad de hongos en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 2014;85:76-81.

- Arencibia-Arrebola DF, Rosario-Fernández LA, Gámez-Menéndez R. Métodos generales de conservación de microorganismos. La Habana, Cuba: Finlay. 2008.
- Beech FW, Davenport RR. Isolation, purification and maintenance of yeasts. *Methods in Microbiology*. Academic Press. London. 1971;4: 153-182.
- Beed F, Benedetti A, Cardinali G, S Chakraborty S, Garrett K Halewood M. Climate change and micro-organism genetic resources for food and agriculture: state of knowledge, risks and opportunities. Commission on genetic resources for food and agriculture FAO background study paper. 2011:57.
- Chase DR. Monitoring and control of the lyophilization process using a mass flow controller. *Pharmaceutical Engineering*. 1998;94-98.
- Day J. McLellan MR. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Humana Press. 1995.
- Ertola R, Yantorno O, Mignone C. *Microbiología Industrial*. Buenos Aires. 1994
- García LMD, Uruburu FF. La conservación de cepas microbianas. *Revista Actualidad SEM*. 2003;30:12-16.
- Gibson LF, Khoury JT. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Letter in Applied Microbiology*. 1986;3:127-129.
- Godínez S, Calderón M. Conservación de los hongos filamentosos en agua destilada. *Alimentaria*. 2004;1:85-88
- González DM, Jiménez JN. Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiológicos*. 2013;4:23-33.
- Hatt, H. (ed.) *American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying*. American Type Culture Collection. Rockville. 1980.
- Hawksworth DL, Sastramihardja I, Kokke R, Stevenson R. Guidelines for the Establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. WFCC Standards Committee. UK: Simworth, Press, Richmond, Surrey; 1990.
- Hunter-Cevera JC, Belt A. Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press, London. 1996.
- Kirsop B.E. and Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. Second edition, 1991. Academic Press - ISBN 012-410351-0. 1991.

- Mier T, Toriello C, Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. UNAM. 2002. 90.
- Parra, HSL, Perez CMM, Bernal MM, Moreno SZ, Montoya CD. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). 2006.
- Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiology Letters. 2013;339:1-9.
- Rico M, Piattoni CV, Gonzalez C, Monela R, Latorre MG, Lura MC. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas por diferentes métodos. Revista FABICID. 2004;81:163-172
- Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón A, Alatorre-Rosas R, Almaraz JJ, Arteaga-Garibay RI, Ferrera-Cerrato R, Gamboa-Angulo MM, et al. Diagnóstico Nacional de sobre los Recursos Genéticos Microbianos de México. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Colegio de Postgraduados. México, D.F. 2010:161.
- Snell JJ. General Introduction to Maintenance Methods. En: Kirsop BE y Doyle A (eds.). Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2da edición. London: Academic Press; 1991:21-30.
- Tratado de Budapest. 1997. Acuerdo internacional donde un Estado contratante que permite o exige el depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes debe reconocer, a ese efecto, el depósito de un microorganismo en una "autoridad internacional de depósito" con independencia de que dicha autoridad se encuentre dentro o fuera del territorio de dicho Estado. Disponible en: <https://wipolex.wipo.int/es/text/283785>
- WFCC. World Federation of Culture Collection 2010 Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures microorganisms, 3rd ed, WFCC Executive Board, Japan



Capítulo 8 Caracterización genotípica y diversidad de los recursos genéticos

Luis Felipe Guzmán Rodríguez, Carlos Iván Cruz Cárdenas
Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP
guzman.luis@inifap.gob.mx

Introducción.

La conservación de la diversidad de los recursos genéticos contribuye con el fortalecimiento de la seguridad alimentaria de la población. A través del conocimiento de la biodiversidad de las especies agropecuarias, los curadores y mejoradores llevan a cabo el uso racional y sustentable del germoplasma.

Tradicionalmente, la diversidad ha sido explorada de manera fenotípica, no obstante, los distintos tipos de ambiente a la que los cultivos o animales son expuestos tienen influencia sobre las características morfológicas, además, en ocasiones se tiene que esperar a la aparición de ciertos caracteres dependientes de la etapa fenológica o de crecimiento. Con el desarrollo e implementación de las nuevas tecnologías de caracterización genotípica, es posible emplear marcadores moleculares para conocer la diversidad genética de las especies, entre y dentro de las poblaciones, con la ventaja de ser independientes del ambiente e identificados en cualquier etapa de desarrollo, incluso en semillas, embriones o células germinales. Conocer la diversidad genética a través de la caracterización genotípica permite optimizar recursos en los bancos de germoplasma *in situ*, *ex situ* e *in vitro* dentro de las actividades de conservación.

En este capítulo se presentan algunos procesos recomendados para caracterizar genotípicamente los recursos genéticos a conservar en los bancos de germoplasma.



Aislamiento y control de calidad de ácidos nucleicos.

La extracción y purificación de ácidos nucleicos es requerida para una gran variedad de aplicaciones en biología molecular, como la caracterización genotípica, la secuenciación de genes y genomas, la identificación de mutaciones y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), el análisis de metilación de DNA y los análisis de diversidad genética.

Los protocolos de extracción y aislamiento constituyen el punto de inicio para análisis genéticos y genómicos enfocados en resolver problemas, así como para investigación en diversas ramas de la biotecnología. Los ácidos nucleicos se aíslan directamente de tejidos frescos, secos y liofilizados. Experimentalmente, el DNA es la biomolécula más utilizada en diversas técnicas de biología molecular, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), digestión con endonucleasas de restricción, librerías genómicas, técnicas de secuenciación masiva y microarreglos, entre otros.

Generalmente, un protocolo de aislamiento exitoso de ácidos nucleicos requiere de cuatro pasos importantes: ruptura efectiva de las células, desnaturalización de complejos de nucleoproteínas, inactivación de las DNAsas y RNAsas y eliminación de contaminantes (Ali *et al.*, 2017; Rodríguez y Rizo, 2011). Los ácidos nucleicos, deben de estar libre de proteínas, carbohidratos y lípidos, ya que la pureza afecta directamente los resultados de metodologías posteriores (Cseke *et al.*, 2011).

A diferencia del DNA, el RNA es transitorio, frágil, elusivo y difícil de recuperar. Derivado de la inestabilidad molecular del RNA, es necesario tener precaución durante la extracción, debido a la alta susceptibilidad de degradación enzimática. Los métodos más comunes combinan la separación de biomoléculas de acuerdo a su polaridad mediante extracción orgánica y precipitación de biomoléculas mediante adición de alcoholes, seguido de aislamiento con solventes para descartar contaminantes. Un ejemplo, es una solución de fenol y cloroformo para eliminar proteínas y lípidos y de esta manera lograr la precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol o etanol, dado que los ácidos nucleicos son insolubles en altas concentraciones de sal y alcohol. El DNA precipitado forma unas finas hebras blancas, mientras que el resto de las sustancias permanecen disueltas (Herráez, 2012).



En el estado actual del conocimiento, contar con una técnica efectiva para el proceso de extracción de ácidos nucleicos es un paso crítico en todos los estudios de genética molecular. Contar con protocolos rápidos, fiables y de bajo costo para la extracción de DNA y RNA resulta siempre deseable. El DNA/RNA extraído de tejidos de algunas especies, suele estar degradado o contaminado por aceites esenciales, polifenoles, polisacáridos y proteínas. En particular éstos compuestos dificultan la extracción y purificación de los ácidos nucleicos. Estos compuestos interfieren al precipitar junto con los ácidos nucleicos, por lo tanto, reducen la calidad y rendimiento.

El control de calidad es importante en las pruebas basadas en ácidos nucleicos. A medida que las tecnologías de detección molecular se vuelven cada vez más sensibles. El control de calidad del ácido nucleico generalmente incluye aspectos cuantitativos y cualitativos. Los parámetros de control generalmente incluyen concentración, pureza, integridad y funcionalidad de los ácidos nucleicos (Guzmán *et al.*, 2018).

En ensayos de biología molecular como la técnica PCR, la cuantificación de la concentración del ácido nucleico en solución es esencial para obtener resultados precisos y confiables. La concentración del ácido nucleico se puede evaluar utilizando cuatro métodos diferentes: medición de la densidad óptica por absorbancia, electroforesis en gel de agarosa, espectroscopía de fluorescencia con colorantes fluorescentes de unión al DNA o sistemas de electroforesis capilar basados en microfluidos. Los dos métodos más utilizados son por espectroscopia de fluorescencia y espectrofotometría ultravioleta/visible (UV/VIS).

Los métodos basados en fluorescencia se caracterizan por una alta sensibilidad, a niveles de concentración en pg/mL, pero, requieren pasos adicionales de manejo inicial, como la incubación de muestras con colorantes fluorescentes apropiados, así como la creación de curvas estándar usando cantidades conocidas de ácido nucleico. Además, estos métodos no necesariamente proporcionan información sobre las posibles impurezas presentes en las muestras, lo que puede afectar los pasos posteriores. La determinación de la concentración de ácidos nucleicos por espectrofotometría UV/VIS es probablemente, el método más fácil de realizar y se ha implementado como un procedimiento operativo estándar en muchos laboratorios. Este método se basa en el hecho de que los

anillos heterocíclicos de los nucleótidos retienen la luz UV con una absorción máxima a 260 nm de longitud de onda. La aplicación de la Ley Lambert-Beer permite relacionar la cantidad de luz absorbida con la concentración del analito medido.

Por otra parte, los ácidos nucleicos con pureza baja pueden conducir a una amplificación insuficiente y bajo rendimiento, lo que puede resultar en falsos negativos. El análisis espectrofotométrico de la muestra permite la detección de impurezas potenciales, debido a que muchos compuestos químicos tienen perfiles de absorbancia característicos entre 220 y 230 nm de longitudes de onda, mientras que las proteínas típicamente muestran un máximo de absorción a 280 nm como resultado de los aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, las relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ se calculan con frecuencia y se usan como una medida de la pureza de los ácidos nucleicos. Valores de la relación $A_{260/280}$ entre 1.8 a 2.0 son generalmente aceptadas como indicadores de DNA y RNA de alta pureza, mientras, los valores esperados de la relación $A_{260/230}$ están comúnmente entre 2.0 a 2.2 (Guzmán *et al.*, 2018).

No obstante, se deben considerar una serie de factores al usar la espectrofotometría UV/VIS para evaluar la cantidad y calidad de ácido nucleico. En primer lugar, las relaciones de absorbancia indicadas proporcionan una métrica ambigua, ya que se ha demostrado que pueden producirse desviaciones significativas como resultado del método de extracción específico aplicado, los cambios en el pH y la concentración de sales (Chomczynski y Sacchi, 2006). En segundo lugar, varios contaminantes potenciales como los reactivos que contienen fenol o el isotiocianato de guanidina contribuyen significativamente a la absorción a 260 nm y pueden causar una sobreestimación de la concentración de ácido nucleico (Guzmán *et al.*, 2018). Además, la medición de absorbancia convencional no es capaz de discriminar entre los diferentes tipos de ácido nucleico (DNA de doble cadena, DNA de cadena simple, RNA), lo que también puede resultar en una cuantificación excesiva del ácido nucleico de interés, ya que todos los nucleótidos presentes en una muestra absorben la luz a 260 nm de longitud de onda.

La comprobación de la integridad es un paso esencial para verificar que el DNA aislado es de alto peso molecular. Para una resolución adecuada de



los marcadores moleculares, el DNA genómico debe migrar como una banda compacta de peso molecular mayor o igual a 40 kb. No obstante, es inevitable la degradación de una parte del DNA aislado (Guzmán *et al.*, 2018). Por otra parte, los inhibidores de PCR son compuestos químicos utilizados durante el procedimiento de purificación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, sales, fenol, etanol, proteínas y otras impurezas residuales derivadas del material de la muestra original. La presencia o ausencia de inhibidores de PCR determina el atributo funcionalidad de los ácidos nucleicos y se realiza a través de la amplificación de un gen de referencia de la especie en estudio mediante PCR punto final (Guzmán *et al.*, 2018).

Marcadores moleculares en la caracterización genotípica.

Actualmente, existen metodologías para analizar las diferencias a nivel de DNA. Los marcadores moleculares son marcas o puntos de referencia dentro del genoma identificados mediante técnicas moleculares y la información obtenida se utiliza para conocer la diversidad genética entre individuos y poblaciones (Mohler y Schwarz, 2008).

Dichos marcadores son sitios o *loci* en el DNA que pueden diferenciar a dos o más individuos y son heredables de generación en generación. Por tanto, un marcador molecular es un sitio o fragmento de DNA polimórfico que permite distinguir entre diferentes grupos taxonómicos, nivel de especie o subespecie, poblaciones, familias o individuos.

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo y se aplican usando a todo el individuo o sólo parte de él. Se habla de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana, por lo que es importante destacar que no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos.

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además, se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad, existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta. Los diferentes tipos de



marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante, es decir, uno o algunos de sus alelos son expresados, o codominante, todos sus alelos son expresados (Alcántara, 2007).

La importancia de los marcadores es la posibilidad de estudiar la diversidad genética de poblaciones de especies de organismos y seleccionar los que presentan rasgos de interés para su aprovechamiento. En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar individuos aún antes de la expresión del rasgo de interés. Cabe mencionar que debido al empleo de marcadores ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación mundial.

Los distintos tipos de marcadores moleculares hoy disponibles pueden ser distinguidos por la tecnología que se utiliza para revelar la variabilidad del DNA. Los marcadores varían en cuanto a su capacidad para detectar diferencias entre los individuos, sus costos de aplicación, facilidad de uso, consistencia, capacidad múltiple y de repetición. De manera general, los marcadores genéticos se pueden clasificar en citogenéticos, bioquímicos y los basados en DNA, que a su vez se agrupan, según el método de identificación, en: a) los de clonación, obtención de fragmentos idénticos de DNA a partir de una misma secuencia original y de secuenciación, determinación del orden de bases nucleotídicas en fragmentos de ácidos nucleicos y b) los de impresión única o huella digital genética (fingerprinting), utilización de pequeñas secuencias de DNA variables entre individuos.

Un marcador molecular debe ser capaz de discriminar diversos alelos, las diferentes versiones de un mismo gen o *locus* y sea útil para detectar polimorfismos en el mayor número posible de *loci* al mismo tiempo en una única reacción. Gran parte de los estudios que utilizan marcadores moleculares pueden ser considerados como estimaciones de la historia evolutiva de los organismos, debido a que se están evaluando las relaciones filogenéticas, de parentesco, desde diferentes niveles jerárquicos.

Estas relaciones pueden valorarse desde niveles micro hasta macroevolutivos, con la siguiente escala: a) identidad genética, como en organismos de reproducción clonal (partenogenéticos), b) parentesco

(parental, padres a hijos), c) afinidad genética dentro de un grupo local o población, d) diferenciación entre poblaciones o subespecies, e) diferenciación entre especies y f) estructura filogenética en la evolución de los seres vivos.

Caracterización genotípica de los recursos genéticos.

Actualmente, existen varias metodologías para la caracterización genotípica. La mayoría se basan en el uso de marcadores moleculares, tienen como objetivo caracterizar el germoplasma y poder realizar los análisis comparativos o parámetros relacionados con la diversidad genética. La caracterización genotípica se realiza mediante los marcadores moleculares siguientes:

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los SNPs se originan de mutaciones puntuales. Son variaciones en la secuencia del DNA que ocurren por el cambio en un nucleótido: adenina, guanina, timina o citosina. Los SNPs son evolutivamente estables porque no cambian de una generación a otra y son muy abundantes en los genomas, lo que facilita los estudios de poblaciones (Mohler y Schwarz, 2008). También, los SNPs tienen elevada facilidad de análisis porque existen varias técnicas para identificarlos y actualmente se utilizan métodos automatizadas a gran escala.

Microsatélites. Los microsatélites o SSR (por sus siglas en inglés, simple sequence repeats) son secuencias cortas y repetidas de 2 a 10 nucleótidos de longitud. Los microsatélites típicos son dinucleótidos AT repetidos en tándem de cinco a veinte veces. El polimorfismo de este tipo de marcadores deriva de la cantidad de veces que se repite su matriz (Mohler y Schwarz, 2008).

El diseño de iniciadores se realiza para la hibridación en regiones flanqueadoras a los SSRs y de esta manera, discriminar las variantes alélicas. El procedimiento se lleva a cabo mediante amplificación por PCR y después, se separan los fragmentos obtenidos de acuerdo al tamaño, por electroforesis de ácidos nucleicos sobre geles de agarosa o poliacrilamida. Los SSRs son marcadores codominantes, es decir, se distinguen los individuos heterocigotos de los homocigotos dominantes. Normalmente



son marcadores neutros porque se encuentran en regiones no codificantes.

DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), por sus siglas en inglés, *Random Amplified Polymorphic DNA*. En este tipo de marcadores se diseñan iniciadores de secuencia aleatoria y corta de 10 a 16 nucleótidos. Con cada par de iniciadores se realiza una amplificación por PCR a una temperatura de alineamiento baja entre 35 a 40 °C y después se separan los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa (Mohler y Schwarz, 2008). Los RAPDs son útiles cuando no existe información previa del genoma disponible. Debido a la longitud corta de los iniciadores, se obtienen cientos de sitios de hibridación en el genoma. Cuando los iniciadores hibridan en una orientación complementaria se produce amplificación de lo contrario no se obtendrá producto amplificado. En plantas han sido ampliamente empleados mientras en animales el uso es menor. De manera general, los RAPDs dan a lugar de 5 a 20 bandas, pero, no son muy específicas, es decir, varían según las condiciones de cada experimento.

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*. A finales de los años 80, los marcadores moleculares más usados fueron los RFLPs. Durante el procedimiento, el DNA se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis y se transfieren a un filtro de nylon. Luego, el DNA digerido se hibrida con una sonda radiactiva. Como resultado, se observan diferentes patrones de bandas entre individuos. A diferencia del resto de los marcadores moleculares, este tipo de marcador no utiliza la amplificación de *loci* por PCR (Mohler y Schwarz, 2008).

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), por sus siglas en inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism*. Con el empleo de AFLPs se disminuyen las limitaciones prácticas de otras técnicas, por ejemplo, la falta de robustez y repetitividad de los RAPDs o la gran cantidad de DNA necesario para los RFLPs. Son parecidos a los RFLPs, pero se usa amplificación por PCR. Se realizan dos rondas de PCR con iniciadores anidados. En la primera ronda de PCR se usan iniciadores



universales y en la segunda se usan iniciadores con extensiones específicas (Mohler y Schwarz, 2008).

Los marcadores moleculares y más recientemente, los esfuerzos de secuenciación de los genomas con altos rendimientos, han incrementado dramáticamente el conocimiento y la habilidad de caracterizar genotípicamente el germoplasma para esencialmente cualquier especie de cultivo.

Diversidad genética de los recursos genéticos.

La diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad y 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 (Rogstad y Pelikan, 2011). El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. De ahí, su conocimiento y comprensión es de gran importancia para el avance de la genética evolutiva, la salud pública, la biomedicina, la domesticación de especies, la productividad agrícola, pecuaria, pesquera y forestal, la sustentabilidad y la conservación de los recursos genéticos.

La biodiversidad de los ecosistemas es el legado de la evolución. Como tal, debemos hacer todo lo posible para preservarla, de forma que llegue intacta a las futuras generaciones en el marco de modelos sostenibles de conservación. Para llevar a cabo esta actividad, debemos recurrir a todas las herramientas y avances tecnológicos que estén a nuestro alcance. En los últimos años las tecnologías moleculares de análisis de DNA están representando una de las herramientas más precisas y específicas frente a problemas ecológicos y evolutivos. El empleo de marcadores moleculares permite identificar la variación genética existente entre individuos y entre poblaciones o especies, indicando la biodiversidad presente en un ecosistema. La diversidad genética es crítica para la conservación, ya que proporciona a las especies y a sus poblaciones plasticidad para sobrevivir ante cambios ambientales inesperados, fluctuaciones demográficas e impactos humanos. Conocer la biología de las especies, incluyendo su grado de diversidad genética, permite establecer unidades de conservación para una mejor gestión de las especies amenazadas.



La caracterización de la diversidad genética, su estructura y sus relaciones con su origen geográfico y ambiental, son fundamentales para el desarrollo de una planificación correcta e integral de la conservación. Por otra parte, la pérdida de diversidad genética reduce la capacidad de afrontar posibles alteraciones del medio ambiente, en consecuencia, disminuye la supervivencia frente a situaciones adversas. Cuando el medio ambiente experimenta cambios profundos a escalas local y global, como la fragmentación y destrucción de hábitats, invasiones, contaminación, simplificación, el efecto invernadero y el agujero de la capa de ozono, afectan a multitud de especies, por la disminución de la biodiversidad del planeta.

La variación intraespecífica es un requisito para la evolución, al ofrecer la posibilidad de diferentes respuestas a las fuerzas selectivas. Es importante disponer de una estimación de la variabilidad de la especie, la cual, puede realizarse mediante caracteres fenotípicos que resultan de fácil observación, pero están muy influenciados por el ambiente y su control genético es poco claro. Por otro lado, los marcadores moleculares permiten estudiar directamente el material genético, pero frecuentemente se trata de rasgos sin influencia aparente en el fenotipo. Por tanto, se distinguen dos tipos de variación: la diversidad neutral, es decir, aquellos rasgos no determinados por fuerzas selectivas y la variación adaptativa, constituida por los caracteres con valor adaptativo.

La diversidad neutral se estima principalmente mediante marcadores moleculares. El método clásico de estudio de la variación adaptativa son los ensayos de procedencia/progenies, en los que se analiza el grado de variabilidad y el porcentaje de ésta que corresponde a una variación genética. La base de estos estudios es ensayar distintos genotipos en un mismo ambiente con el fin de minimizar la variabilidad ambiental.

El conocimiento de la diversidad, como componente de la biodiversidad debe ser preservado, porque es una herramienta de utilidad para conocer los procesos que determinan la estructura genética de la especie considerada.

Selección de colecciones núcleo para conservación.

Alcanzar los objetivos del uso sustentable de los recursos genéticos a través de la conservación en bancos de germoplasma se realiza mediante la conservación de la mayor cantidad posible de alelos de las poblaciones por medio de la diversidad genética. Una práctica es la conservación de las



colecciones completas, no obstante, esto representa el empleo de gran cantidad de recursos para lograrlo. Una alternativa a la conservación de las colecciones completas, es la selección de colecciones núcleo (CN), las cual permite conservar la diversidad genética con la optimización de los recursos. Una colección núcleo es cantidad limitada de accesiones que representan la diversidad genética de la colección completa de germoplasma (Upahyaya, 2015). En ocasiones, las colecciones núcleo pueden estar encaminadas a representar los alelos relacionados a cierta característica de interés, como tolerancia a sequía o plagas, entre otros, no obstante, para fines de conservación el objetivo principal es la diversidad genética.

Para seleccionar una colección núcleo es necesario contar con los datos pasaporte y los resultados del análisis de diversidad genética de la colección completa. Los datos pasaporte comprenden género, especie, raza o variedad, coordenadas geográficas, entre otros. Anteriormente, el estudio de la diversidad genética se llevaba a cabo con descriptores morfológicos, con la desventaja que estos se ven afectados por el ambiente. En la actualidad, con la implementación de los marcadores moleculares, es posible determinarla con mejor precisión sin la desventaja de la influencia del medio ambiente (Jeong *et al.*, 2019).

Existen diferentes metodologías reportadas para seleccionar colecciones núcleo, cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas. Una estrategia es identificar las diferencias o distancias entre los alelos comparando cada accesión contra el resto de las accesiones con un programa bioinformático especializado. En el análisis de los resultados se identifica cierto número de accesiones de la colección núcleo completa con una serie de parámetros, y son los siguientes:

- 1) Distancia promedio de las muestras de la colección completa y de la CN más cercana (ANE), en la cual, el valor ideal es 0.
- 2) Distancia promedio entre cada muestra de la CN y la muestra de la CN más cercana (ENE). Los valores altos indican una mejor representación de los valores extremos.
- 3) Distancia promedio entre las muestras de la CN (E). Los valores altos indican una mejor representación de los valores extremos.



- 4) Homogeneidad de las medias (MD). Es el porcentaje de la diferencia de la media de la CN y la media más cercana de la colección completa. El valor ideal debe ser menor a 20.
- 5) Homogeneidad de la varianza (VD). Es el porcentaje de la diferencia de la varianza entre la CN y la colección completa. La mejor representación está dada por valores altos.
- 6) Rango de coincidencia (CR). El porcentaje del rango de coincidencia entre la colección completa y la CN no debe ser menor al 80%.
- 7) Rango variable (CV). El porcentaje del rango variable entre la colección completa y la CN no debe ser menor al 80%.
- 8) Cobertura de alelos (CA). La cobertura de alelos de la CN en relación a la colección completa debe ser mayor al 80%.

A consideración del curador responsable de la colección, es recomendable conservar al menos 80% de los alelos y que el tamaño de la colección núcleo sea aproximadamente 10% de la colección completa (Borrayo *et al.*, 2016).

Se pueden realizar varios ensayos con diferentes tamaños de la colección núcleo y comparar los resultados. En ocasiones y dependiendo de la diversidad genética de la colección completa, se pueden alcanzar valores muy altos de cobertura de alelos con un tamaño pequeño de la colección núcleo o en otras ocasiones, el tamaño de la CN debe ser mayor para evitar la pérdida de un gran número de alelos importantes para la colección.

Con los análisis de diversidad es posible identificar accesiones duplicadas en la colección y con la selección de la colección núcleo reducir los duplicados con el beneficio de reducir los recursos económicos, humanos y de tiempo derivados del manejo y mantenimiento de los recursos genéticos (Chandora *et al.*, 2020; Malhotra *et al.*, 2019).

La selección y creación de la colección núcleo no implica deshacerse de los recursos genéticos que con tanto esfuerzo y a lo largo del tiempo han sido preservados, sino la obtención de una copia de respaldo de la colección de manera *ex situ* e *in vitro* para su conservación a largo plazo, en caso de pérdidas por cambios climáticos, plagas o vandalismo.

Selección de colección núcleo de aguacate: estudio de caso.

México es el principal país productor de aguacate a nivel mundial. El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae y

existen tres razas botánicas: *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* var. *guatemalensis* L. y *P. americana* var. *americana* Mill. El aguacate por ser especie recalcitrante, su conservación se lleva a cabo por cultivo *in vitro* o criopreservación. De esta manera, la preservación en bancos de germoplasma genera que una alta cantidad de réplicas se requieran para su conservación *in vitro* o bien, el desarrollo de protocolos de crioconservación. Una alternativa es la selección y creación de colección núcleo con el fin de preservar la diversidad genética con una cantidad mínima de accesiones. Por este motivo, en el CNRG se llevó a cabo este estudio de caso (Guzmán *et al.*, 2017).

En el Campo Experimental Bajío del INIFAP se cuenta con una colección de más de 350 accesiones de aguacate mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) y otras razas botánicas. Con el objetivo de crear una colección de respaldo para conservación a largo plazo se estudió la diversidad genética y se seleccionó una colección núcleo. Se colectaron muestras de 319 accesiones de aguacate var. *drymifolia*, var., *guatemalensis*, var. *americana*, var. *costareicensis* e híbridos. El DNA de tejido foliar fue aislado y fueron estudiados 47 marcadores moleculares tipo microsatélites; al final 28 marcadores fueron utilizados en el análisis por su nivel de polimorfismo. La caracterización genotípica se realizó con la metodología de análisis de fragmentos en un secuenciador de DNA de capilares. Los microsatélites identificados se analizaron con el programa GeneMapper (Life Technologies) y se construyó una matriz de datos en Excel. La diversidad genética se estimó con los parámetros básicos de diversidad: número total de alelos, heterocigocidad observada, heterocigocidad esperada e índice de fijación a través del programa GenAlEx 6.502 (Peakall y Smouse, 2012).

La colección núcleo se seleccionó a través de la información genotípica de los marcadores microsatélites con el método PCA-*Kmeans* (Borrayo *et al.*, 2016). Los alelos monomórficos y las accesiones con datos perdidos no fueron considerados en el análisis. Se evaluaron diferentes tamaños de CN: 12, 24, 36, 48, 72 y 96 con el fin de obtener una correspondencia mayor o igual al 10% de la colección completa y alto porcentaje de alelos. De acuerdo a los parámetros 1) distancia promedio de las muestras de la colección completa y de la colección núcleo más cercana (ANE), 2) distancia promedio entre cada muestra de la CN y la muestra de la CN más cercana (ENE), 3) distancia promedio entre las muestras de la CN (E), 4)

homogeneidad de las medias (MD), 5) homogeneidad de la varianza (VD), 6) rango de coincidencia (CR), 7) rango variable (CV) y 8) cobertura de alelos (CA), las colecciones núcleo con evaluación adecuada fueron a partir de 36 individuos y más. Por el contrario, las CN con 12 y 24 individuos no obtuvieron una evaluación aceptable. En el Cuadro 1 se observan los valores de la evaluación de la CN con 36 individuos.

Cuadro 1. Evaluación de la colección núcleo con 36 individuos. (Borrayo et al., 2016).

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
ANE =	0.2192	VD =	67.8571
ENE =	0.3173	CR =	72.2067
E =	0.5833	CV =	97.6196
MD =	0.0000	CA =	0.8103

A través de este trabajo se logró identificar y seleccionar una colección núcleo de aguacate, una especie de importancia comercial y de naturaleza recalcitrante, que contiene la representación de la diversidad genética de la colección completa *in vivo* del Campo Experimental Bajío del INIFAP para su conservación a largo plazo.

La conservación de la colección completa se llevó a cabo con árboles en campo, por este motivo, la colección núcleo representa una alternativa de conservación por posibles pérdidas derivadas de situaciones inevitables como el cambio climático, plagas, enfermedades, quemaduras, entre otros. Finalmente, la colección núcleo puede preservarse en condiciones *in vitro* de crecimiento mínimo o en crioconservación a largo plazo, como una colección de respaldo.

Integridad genética de los recursos genéticos.

Los recursos genéticos constituyen el principal componente de diversidad genética en la naturaleza y estos se encuentran en uso actual o potencial, ya sea para producción o para mantener el ecosistema como un sistema en funcionamiento. La conservación de los recursos genéticos es fundamental para el éxito a largo plazo de todas las otras formas de conservación de la diversidad y es también esencial para la ordenación sostenible y productiva del ecosistema donde estos recursos se encuentran (Wehenkel et al., 2017).



Las estrategias de conservación *ex situ* e *in situ* de cualquier recurso genético deben seguir las reglas que permitan evitar en mayor medida las modificaciones a la integridad genética del germoplasma. Las estrategias de evaluación de la integridad genética actuales son las mismas que nos permiten la caracterización genotípica, es decir, el uso de marcadores moleculares como los que se mencionan en el presente capítulo.

Todas las poblaciones de una especie, aunque se encuentren distantes entre sí, tienen en común la existencia de una reserva de diversidad genética, por lo tanto, la extinción de una población conformada por varias especies poseedoras de gran diversidad genética provoca que en el ecosistema se disponga de una menor cantidad de material genético y se reduzcan las posibilidades de cambio evolutivo, disminuyendo la biodiversidad y el equilibrio de los ecosistemas. Uno de los objetivos de la conservación de recursos genéticos es preservar la integridad del acervo genético de las especies a través de la protección de variantes genéticas únicas, centros geográficos de variación genética y patrones de flujo génico interpoblacional. La necesidad de mantener la integridad genética está estrechamente relacionada con el mantenimiento de la viabilidad y la diversidad de la muestra original recolectada. Todos los procesos de los bancos de germoplasma, la recolección, adquisición, almacenamiento, regeneración y la distribución del germoplasma, son importantes para el mantenimiento de la integridad genética. El aseguramiento de la conservación de la viabilidad en cumplimiento de las normas contribuye al mantenimiento de la integridad genética.

Por lo tanto, la conservación de la integridad genética de los recursos genéticos debe ser una regla fundamental. Nuevos planteamientos que integren las actividades de conservación de la integridad genética a nivel nacional para obtener un máximo efecto en los sistemas de protección de los recursos genéticos, deben ser incorporados.

Monitorización de Organismos Vivos Modificados en los recursos fitogenéticos.

Un Organismo Vivo Modificado (OVM) o LMO por sus siglas en inglés (Living Modified Organism), comúnmente conocido como Organismo Genéticamente Modificado (OGM), es cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación



genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna, de acuerdo con la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM, 2020).

Por otra parte, la diversidad biológica y genética de los recursos fitogenéticos puede ser amenazada por la introducción intencionada o adventicia de organismos vivos modificados (Tsatsakis *et al.*, 2017), principalmente los cultivos con reproducción alógama y aquellos en los cuales, particularmente, México es centro de origen. Por este motivo, el monitoreo de OVMs en los recursos fitogenéticos en resguardo en los bancos de germoplasma representa una actividad de gran valor.

El monitoreo de OVMs puede llevarse a cabo de distintas maneras, no obstante, es recomendable realizarse mediante estudios con marcadores moleculares de DNA. Existen distintos niveles de detección de acuerdo a la especificidad, no obstante, en una primera etapa, se recomienda la identificación de la presencia o ausencia de OVMs; en etapas posteriores, es recomendable caracterizar el evento transgénico particular.

Uno de los principales marcadores moleculares más abundante en cultivos como maíz, trigo, soya, jitomate, algodón, entre otros, es el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (p35S). La detección del p35S se realiza mediante PCR y secuenciación de DNA. Cabe mencionar, la mayoría de los laboratorios dedicados a la detección de OVMs emplean la técnica PCR tiempo real por la sensibilidad, especificidad y costos. A continuación, se describe de manera general el procedimiento para la detección del p35S en los recursos fitogenéticos mediante PCR tiempo real.

El estudio puede realizarse con diferentes componentes del cultivo, ya sea semilla, hoja, tallo, entre otros. La selección depende de la disponibilidad del material, no obstante, es recomendable llevar a cabo el estudio con tejido foliar, debido a la cantidad de almidón contenido en la semilla y su interferencia en el aislamiento de DNA. Las hojas a seleccionar deben ser jóvenes, sin daños ni enfermedades para la extracción de los ácidos nucleicos.

El primer paso es la obtención de DNA genómico de alto peso molecular, concentración adecuada y libre de contaminantes. Existen diversos

métodos de extracción de DNA publicados en la bibliografía y comerciales. El método se debe seleccionar de acuerdo con la especie en estudio y los recursos disponibles (Guzmán *et al.*, 2018). Al inicio del presente capítulo se aborda a mayor detalle este tema. Una vez obtenido el DNA con concentración y pureza adecuadas, la detección de p35S se lleva a cabo con amplificación por PCR tiempo real, en un equipo termociclador. En el mercado están disponibles diversas marcas de termocicladores. Se recomienda incluir en el proceso, la amplificación de un gen interno de referencia de la especie en estudio, con el objetivo de asegurar que la detección se realiza en la especie blanco y para evitar el reporte de falsos negativos.

Una alternativa es emplear una mezcla comercial, la cual contiene todos los componentes a excepción de los oligonucleótidos y el DNA templado. También, se puede llevar a cabo sin el uso de sondas, únicamente se debe incluir un colorante fluorescente de unión al DNA. Las concentraciones de los componentes pueden consultarse en reportes previos y realizando ensayos de estandarización en el laboratorio. Los iniciadores sentido, antisentido y las sondas son específicos y complementarios a la región del DNA blanco. Estos oligonucleótidos se pueden diseñar con base en la secuencia de DNA de p35S y el gen interno o bien, existen bases de datos y publicaciones al respecto (GMOmethods, 2020). Las condiciones de temperatura y tiempo de amplificación en las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión, son específicas de cada fragmento de DNA blanco. Estas pueden ser obtenidas con base en la longitud y secuencia del oligonucleótido y a través de ensayos en el laboratorio. Otra manera de conocer las condiciones de amplificación es a través de los reportes previos. Las etapas de la PCR se repiten entre 35 a 45 ciclos (Guzmán *et al.*, 2019).

Los resultados de la detección del p35S se observan en una gráfica de amplificación (Figura 1). En esta gráfica, se representa el número de ciclos de PCR y la cantidad de fluorescencia. La amplificación es considerada cuando la curva está compuesta por tres etapas: inicial, exponencial y meseta (Guzmán *et al.*, 2019). Otro aspecto a considerar durante el análisis, es el valor Ct. El valor Ct es el número del ciclo en el cual se obtiene el número de copias del gen blanco suficiente para rebasar la línea del umbral y está inversamente relacionado con el número de copias del p35S.

De acuerdo con la metodología aplicada, los valores Ct pueden estar entre 25 a 36.

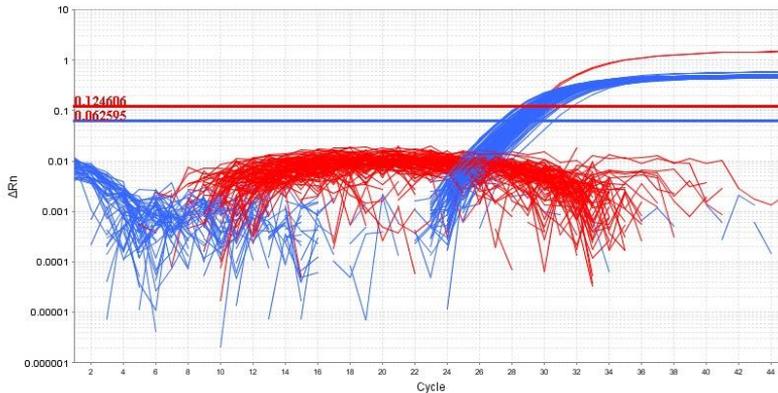


Figura 1. Gráfica de amplificación por PCR tiempo real del p35S y el gen interno hmgA en semilla de maíz. Las líneas en rojo representan al p35S y las líneas azules al gen interno hmgA. Las líneas horizontales corresponden al umbral de los genes blanco. Las líneas por debajo del umbral corresponden a la fluorescencia ruido y las líneas curvas representan la curva típica de amplificación.

En cada ensayo de detección del p35S, se recomienda incluir la amplificación por PCR del gen interno de referencia de cada muestra, ya sea, en el mismo tubo de reacción si el diseño de iniciadores y sonda lo sustenta o bien, en reacciones independientes. También es recomendable la inclusión de controles positivos, negativos y sin templado, para evitar la emisión de falsos positivos y falsos negativos derivados de la contaminación cruzada (Guzmán *et al.*, 2019).

El riesgo de presentar contaminación cruzada puede reducirse con tener un área exclusiva para la detección de organismos vivos modificados, organizada en al menos tres secciones, incluidas las secciones de extracción de DNA, preparación de reacciones y realización de ensayos de amplificación. También, se debe contar con materiales y equipos de laboratorio destinados únicamente para este fin y limpiarlos con soluciones de cloro, agua y alcohol antes y después de cada ensayo. Finalmente, la la detección de introgresión de secuencias de organismos vivos modificados en los recursos fitogenéticos contribuye al aseguramiento de la integridad y diversidad genética de las accesiones en

resguardo en bancos de germoplasma en beneficio de la seguridad alimentaria.

Análisis de la expresión de los recursos genéticos.

El fenotipo es la expresión del genotipo más la interacción con el ambiente. El análisis de la expresión de los genes es una manera de caracterizar los recursos genéticos. Esta puede llevarse a cabo mediante el estudio de proteínas, enzimas, metabolitos, RNA entre otros.

El análisis del RNA permite conocer de la expresión génica de los recursos genéticos en varias condiciones e identificar la expresión diferencial para su aprovechamiento por parte de los mejoradores (Shandilya *et al.*, 2020). El primer paso es elegir el diseño experimental con los diferentes tratamientos en las unidades experimentales, por ejemplo, las condiciones ambientales o tipo de suelo. Posteriormente, se realiza la toma de muestra para el aislamiento del RNA, el cual, se lleva a cabo con métodos de extracción de RNA publicados en la bibliografía y comerciales, se selecciona de acuerdo con la especie en estudio y los recursos disponibles.

La calidad y concentración del RNA obtenido deben ser verificadas y realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA), el cual es una molecular con mayor estabilidad. La calidad y concentración del cDNA también deben ser comprobados y se realiza de la misma manera que el DNA genómico mencionado previamente en este capítulo. El análisis de expresión se puede realizar por cuantificación absoluta utilizando un control estándar con número de copias del gen conocido y una curva estándar de concentración. La principal desventaja de este método es la ausencia de un control estándar para los genes en estudio. Otra manera de analizar la expresión génica es mediante cuantificación relativa.

La cuantificación relativa se basa en determinar el número de copias de un gen de interés en relación con el número de copias de un gen constitutivo, el cual, se expresa de manera constante en diferentes condiciones y en comparación con una muestra de referencia (Pires *et al.*, 2019). Esta metodología es conocida como el método $\Delta\Delta Ct$. A través de esta estrategia es posible determinar el nivel de expresión génica de una muestra, célula, tejido o individuos expuestos a condiciones de estrés hídrico, calórico, patológico, entre otros.

Una vez identificados los genes de interés y el gen constitutivo, se diseñan iniciadores y sondas para la amplificación mediante PCR tiempo real. Dentro de la reacción, se amplifican ambos genes con las condiciones de temperatura y tiempo específicas de ambas regiones blanco. En la programación del experimento se identifican los genes de interés y constitutivo, además las muestras problema y la muestra de referencia.

Al finalizar la amplificación, se obtienen los valores Ct del gen de interés y del gen constitutivo en las muestras problema y en la muestra de referencia. Después, se determina el valor ΔCt de las muestras problema con la diferencia del valor Ct del gen de interés menos el valor Ct del gen constitutivo. También se determina el valor ΔCt de la muestra de referencia con el mismo principio. A continuación, se estima el valor $\Delta\Delta Ct$ con la diferencia del valor ΔCt de la muestra problema menos el valor ΔCt de la muestra de referencia. Finalmente, se estandarizan los valores $\Delta\Delta Ct$ de todas las muestras con la fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados permiten identificar la expresión diferencial de las muestras sometidas a distintas condiciones. Los valores mayores a 1.0 representan sobreexpresión y valores inferiores a 1.0 representan subexpresión.

Literatura consultada.

- Alcántara MR. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología Molecular*. 2007;541-566.
- Ali N, Rampazzo RDCP, Costa ADT, Krieger MA. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed Research International*. 2017;1-13.
- Borrayo E, Machida-Hirano R, Takeya M, Kawase M, Watanabe K. Principal components analysis-K-means transposon element based foxtail millet core collection selection method. *BMC Genetics*. 2016;17:1-10.
- Chandora R, Gayacharan, Shekhawat N, Malhotra N. Chickpea genetic resources: collection, conservation, characterization, and maintenance. In: *Chickpea: Crop Wild Relatives for Enhancing Genetic Gains*. 2020;37-61.
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006;1:581-585.

- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Westfall MV. (Eds.). Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. 3a ed. CRC press 2011; 3-28 pp.
- GOMethods. Consultado el 20 de agosto de 2020. Disponible en: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>.
- Guzmán LF, Pichardo-González JM, Cortés-Cruz MA, Amaro-González BA. Detección de OGM's en cultivos. Publicación especial, 1ª ed. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias 2019;1-45.
- Guzmán LF, Cortés-Cruz MA, Pichardo-González JM, Arteaga-Garibay RI. Comparación de protocolos de aislamiento de DNA a partir de semilla de soya. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2018;9:1691-701.
- Guzmán LF, Machida-Hirano R, Borrayo E, Cortés-Cruz M, Espíndola-Barquera M del C, Heredia García E. Genetic Structure and Selection of a Core Collection for Long Term Conservation of Avocado in Mexico. Front Plant Sci 2017;8:1-10.
- Herráez A. Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e Ingeniería genética. 2a ed. España: Elsevier 2012;20-28 pp.
- Jeong N, Kim KS, Jeong S, Kim JY, Park SK, Lee JS, et al. Korean soybean core collection: Genotypic and phenotypic diversity population structure and genome-wide association study. PLoS One 2019;14:1-16.
- LBOGM. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Consultado el 20 de agosto de 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/profepa/documentos/ley-de-bioseguridad-de-organismos-geneticamente-modificados>.
- Malhotra N, Panatu S, Singh B, Negi N, Singh D, Singh M, et al. Genetic resources: Collection, conservation, characterization and maintenance. In: Lentils: Potential Resources for Enhancing Genetic Gains. Elsevier 2019. 21-41 pp.
- Mohler V, Schwarz G. The Principle: Identification and application of molecular markers. In: Biotechnology in agriculture and forestry: 55 Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008;23-38 pp.
- Peakall R, Smouse P.E. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics. 2012;28: 2537-2539.

- Pires B V, Stafuzza NB, Lima SBGNP, Negrão JA, Paz CCP. Differential expression of heat shock protein genes associated with heat stress in Nelore and Caracu beef cattle. *Livestock Science*. 2019; 1-8.
- Rodríguez ASS, Rizo ABM. Extracción de ácidos nucleicos. *Biología molecular* 2011;99-100.
- Rogstad SH, Pelikan S. Analyzing genetic diversity in small, isolated and developing population. In: *Genetic diversity in establishing plant populations Founder number and geometry*. USA: CRC Press Taylor & Francis Group 2011; 13–8.
- Shandilya UK, Sharma A, Sodhi M, Mukesh M. Heat stress modulates differential response in skin fibroblasts cells of native cattle (*Bos indicus*) and riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Bioscience Reports* 2020;40:BSR20191544
- Tsatsakis AM, Nawaz MA, Tutelyan VA, Golokhvast KS, Kalantzi OI, Chung DH, *et al.* Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food, *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd. 2017;107:108–121.
- Upahyaya HD. Establishing core collections for enhanced use of germplasm in crop improvement. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*. 2015;1:1–12.
- Wehenkel C, Del Rocío Mariscal-Lucero S, Jaramillo-Correa JP, López-Sánchez CA, Vargas-Hernández JJ, Sáenz-Romero C. Genetic diversity and conservation of Mexican forest trees. In *Biodiversity and Conservation of Woody Plants*; Ahuja, M., Jain, S., Eds.; Sustainable Development and Biodiversity; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017;17:37–67.



Capítulo 9

Herramientas informáticas para el estudio de los recursos genéticos

Lorena Jacqueline Gómez-Godínez^{1}, Francisco Fabián Calvillo Aguilar¹,
Arturo Vera Ponce de León², Colin K. Khoury³, María Victoria Díaz³*

1 Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP. 2 Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, The Ohio State University, 3 International Center for Tropical Agriculture (CIAT)
gomez.lorena@inifap.gob.mx

Introducción.

En el CNRG además de la conservación de los recursos genéticos, se realizan estudios de nivel informático que incluye la descripción y modelación de la distribución geográfica de las especies conservadas, así como el análisis del genoma y diversidad. A través de herramientas informáticas, es posible determinar el contenido genómico y como este cambia o responde a diversas condiciones ambientales. Por otro lado, con el apoyo de la modelación espacial y los sistemas de información geográfica se ha realizado la planeación y evaluación en las colectas, para determinar la distribución actual y potencial de las especies conservadas. Además, sirven para conocer las condiciones ambientales del suelo, clima y relieve, en las que dichas colectas se desarrollan.

El continuo avance y desarrollo de tecnologías informáticas ha permitido realizar estudios cada vez más complejos. La ciencia de datos (*data science*), ha permitido el modelado y caracterización de los recursos genéticos. Así la bioinformática y los sistemas de información geográfica, son herramientas que contribuyen al conocimiento y conservación de la biodiversidad.



Surgimiento de las técnicas de secuenciación masiva: del capilar al nanopore.

La secuenciación del primer genoma (*Haemophilus influenza* 1.8 Mb) se realizó utilizando tecnología de secuenciación capilar desarrollada por Frederick Sanger en la década de los 70 (Fleischmann *et al.*, 1995). Al inicio del siglo XXI, se planteó el proyecto de secuenciar organismos eucariontes comenzando por la mosca de la fruta en el año 2000, el primer bosquejo del genoma humano en el 2001 y el ratón en el 2002 (Goodwin *et al.*, 2016). Usando este tipo de tecnología capilar (de aquí en adelante secuenciación Sanger), producir un millón de bases de DNA costaba aproximadamente \$1,500 USD, y se necesitaba de un día entero para la corrida del experimento (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015). Es por lo que el primer bosquejo (“*draft*”) del genoma humano (3 billones de bases o 3 Gb), se calcula que tuvo un costo de billones de dólares y se necesitaron años de horas máquina para refinarlo. En 2005 apareció formalmente el primer equipo de secuenciación de nueva generación, o “NGS” por sus siglas en inglés *next generation sequencing* (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015).

La secuenciación por síntesis de Roche 454, implementó una química de secuenciación basada en la detección y medición de luz emitida por una luciferasa al momento de que se hidroliza ATP, por la incorporación de un nucleótido en las hebras recién sintetizadas de DNA. El uso de ATP en la reacción confiere el nombre de pirosecuenciación a la técnica (Buermans y Den Dunnen 2014). Esta tecnología hizo posible obtener un genoma humano, con una cobertura 7.4x, en tan solo dos meses y con un costo 10 veces menor en comparación con la secuenciación Sanger (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015). Aunque esta tecnología revolucionó la forma de secuenciar, en el año 2016 la empresa Roche anunció la discontinuación de los equipos 454 (Buermans y Den Dunnen 2014).

La segunda NGS en comercializarse fue utilizando la tecnología Illumina, esta difiere de 454 ya que adoptó la secuenciación por síntesis usando nucleótidos fluorescentes removibles usados en la polimerización del DNA (Buermans y Den Dunnen 2014). Actualmente, y con el precipitado avance en las nuevas tecnologías de secuenciación, se tienen plataformas con la capacidad de generar entre 120-1500 Gb por corrida y una media del tamaño de secuencia de 150 bp. En estos se encuentra además una gama compacta para laboratorios llamada MiSeq, la cual es pequeña en tamaño,



y se pueden lograr de 0.3 Gb a 15 Gb de datos en un tiempo que puede ser de 4 horas (Buermans y Den Dunnen 2014).

Además, se ha desarrollado una nueva forma de secuenciar DNA sin requerir un paso previo de amplificación por PCR. Este tipo de tecnología se denomina secuenciación a partir de molécula única (*single-molecule sequencing*). Este tipo de secuenciación implementa una polimerasa directamente embebida en una celda de vidrio o un poro dependiendo el modelo de las plataformas. Usando estas tecnologías se puede obtener hasta 100 Gb de información (aprox. 33 veces el genoma humano) a un costo aproximado de \$ 1,000 dólares (Ameur *et al.*, 2019). El uso de las NGS ha revolucionado el estudio de diversos organismos y su información genética (genomas y metagenomas), así como la respuesta de cambio en los genes a diversos estímulos (transcriptomas y metatranscriptomas).

Herramientas bioinformáticas para el estudio de la diversidad de los recursos genéticos.

Mediante las NGS podemos responder algunas preguntas, como ¿que se encuentra en determinado ambiente? y ¿qué función biológica está realizando?, información básica en la ecología microbiana, etc. Podemos resolver estas cuestiones con dos enfoques diferentes: 1) secuenciación de genes marcadores (*metabarcoding*) o 2) secuenciación de todo el contenido genético (*whole-genome sequencing* WGS). La secuenciación de uno o varios genes blanco, comunes en los organismos de la comunidad son utilizados para la estrategia del *metabarcoding*. Para esto se utilizan iniciadores, dirigidos al gen de interés, generalmente se utiliza el gen 16S rRNA para bacterias y arqueas y la secuencias intergénicas del gen 18S rRNA (ITS) para hongos. Estos métodos son rápidos y rentables lo que permite obtener una visión global de los organismos presentes en una comunidad microbiana en poco tiempo y a bajo costo (Knight *et al.*, 2018; Calle, 2019).

El segundo enfoque, es un método que permite capturar todos los genomas presentes en cierta comunidad, para esto se secuencian el DNA total de la muestra y bioinformáticamente se separan los genomas de cada individuo presente en la comunidad (*binning*). Al poder analizar no sólo un marcador sino todos los genes presentes en los distintos organismos de la comunidad (bacterias, arqueas y hongos), se obtiene no

sólo una visión taxonómica si no funcional de los miembros del ecosistema secuenciado (Knight *et al.*, 2018; Calle, 2019).

Análisis taxonómico.

Una vez obtenidos los datos por NGS se realiza el análisis bioinformático y se han desarrollado diversos protocolos los que se han desarrollado para conocer la composición taxonómica de los miembros de una comunidad microbiana. Sin embargo, todos siguen algunos lineamientos generales para el procesamiento y análisis de los datos. El primer paso para el análisis es la remoción de secuencias de baja calidad y artefactos de secuenciación (adaptadores). Una vez obtenidas secuencias de alta calidad, por lo regular se procede a la agrupación o *clustering* de secuencias y su asignación a unidades operacionales taxonómicas (OTUs) o variantes de secuencias ribosomales (ASVs) (Callahan *et al.*, 2017). Esto puede hacerse directamente de los datos obtenidos por el método de *metabarcoding* o bien extrayendo las secuencias de los genes ribosomales (u otro gene taxonómicamente informativo) de los datos producidos por *WGS* (Rausch *et al.*, 2019). Finalmente, cada una de estas OTUs son asignadas a un nivel taxonómico determinado utilizando búsquedas en bases de datos por ejemplo Silva, RPD o GreenGenes y emparentándolas con su homólogo en dicha base (Balvočiūtė *et al.*, 2017). Todo esto finaliza en la obtención de una matriz de relación OTU, taxonomía y muestra, comúnmente conocida como matriz de OTUs (Callahan *et al.*, 2017). Programas informáticos como Mothur (Schloss *et al.*, 2009) y Qiime 1 y 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso *et al.*, 2010), y Phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) son softwares que siguen protocolos comunes para el análisis de datos. Estos protocolos consisten en (1) limpiar y filtrar las secuencias obtenidas, (2) asignar secuencias a OTUs o ASVs y (3) describir la diversidad (α y β), composición y diferencias o similitudes entre las comunidades. Con todo esto, las diferencias en la abundancia relativa de los miembros presentes en las comunidades microbianas pueden ser calculadas por medio de análisis multivariados de agrupación y minería de datos (ejemplo análisis de componentes principales o PERMANOVA). Estos análisis pueden ser después visualizados por graficas de ordenación tipo análisis de componentes principales (PCA) o NMDS (Rausch *et al.*, 2019) (Figura1).

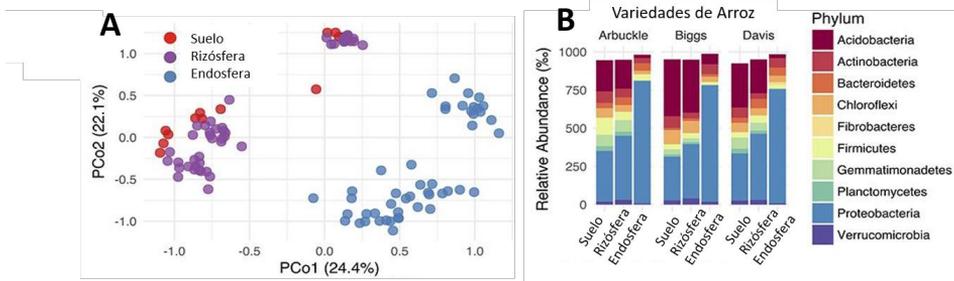


Figura 1. Representaciones gráficas de información obtenida de un análisis de diversidad (metabarcoding). A) Análisis de componentes principales (PCA), mostrando diversos grupos de comunidades microbianas presentes en diferentes ambientes del suelo. B) Histogramas de abundancia de phylum en cada compartimento (tomado y modificado de Edwars *et al.*, 2015).

Análisis taxonómico: ¿Que se encuentra en determinado ambiente, y qué función biológica está realizando?

El hecho de obtener la secuencia del genoma completo (o cuasi completo) de la mayoría de organismo presentes en una muestra vía WGS permite conocer la taxonomía y posible nicho que ocupan los miembros de la comunidad. Los primeros pasos de la mayoría de los protocolos descritos para analizar datos tipo WSG son similares a los utilizados en el *metabarcoding*. Esto es el filtrado por calidad de secuencias y remoción de adaptadores. Programas como *fastQC*, software desarrollado para proporcionar una visión general de las secuencias obtenidas, ayuda a visualizar de manera gráfica la calidad y presencia de artefactos en las secuencias (Andrews, 2010). El filtrado por remoción de lecturas (secuencias tipo NGS) con baja calidad puede llevarse a cabo utilizando paqueterías bioinformáticas tipo *trimmomatic* (Bolger *et al.*, 2014). Este tipo de software permite remover utilizando un corte en valor *Phred* de calidad además de la remoción de artefactos como quimeras y adaptadores presentes en las lecturas.

Para poder recuperar la información genética de los organismos presentes en las muestras secuenciadas por WGS, es necesario ensamblar los genomas. El ensamble consiste en recuperar secuencias de mayor longitud, denominadas “contigs” en los cuales se podrá recuperar las regiones codificantes de los genes. Programas como SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), IDBA (Peng *et al.*, 2010) o MEGAHIT (Li *et al.*, 2014), permiten la recuperación de ensambles genómicos. Todas estas herramientas trabajan bajo el mismo principio, el uso de gráficas de Brujin y

fragmentación de lecturas en *k-mer* para la extensión de secuencias cortas (Bankevich *et al.*, 2012). Con este tipo de estrategias es posible recuperar genomas casi completos o completos a partir de muestras metagenómicas.

Al recuperar secuencias con una longitud mayor a 1,000 nucleótidos (tamaño promedio de un gen bacteriano) podemos empezar a predecir unidades codificantes (genes) presentes en el ambiente. Genes taxonómicamente informativos como secuencias ribosomales, genes mitocondriales o genes de copia única pueden ser utilizados para la asignación taxonómica de los individuos presentes en la comunidad (Wu *et al.*, 2008; Darling *et al.*, 2014). MetaPhlan1 y 2 (Truong *et al.*, 2015), Kraken (Wood and Salzberg, 2014), AMPHORA (Wu *et al.*, 2008) y PhiloSift (Darling *et al.*, 2014), son ejemplos de herramientas que proveen información y clasificación taxonómica a partir de búsqueda de genes de copia única en los genomas. Esta información puede ser representada en forma de árboles filogenéticos o matrices de comparación.

Una vez obtenida la clasificación taxonómica de los miembros presentes en la comunidad, es posible separar cada uno de los genomas utilizando una técnica denominada *binning*. El *binning* consiste en clasificar y separar por similitud aquellas secuencias comunes pertenecientes al genoma de un organismo en particular. En donde un *bin* representara un genoma (Wu *et al.*, 2016). Rasgos como cobertura de secuencias, porcentaje y frecuencia de *k*-meros, frecuencia de tetranucleótidos, así como motivos particulares en las secuencias (Kislyuk *et al.*, 2009, Strous *et al.*, 2012), son utilizados para agrupar aquellos *contigs* similares y separarlos en genomas individuales. Programas informáticos como MaxBin (Wu *et al.*, 2016), MetaBat (Kang *et al.*, 2015) y CONCOCT (Alneberg *et al.*, 2014) emplean este tipo de estrategias para aislar genomas presentes en comunidades metagenómicas.

Con los genomas individuales de cada uno de los organismos presentes en el ambiente podemos empezar a clasificar el contenido de genes presentes en ellos, proceso denominado anotación genómica. Programas como Prokka (Seemann, 2014), KOALA (Kanehisa *et al.*, 2016), y el Prokaryotic Genome Annotation Pipeline del National Center for Biotechnology Information NCBI, (Tatusova *et al.*, 2016) son capaces de predecir las secuencias codificantes y anotar los genes presentes en ellas

a partir de búsquedas de homología con bases de datos (ejemplo Uniprot (Apweiler *et al.*, 2004), Pfam (Bateman *et al.*, 2002), KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

Una vez ensamblados los *contigs* se puede utilizar MetaPhlan2, que se encarga de la asignación taxonómica, utilizando regiones genómicas y marcadores moleculares de copia única (Truong *et al.*, 2015), para esto también es posible utilizar Kraken, el cual asigna etiquetas taxonómicas a secuencias de DNA, mucho más rápido y eficiente que MetaPhlan2 (Wood y Salzberg, 2014). Una vez realizada la clasificación taxonómica se pueden utilizar otras herramientas para predecir y anotar genes en vías metabólicas, prokka (Seemann, 2014) e InterProScan (Mitchell *et al.*, 2019) son herramientas que se utiliza con estos fines (Figura 2).

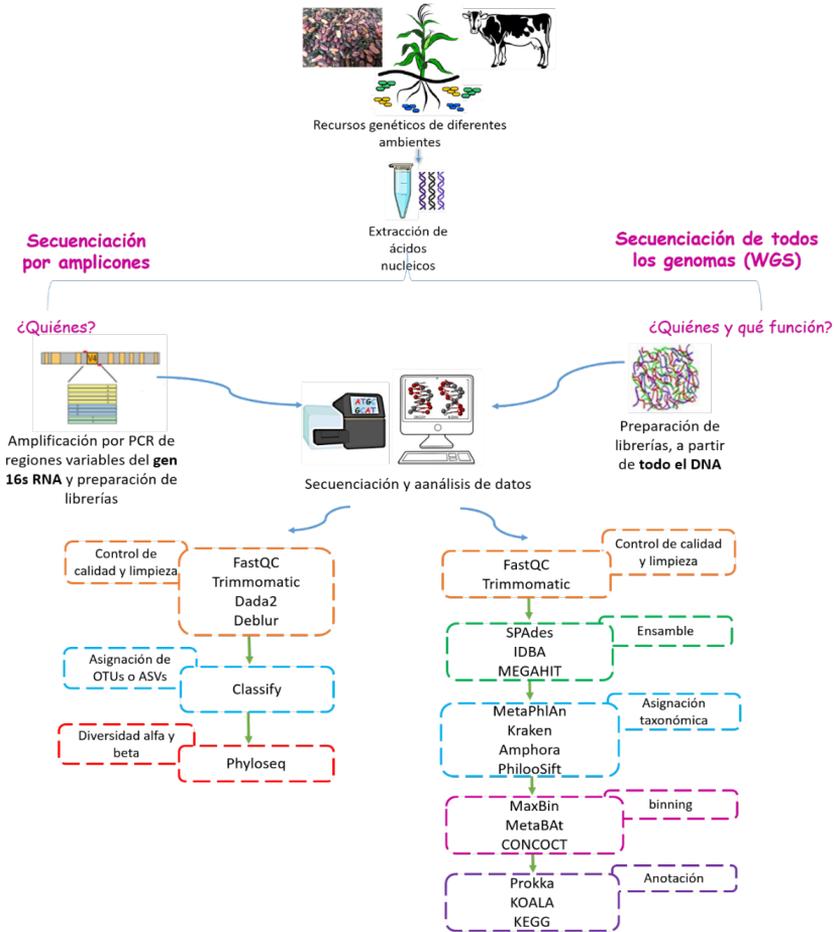


Figura 2. Flujo de trabajo que representa las diferencias de secuenciación y análisis bioinformático entre metabarcoding (amplicones) y WGS.

Herramientas bioinformáticas para el estudio de la expresión diferencial de genes en los recursos genéticos.

Toda la información de un organismo se encuentra contenida en el genoma, sin embargo, no toda se expresa al mismo tiempo. Por ejemplo, una planta sometida a estrés por sequía, expresará ciertos genes para contrarrestar los efectos del estrés, que no expresaría bajo condiciones normales. A la expresión de ciertos genes o transcritos (moléculas de RNA) en determinadas condiciones como estrés, enfermedades o tipos celulares se le conoce como transcriptoma. Se considera que el

transcriptoma es dinámico debido a que este depende de las condiciones de crecimiento del organismo.

Existen dos técnicas para el análisis de los transcritos, por un lado están los microarrays/microarreglos, que cuantifican un conjunto de secuencias predeterminadas o conocidas, y la secuenciación de RNA (RNA-Seq), que utiliza NGS para capturar todas las secuencias (Figura 3).

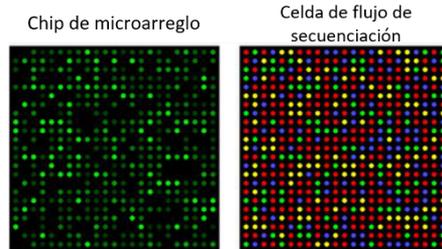


Figura 3. Microarreglos y RNA-Seq se basan en el análisis de imágenes de diferentes maneras. En un chip de microarreglos, cada punto en un chip es una sonda de oligonucleótidos definida, y la intensidad de fluorescencia detecta la abundancia de una secuencia hibridada y específica. En la secuenciación de alto rendimiento, se secuencia un nucleótido a la vez, el color en cada ronda indica el nucleótido añadido.

Existen diversas herramientas informáticas para el análisis de transcriptomas, este capítulo se centrará en el análisis de RNA-seq, debido a que es la técnica más novedosa y actualmente más usada, para la identificación de los niveles de expresión, es los diferentes recursos genéticos. El análisis de secuencias de RNA-seq, se puede dividir en cuatro etapas: control de calidad, alineación, cuantificación y expresión diferencial. Para el control de calidad, generalmente se usa FastQC (Andrews, 2010), el cual permite visualizar la calidad de las secuencias, este software hace un llamado de base por base y evalúa su calidad, asignándole un puntaje según la escala, permite ver el contenido de GC, y la cantidad de secuencias obtenidas. Posterior a la visualización de calidad de las secuencias se realiza una limpieza de datos, la cual consiste en quitar aquellas bases de mala calidad, secuencias sobrerrepresentadas, quimeras, y los adaptadores. Las herramientas más utilizadas para estos fines son Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), Trimgalore (Krueger, 2015) y FastX (FastX, 2015). Una vez limpiadas las secuencias se procede al alineamiento, el cual consiste en empalmar las secuencias obtenidas por NGS contra un genoma de referencia o *de novo*. Dentro de los programas utilizados para el alineamiento se encuentran Burrow-Wheeler Aligner (BWA) (Li y Durbin 2009), Bowtie (Langmead *et al.*, 2009), TopHat (Trapnell *et al.*, 2009), y GSNAP (Wu y Nacu 2010), la elección de estos dependerá del



genoma de referencia utilizado ya que TopHat y GSNAP aumenta la probabilidad de identificar nuevas transcripciones generadas por *splicing* alternativos (Yang y Kim, 2015).

Una vez alineadas las secuencias al genoma de referencia, se realiza la cuantificación de secuencias alineadas por *contig/gen*, para esto es posible utilizar programas como RSEM (Li y Dewey, 2011), que proporciona estimaciones a nivel de genes e isoformas como salida primaria al calcular estimaciones de abundancia de máxima verosimilitud basadas en el algoritmo de Expectación-Maximización (EM) después de leer el mapeo. RSEM puede dar estas cuantificaciones normalizadas por millón (TPM), así como también admite la visualización de la alineación y la profundidad de lectura mediante un navegador genómico como el navegador genómico Santa Cruz (UCSC) de la Universidad de California. Cufflinks es el programa informático más utilizado y estima la abundancia, mediante la abundancia de probabilidad máxima, basada en la cobertura de la transcripción. Las abundancias se informan por kilobase por millón de fragmentos mapeados (FPKM o RPKM). Finalmente, para el análisis de expresión diferencial, se han desarrollado varias paqueterías de software que incluyen EdgeR (Robinson *et al.* 2010), DESeq (Anders y Huber, 2010), que ocupan modelos binomiales negativos y NOseq (Tarazona *et al.* 2015), que son no paramétricos. Los programas anteriores adoptan uno o más de los varios métodos de normalización disponibles (recuento total, cuartil superior, mediana, normalización DESeq, media recortada de valores M, normalización de cuartil y RPKM) para corregir los sesgos que pueden aparecer entre las muestras (profundidad de secuenciación) o dentro de la muestra (longitud del gen y contenido de GC) (Yang y Kim, 2015). Estos programas permiten encontrar aquellos genes involucrados, con alguna respuesta a cierta condición, estrés o ambiente al cual se encuentren sometidos, los diferentes recursos genéticos.

Sistemas de información geográfica.

Datos pasaporte, una primera etapa a los mapas de distribución.

Actualmente se ha difundido en gran medida el uso de tecnologías como drones, principalmente para fotografía artística y técnica (Figura 4), servidores de mapas en teléfonos móviles para ubicar una dirección, incluso el cine 3D o la llamada realidad aumentada; todo lo mencionado es tecnología cuyos orígenes se remontan a los años 50's con el desarrollo

de los hoy llamados Sistemas de Información Geográfica (SIG), impulsados con fines científicos y militares para el estudio del territorio de las naciones (Olaya, 2014).



Figura 4. Vuelo de dron y georreferenciación de puntos de control con estación total para un estudio de hidrología.

Los SIG son una herramienta informática que consiste en software capaz de almacenar, capturar, verificar, gestionar, analizar, transformar, mostrar y transferir datos especialmente referidos a la tierra (georreferenciados), con la finalidad de realizar diversos análisis de carácter territorial (SGM, 2019).

Los SIG se conforman de cinco componentes (FAO, 2006):

1. Hardware: Equipo de cómputo.
2. Software: Programas que permiten el manejo y visualización de las bases de datos.
3. Datos: Conjunto de información con carácter espacial.
4. Personas: Especialistas y técnicos que diseñan, operan y mantienen el SIG.
5. Métodos: Modelos y prácticas realizadas en el análisis y mantenimiento de los datos.

La función principal de un SIG es servir como una herramienta para la toma de decisiones, ya que permite mediante la visualización de mapas, responder a preguntas sobre la localización, condición, cambio histórico, modelación y simulación de un fenómeno (INEGI, 2014). Estos mapas se utilizan entre otras cosas para (ESRI, 2013):

1. Conocer y compartir información.
2. Compilar y mantener datos.

3. Organizar y visualizar.
4. Mediante geoprocetos, generar nueva información.

Debido a los avances en el desarrollo de tecnologías de la información y cómputo, la aplicación de los SIG es cada vez más diversa, por ejemplo, en ámbitos como el productivo, científico, cultural y de gobernanza (McCall, 2003; Siabato, 2018). Una de las áreas de interés en la actividad científica, es el uso de los SIG en la conservación de los recursos genéticos, generando mapas de distribución geográfica de las especies con fines de resguardo.

Un mapa de distribución geográfica conocida, muestra los sitios o regiones donde se tiene registro de la presencia de una especie (Figura 5), planta o animal, y puede ser utilizado para la planeación de acciones de conservación *in situ*, así como para la distribución de los sitios de colecta en la conservación *ex situ* (Maxted *et al.*, 2013). Realizar un mapa de distribución geográfica conocida, requiere que los registros tengan las coordenadas geográficas donde se determinó la presencia de la especie (avistamiento/colecta); es precisamente cuando los datos pasaporte tienen especial relevancia, ya que en ellos se registra un lote de información respecto al origen de las colectas de germoplasma, incluidas las coordenadas, localidad, municipio o referencias geográficas.

En el CNRG, el proceso de ingreso de accesiones de germoplasma solicita que se incluyan los datos pasaporte de cada accesión; estos datos cuentan con una estructura con base en acuerdos internacionales, como el Tratado Internacional Sobre los Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, ITPGRFA, por sus siglas en inglés, de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Biodiversidad Internacional (Alercia *et al.*, 2015).



Figura 5. Mapa de distribución geográfica conocida de *Echinocactus platyacanthus*, especie en *peligro de extinción* según la NOM-059-SEMARNAT 2010. Fuente: (adaptado de CONABIO, 2014).

Ecogeografía, una caracterización multidisciplinaria.

El primer resultado de realizar un mapa de distribución geográfica conocida, consiste en agrupar y visualizar los sitios y regiones donde está presente una especie. Además, es posible conocer las características ambientales de estas regiones, bióticas, abióticas y antrópicas; como altitud, temperatura, precipitación, suelo, vegetación dominante, uso del suelo y topografía, entre muchas otras. En ecología, al conjunto de estas características ambientales que determinan las regiones dónde puede o no estar presente una especie se le denomina hábitat, y puede modelarse tanto para las condiciones actuales como para las históricas y futuras, por ejemplo, para condiciones de cambio climático (Figura 6).

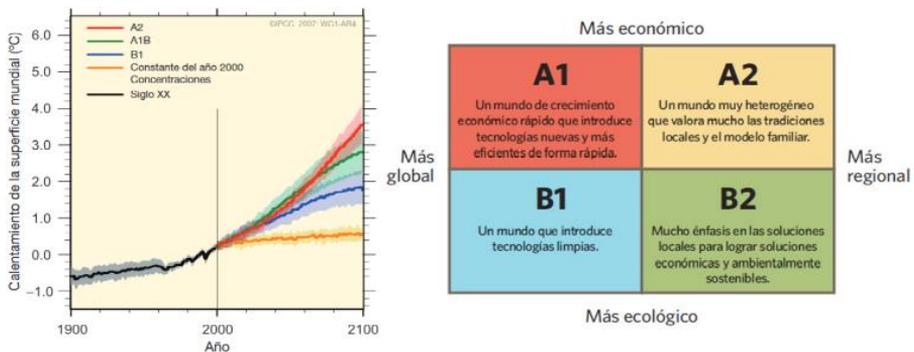


Figura 6. Escenarios de cambio climático propuestos por el Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC). Fuente: (adaptado de IPCC, 2007).

De este modo, al estudio de los factores que determinan el hábitat y el ambiente al cual un individuo, población o especie se ha adaptado, se le conoce como análisis ecogeográfico, y es importante dado que estas adaptaciones tienen su representación en la información genética de cada individuo. El análisis ecogeográfico requiere de la recopilación y síntesis de información geográfica, taxonómica y genética; sus resultados son de carácter predictivo, pueden utilizarse para formular y priorizar proyectos de recolección y conservación de especies (Castañeda *et al.*, 2011).

La caracterización ecogeográfica de una región o país se realiza mediante el compilado y análisis de información espacial edáfica, bioclimática, geofísica, biótica y antrópica, a través de un SIG; y se representa con mapas, que al combinarse reflejan los diferentes escenarios de adaptación ambiental. Además, con la cartografía y datos espaciales, se pueden realizar análisis de distribución potencial, riesgo e índices de biodiversidad (Figura 7).

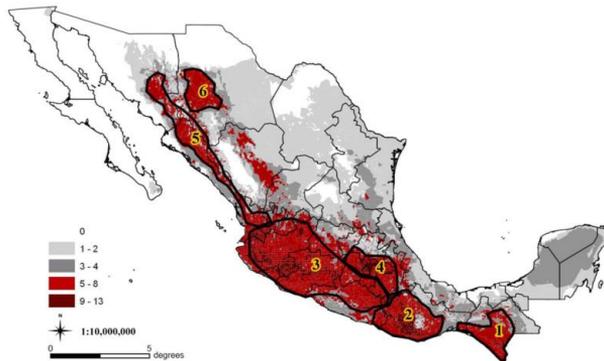


Figura 7. Riqueza de razas de maíz en México (número de razas que ocurren dentro de cada celda ó pixel). Fuente: (Perales y Golicher, 2014).

Según Maxted *et al.*, (2013), el uso de los SIG en el análisis ecogeográfico permite:

1. Caracterización ambiental de los sitios de colecta.
2. Optimización de las colectas de germoplasma orientada a una mayor representatividad de la diversidad genética.
3. Interpretación de patrones geográficos, ecológicos y taxonómicos.



4. Representatividad y sesgo ecogeográfico en colectas existentes (análisis de vacíos).
5. Determinación de sitios para establecer reservas genéticas.
6. Impacto del cambio climático en las poblaciones naturales.

La caracterización ecogeográfica de los recursos genéticos, es una herramienta que permite determinar el rango adaptativo de las especies, y con ello determinar los factores ambientales más determinantes. El valor genético de estos rasgos puede utilizarse en el mejoramiento genético de especies de interés agrícola, forestal y pecuario. Por otra parte, en el caso de cultivos, la regeneración del germoplasma puede realizarse en los sitios más acordes a las condiciones ecogeográficas nativas, para garantizar un mayor éxito de la regeneración y reducir la erosión genética (Parra *et al.*, 2012).

La planeación: el análisis de vacíos y la caracterización predictiva.

Anteriormente se mencionó que derivado del análisis ecogeográfico y los mapas de distribución geográfica, la información permite determinar la calidad o sesgo de las colectas de germoplasma con base en la diversidad ecogeográfica no representada, a esta determinación se le conoce como análisis de vacíos, y puede aplicarse en la planeación de las jornadas de colecta para mejorar la representatividad ecogeográfica de la conservación *ex situ* (Parra *et al.*, 2012), incluso para determinar zonas de interés por su diversidad en recursos genéticos. Ejemplo de ello, es el análisis de vacíos realizado por Contreras *et al.*, (2019) para parientes silvestres de cultivos en México, donde de forma complementaria propuso áreas para el establecimiento de reservas genéticas (Figura 8).

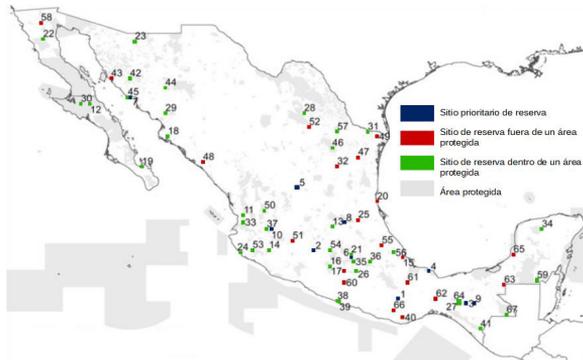


Figura 8. Sitios propuestos para el establecimiento de reservas genéticas de parientes silvestres de cultivos en México. Fuente: (adaptado de Contreras *et al.*, 2019).

Determinar los sitios de colecta con el objetivo de obtener rasgos adaptativos para realizar mejoramiento genético, es una herramienta de selección denominada *caracterización predictiva*, y ha generado metodologías y protocolos internacionales como el Focused Identification of Germoplasm Strategy (FIGS). La metodología FIGS consiste en la búsqueda de rasgos específicos, con base en la relación fenotipo-genotipo, utilizando herramientas geográficas para determinar la presión del medio ambiente sobre los individuos; FIGS asume la probabilidad de que el germoplasma refleje las adaptaciones de las muestras colectadas (Bari *et al.*, 2012). Esta herramienta se utiliza en la búsqueda de rasgos como la tolerancia a sequía, plagas y enfermedades (Maxted *et al.*, 2013).

Caso de estudio: Análisis de vacíos geográficos y ecológicos de conservación para plantas silvestres.

Para abordar las necesidades persistentes de indicadores para la conservación de la biodiversidad y recursos genéticos, particularmente con respecto a la evaluación eficiente de la conservación de la diversidad genética, dentro y entre los taxones, se han desarrollado análisis de vacíos de conservación.

Khoury *et al.* (2019b) ofreció una metodología de análisis de brechas aplicada a los sistemas de conservación *ex situ* e *in situ* para plantas silvestres. El método proporcionó una aproximación de la distribución de la diversidad genética de una especie de planta silvestre, utilizando el



alcance de la variación ecogeográfica (es decir, geográfica y ecológica) en su rango nativo, predicho como un *proxy*, que se ha demostrado que es un sustituto efectivo (Hanson *et al.*, 2017, Hoban *et al.*, 2018), facilitando la planificación de la conservación a pesar de las brechas persistentes en los datos genéticos a nivel de población (Balmford *et al.*, 2005, Hanson *et al.*, 2017; Hoban *et al.*, 2020).

La variación ecogeográfica evidente a partir de un análisis de la ubicación de los sitios de recolección de muestras, salvaguardadas en repositorios de conservación (es decir, bancos de genes, semillas, y jardines botánicos) (*ex situ*), y en el rango de distribución de las especies dentro de áreas naturales protegidas (*in situ*), se midió contra la variación ecogeográfica encontrada dentro del rango nativo general predicho de la especie. El proceso identificó brechas geográficas y ecológicas en la protección actual, que pueden representar puntos focales para acciones futuras. Posteriormente, se priorizó los taxa para realizar más esfuerzos de conservación, y se combinaron los puntajes de múltiples taxones para proporcionar indicadores a diferentes escalas, locales, nacionales, regionales y globales (Khoury *et al.*, 2019a). La metodología se basó en datos y herramientas de acceso abierto (Khoury *et al.*, 2019a) y fue reportada en formatos de resumen fácilmente comprensibles, al tiempo que proporcionaron información específica por taxón útil para acciones de conservación. Además, cuando se aplica repetidamente a lo largo del tiempo, los resultados podrían usarse para visualizar el progreso hacia el objetivo de la conservación integral, incluida la determinación de cuándo se ha alcanzado ese objetivo.

El análisis de vacíos de conservación se basó en métodos desarrollados durante la última década, primero para medir el estado de conservación de los taxones en repositorios y para ayudar a guiar los esfuerzos de recolección adicionales, destinados a construir colecciones *ex situ* más diversas (Ramírez-Villegas *et al.*, 2010, Castañeda-Álvarez *et al.*, 2016). Recientemente, el enfoque se adaptó para medir la representación dentro de las áreas naturales protegidas (Khoury *et al.*, 2019b,c,d, Lebeda *et al.*, 2019; Mezghani *et al.*, 2019). Tales estudios se han llevado a cabo con mayor frecuencia en una variedad de especies dentro de un género, aunque también se han aplicado a nivel nacional (Norton *et al.*, 2017; Khoury *et al.*, 2020) y global para grupos específicos de plantas (Castañeda-Álvarez *et al.*, 2016; Khoury *et al.*, 2019b).

En México, un resultado interesante de este análisis de vacíos para parientes silvestres, es el de *Cucurbita argyrosperma* C. Huber subsp. *sororia* (LH. Bailey) L. Merrick & D. M. Bates, el progenitor de *C. argyrosperma* C. Huber subsp. *argyrosperma* (calabaza pipiana), que fue domesticada en el sur de México unos 7000 años pb. (Antes del presente, *Before Present*) (Smith, 2006). Este taxón anual mesofítico se distribuye a lo largo de las costas tropicales del Pacífico y del Golfo de México, desde el estado de Sonora en México hasta el sur de Nicaragua, y ha sido reconocido como una fuente de resistencia a varios virus de importancia económica en el cultivo (Khoury *et al.*, 2019d). Usando el método de análisis de vacíos, se descubrió que las 59 ocurrencias de germoplasma estaban relativamente bien distribuidas en el rango geográfico y ecológico de los taxones, aunque tal vez faltan representaciones en las partes más al norte y más al sur de su rango (Fig. 9A). La comparación de su distribución prevista con las áreas protegidas oficialmente reconocidas, encontró que las áreas principales de su distribución geográfica no están representadas en áreas protegidas, mientras que la mayoría de su variación ecológica está posiblemente representada (Figura 9). A la especie se le asignó un valor de acuerdo al grado de conservación, en un rango de 0 a 100, 46.8 y 31.8, para la conservación *ex situ* e *in situ*, respectivamente; interpretándose 100 como una conservación integral y 0 limitada (Khoury *et al.* 2019d).

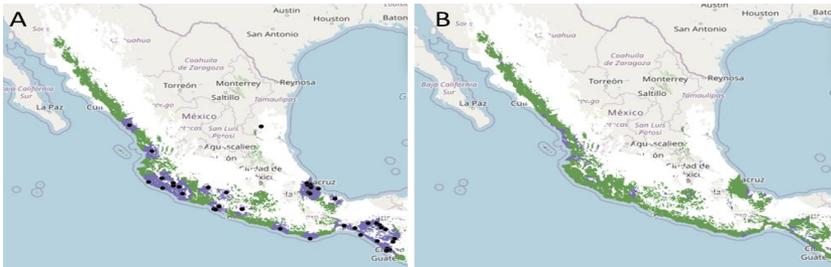


Figura 9. Análisis de vacíos de conservación para *Cucurbita argyrosperma* C. Huber subsp. *sororia* (L. H. Bailey) L. Merrick y D. M. Bates, que muestra la representación geográfica del pariente silvestre en la conservación *ex situ* (A) y en las áreas protegidas *in situ* (B). El verde representa el rango predicho del taxón basado en información de ocurrencia, datos climáticos y topográficos. El púrpura representa áreas consideradas como conservadas, con base en colecciones *ex situ* anteriores (A) y en áreas protegidas existentes (B). Datos y mapas derivado de Khoury *et al.*, (2019d).

Análisis de vacíos geográficos y ecológicos de conservación *ex situ* para plantas cultivadas

El grado de representación de las variedades tradicionales de los agricultores (variedades locales) en la conservación *ex situ* es poco conocido, en parte debido a la falta de métodos que puedan identificar los determinantes antropogénicos y ambientales de sus distribuciones geográficas. Ramírez-Villegas *et al.*, (2020) desarrollaron un nuevo marco de modelado espacial y de análisis de vacíos de conservación *ex situ* para variedades locales de cultivos, utilizando frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) como estudio de caso.

El modelado de cada una de las variedades locales incluyó cinco pasos principales: (1) determinar grupos relevantes de variedades locales utilizando literatura, de manera que, al probar modelos estadísticos de clasificación, fuera posible encontrar que existe una diferencia significativa entre ellos según las características ambientales y socioeconómicas de su distribución geográfica; (2) modelar la distribución geográfica potencial de estos grupos utilizando datos de presencia (local), contemplando predictores ambientales y socioeconómicos; (3) calcular puntajes de vacíos geográficos y ambientales para las colecciones actuales en bancos de germoplasma; (4) mapear los vacíos de conservación *ex situ*; y (5) compilar aportes de expertos (Ramírez-Villegas *et al.*, 2020).

La metodología, logró distinguir las distribuciones (Figura 10A) y las brechas de conservación para los dos principales grupos genéticos de frijol (andino y mesoamericano), y los resultados se alinearon bien con la opinión de expertos. Se encontró que ambos grupos genéticos estaban relativamente bien conservados en bancos de germoplasma, respecto a sus distribuciones geográficas previstas, con colecciones *ex situ* que representaban el 78.5% del grupo andino y el 98.2% del mesoamericano. Las prioridades de recolección de variedades locales mesoamericanas se concentran en varias zonas de México, Belice y Guatemala (Figura 10B).

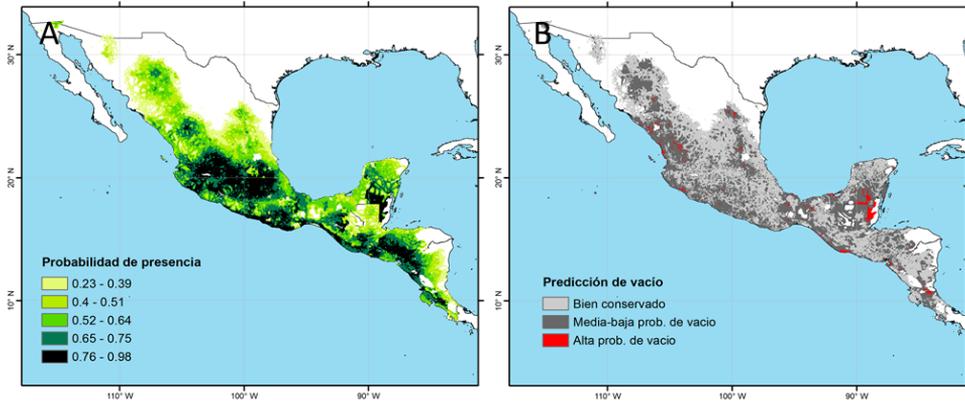


Figura 10. Distribución potencial (A) y análisis de vacíos geográficos de conservación *ex situ* (B) para variedades tradicionales del grupo genético mesoamericano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Datos y mapas derivado de Ramírez-Villegas *et al.*, (2020).

Literatura consultada.

- Alercia A, Diulgheroff, S; Mackay, M. 2015. Descriptores de pasaporte para cultivos múltiples FAO/BIOVERSITY V.2.1 [MCPD V.2.1] - diciembre 2015. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Bioversity International, 12 p. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/76136>. Consultado 21 Abril 2020
- Alneberg J, Bjarnason BS, De Bruijn I, Schirmer M, Quick J, Ijaz UZ, Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. *Nature Methods*. 2014;11:1144-1146.
- Ameur A, Kloosterman WP, Hestand MS. Single-molecule sequencing: towards clinical applications. *Trends in biotechnology*. 2019;37:72-85.
- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*. 2010;11:R106.
- Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinforma*. 2010;48-9843:00144-3.
- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Martin MJ. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. 2004;32:D115-D119.
- Balmford A, Crane P, Dobson A, Green RE, Mace GM. The 2010 challenge: data availability, information needs and extraterrestrial



- insights. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005;360:221–228.
- Balvočiūtė M, Huson DH. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*. 2017;18:114.
 - Bankevich, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal Comput. Biol.* 2012;19:455–477.
 - Peng Y, Leung HCM, Yiu SM, Chin FYL. IDBA – A Practical Iterative de Bruijn Graph De Novo Assembler. In: Berger B. (eds) *Research in Computational Molecular Biology. RECOMB 2010. Lecture Notes in Computer Science*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010;6044.
 - Bari A, Street K, Mackay M, Dag F, De-Pauw E, Amri A. Focused identification of germplasm strategy (FIGS) detects wheat stem rust resistance linked to environmental variables. *Genetics Resource Crop Evolution*. 2012;59:1465–148.
 - Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewlinger L, Eddy SR, Sonnhammer EL. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*. 2002;30:276–280.
 - Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114–2120.
 - Buermans HPJ, Den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842:1932–1941.
 - Callahan B, McMurdie P, Holmes S. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*. 2017;11:2639–2643.
 - Calle M. Statistical Analysis of Metagenomics Data. *Genomics Informatics*. 2019;17:e6.
 - Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010;7:335–336.
 - Castañeda NP, Vincent HA, Kell SP, Eastwood RJ, Maxted, N. Ecogeographic surveys. In Guarino L, Ramanatha Rao V, Goldberg E (editors). *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*. Bioversity International, Rome. 2011. Disponible en: https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=679.

- Castañeda-Álvarez NP, Khoury CK, Achicanoy HA, Bernau V, Dempewolf H, Eastwood RJ, Guarino L, Harker RH, Jarvis A, et al. Global conservation priorities for crop wild relatives. *Nature Plants* 2016;2:16022.
- CONABIO. Distribución conocida de biznaga tonel grande (*Echinocactus platyacanthus*). Distribución conocida. Catálogo de metadatos geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 2014. Disponible en: http://geoportal.conabio.gob.mx/metadatos/doc/html/echplat_gca_gw.html.
- Contreras TA, Cortés CM, Costich D, Rico AM, Magos BJ, Maxted N. Diversity and conservation priorities of crop wild relatives in Mexico. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 2019;17: 140-150.
- Darling AE, Jospin G, Lowe E, Matsen IV FA, Bik HM, Eisen JA. PhyloSift: phylogenetic analysis of genomes and metagenomes. *PeerJ*. 2014;2:e243.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Sundaresan V. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of US*. 2015;112:E911-E920.
- Escobar-Zepeda A, Vera-Ponce de Leon A, Sanchez-Flores A. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*. 2015;6:348.
- ESRI. Introducción a SIG. ArcGIS Resources. ESRI Company. 2013.
- FAO. Sistemas de Información Geográfica (SIG) en Salud Animal. Componentes y Funciones de los SIG. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2006. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/animal/sig/intro/compo.htm7
- FASTX-Toolkit. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 2015. Disponible en: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Merrick JM. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995;269:496-512.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. 2016;17:333.

- Hanson JO, Rhodes JR, Riginos C, Fuller RA. Environmental and geographic variables are effective surrogates for genetic variation in conservation planning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2017;114:12755–12760.
- Hoban S, Callicrate T, Clark J, Deans S, Dosmann M, Fant J, Gailing O, et al. Taxonomic similarity does not predict necessary sample size for ex situ conservation: a comparison among five genera. *Proc. R. Soc. B*. 2020;287:20200102.
- Hoban S, Kallow S, Trivedi C. Implementing a new approach to effective conservation of genetic diversity, with ash (*Fraxinus excelsior*) in the UK as a case study. *Biological Conservation*. 2018;225:10–21.
- INEGI, 2014. Sistema de Información Geográfica. Servicio Profesional de Carrera – Documentación. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/inegi/spc/doc/internet/sistemainformaciongeografica.pdf>.
- IPCC, 2007: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 2007
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 2000;28:27-30.
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *Journal of Molecular Biology*. 2016;4284:726-731.
- Kang DD, Froula J, Egan R, Wang Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*. 2015;3:e1165.
- Houry CK, Amariles D, Soto JS, Diaz MV, Sotelo S, Sosa CC, Ramírez-Villegas J, et al. Data for the calculation of an indicator of the comprehensiveness of conservation of useful wild plants. *Data in Brief*. 2019a;22:90-97.
- Houry CK, Amariles D, Soto JS, Diaz MV, Sotelo S, Sosa CC, Ramírez-Villegas J, et al. Comprehensiveness of conservation of useful wild

- plants: an operational indicator for biodiversity and sustainable development targets. *Ecological Indicators*. 2019b;98:420-429.
- Khoury CK, Carver D, Barchenger DW, Barboza G, van Zonneweld M, Jarret R, Bohs L, *et al.* Modeled distributions and conservation status of the wild relatives of chile peppers (*Capsicum* L). *Diversity and Distributions*. 2019c;26:209-225.
 - Khoury, C. K., Carver, D., Greene, S. L., Williams, K. A., Achicanoy, H. A., León, B., Wiersema, J. H. and Frances, A. Crop wild relatives of the United States require urgent conservation action. *Proceedings National Academic Science of USA*. 2020;117:33351-33357.
 - Khoury CK, Carver D, Kates HR, Achicanoy HA, van Zonneweld M, Thomas E, Heinitz C, *et al.* Distributions, conservation status, and abiotic stress tolerance potential of wild cucurbits (*Cucurbita* L.). *Plants, People, Planet* 2019d;2:269-283.
 - Kislyuk A, Bhatnagar S, Dushoff J, Weitz JS. Unsupervised statistical clustering of environmental shotgun sequences. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:316.
 - Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Melnik AV. Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16:410-422.
 - Krueger F. Trimgalore. A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. 2015;516:517.
 - Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*. 2009;10:R25.
 - Lebeda A, Křístková E, Kitner M, Majeský L, Doležalová I, Khoury CK, Widrlechner MP, *et al.* Research gaps and challenges in the conservation and use of North American wild lettuce germplasm. *Crop Science*. 2019;59:2337-2356.
 - Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323.
 - Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25:1754-1760.
 - Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics

- assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*. 2014;31:1674–1676.
- Maxted N, Magos BJ, Kell S. Resource book for preparation of national conservation plans for crop wild relatives and landraces. University of Birmingham. United Kingdom. 2013. Disponible: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/PubPGR/ResourceBook/TEXT_ALL_2511.pdf.
 - McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*. 2013;8:e61217.
 - Mezghani N, Khoury CK, Carver D, Achicanoy HA, Simon P, Martínez FF, Spooner D. Distributions and conservation status of carrot wild relatives in Tunisia: a case study in the Western Mediterranean Basin. *Crop Science*. 2019;59:1–12.
 - McCall KM. Seeking good governance in participatory-GIS: a review of processes and governance dimensions in applying GIS to participatory spatial planning, *Habitat International*. 2003;27:4.
 - Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, Blum M, Bork P, Bridge A, Gough J. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*. 2019;47:D351-D360.
 - NOM-059-SEMARNAT 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestre-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial de la Federación, Noviembre 30, 2010. México.
 - Norton SL, Khoury CK, Sosa CC, Castañeda-Álvarez NP, Achicanoy HA, Sotelo S. Priorities for enhancing the *ex situ* conservation and use of Australian crop wild relatives. *Australian Journal of Botany*. 2017;65:638-645.
 - Olaya V. Sistemas de información geográfica. Proyecto OSGeo. España. 2014. Repositorio libre: <https://github.com/volaya/libro-sig>
 - Parra M, Iriondo JM, Torres E. Review. Applications of ecogeography and geographic information systems in conservation and utilization of plant genetic resources. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2012;10:419.
 - Perales H, Golicher D. Mapping the Diversity of Maize Races in Mexico. *PLOS One*. 2014;9: e114657.



- Ramírez-Villegas J, Khoury CK, Achicanoy HA, Mendez AC, Diaz MV, Sosa CC, Debouck DG, Kehel Z, Guarino L. A gap analysis modeling framework to prioritize collecting for *ex situ* conservation of crop landraces. *Diversity and Distributions*. 2020;26(6):730-742.
- Ramírez-Villegas J, Khoury C, Jarvis A, Debouck DG, Guarino L. A gap analysis methodology for collecting crop gene pools: a case study with *Phaseolus* beans. *PLoS One*. 2010;5:e13497.
- Rausch P, Rühlemann M, Hermes BM. *et al.* Comparative analysis of amplicon and metagenomic sequencing methods reveals key features in the evolution of animal metaorganisms. *Microbiome*. 2019;7:133.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26:139–140.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister E, *et al.* Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiol.* 2009;75:7537–7541.
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30:2068-2069.
- SGM. 2019. Sistemas de Información Geográfica. Museo Virtual. Servicio Geológico Mexicano. México. Disponible en: <https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/SIG/Introduccion-SIG.html>
- Siabato Willington. Sobre la evolución de la información geográfica: las bodas de oro de los sig. Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía. 2018;27:1-9.
- Smith B. D. Eastern North America as an independent center of plant domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2006;103:12223–12228.
- Strous M, Kraft B, Bisdorf R, Tegetmeyer H. The binning of metagenomic contigs for microbial physiology of mixed cultures. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:410.
- Tarazona S, Furio-Tari P, Turra D, Pietro AD, Nueda MJ, Ferrer A, *et al.* Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e140.

- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44:6614-6624.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 2009;25:1105–1111.
- Truong DT. *et al.* MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nature Methods*. 2015;12:902–903.
- Wood DE, Salzberg SL, Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*. 2014;15:R46
- Wu TD, Nacu S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*. 2010;26:873–881.
- Wu M, Eisen JA. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biology*. 2008;9:R151.
- Wu YW, Simmons BA, Singer SW. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2016;32:605-607.
- Yang IS, Kim S. Analysis of whole transcriptome sequencing data: workflow and software. *Genomics & Informatics*. 2015;13:119.



Capítulo 10

Repositorio de datos biológicos para la gestión de recursos genéticos

María Elena Castro¹, Ernesto Borrayo², Juan Carlos Alarcón Maldonado³

1.Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP. 2.Universidad de Guadalajara. 3.CIIMYT.
castro.elena@inifap.gob.mx

Introducción

La información biológica es un elemento fundamental para el adecuado uso y conservación de los recursos genéticos. Un recurso genético cualquiera (por muy valioso que pueda ser *per se*) sin información asociada es completamente inútil ya que no permite asociar este elemento con otros, determinar sus posibles aplicaciones o generar conocimiento nuevo (Painting, 1993). Es evidente que el adecuado manejo de la información asociada a los recursos genéticos es tan valioso como el recurso genético en sí mismo, y que ésta juega un papel fundamental tanto en la conservación como en el uso de mencionados recursos.

Uno de los retos actuales en torno a la información biológica asociada a los recursos genéticos es que ésta (cuando está disponible) no necesariamente se encuentra completa y/u organizada, de tal forma que es verdaderamente complicado darles algún sentido útil a los datos vinculados con los germoplasmas (Painting, 1993). Es fundamental para cualquier persona relacionada con los recursos genéticos (estudiantes, investigadores, resguardantes, curadores, usuarios finales, etc.) disponer de información accesible, confiable, depurada y organizada para el adecuado desarrollo de sus actividades.

En este capítulo se aborda la importancia y los retos existentes en el adecuado manejo de la información biológica en la gestión de recursos genéticos, se explica el contexto internacional en relación a los esfuerzos que se han realizado para la homogeneización de criterios, normalización,



almacenamiento e intercambio de dicha información. Se presentan las características particulares de la conservación en términos de la información biológica, donde se ahonda en tres aspectos particulares:

a) la información referente a la colecta, el ingreso, manejo y almacenamiento de muestras; b) el uso de dicha información y c) cómo se comparte la misma.

Asimismo, se explora el estado del conocimiento en el manejo de la información biológica en México, así como algunas de las plataformas más usadas a nivel mundial para el manejo de los recursos genéticos, mismas que se han convertido en modelos a seguir para el manejo de información biológica. Después se aborda la solución que presenta el CNRG para el manejo de la información biológica, desde los retos particulares que enfrenta el Centro hasta el cómo se han superado las dificultades en torno a la organización, normalización, gestión, uso e intercambio de dicha información, así como un análisis sobre los alcances, las capacidades, las perspectivas y los retos que aún quedan por resolver.

Métodos de conservación o caracterización.

La recopilación y manejo de la información biológica necesaria para la conservación, caracterización y adecuado uso de los recursos genéticos, se puede abordar de manera general desde tres enfoques diferentes. El primero de ellos tiene que ver con la información referente a la identidad biológica, la colecta, el ingreso y el almacenamiento de las muestras; el segundo tiene que ver con la información relacionada con el uso (o potencial uso) del recurso genético; mientras el tercero está relacionado con los mecanismos necesarios para el adecuado acceso, intercambio y enriquecimiento de la información.

La información principal del recurso genético, tiene que ver con los datos mínimos que requiere una accesión del mismo para poder formar parte de una colección cualquiera. Esta se refiere a los llamados “*datos pasaporte*” y se han propuesto diferentes elementos de información que los comprenden según el European Search Catalogue for Plant Genetic Resources (EURISCO), pero en términos generales incluyen la información referente a la colecta, el ingreso a la colección y el manejo del recurso.

Estos datos permiten relacionar cada muestra de germoplasma con su identidad biológica a diferentes niveles taxonómicos, así como el espacio



geográfico de origen, el tipo de muestra, las recomendaciones para su conservación, existencia de respaldos y, en su caso, propiedad intelectual asociada. Esto permite obtener información importante sobre el recurso genético, que será de utilidad para la posterior experimentación, uso y manejo del mismo.

Sin embargo, los Datos Pasaporte no son los únicos datos que deben encontrarse asociados a los recursos genéticos, ya que las actividades relacionadas con su almacenamiento y manejo (como se ha discutido en los capítulos relacionados a cada tipo de recurso) involucran un estricto control de inventario. Idóneamente, los recursos genéticos son regenerados, replicados, experimentados, respaldados y distribuidos para su uso. Esto tiene como consecuencia natural que el abordaje de los datos de los recursos genéticos no solamente esté ligado a su naturaleza biológica u origen, sino a funciones operativas y logísticas tales como inventarios, calendarios y localización de respaldos e identificación de los usos que se le darán a cada recurso (conservación, distribución, investigación, etc.).

De igual manera, es necesario tener la capacidad de compartir la información disponible de manera diferencial con los diferentes usuarios dentro de la institución, otras instituciones y el público en general, por lo que un adecuado sistema de acceso a la información es parte integral de la gestión de la información proveniente de los recursos genéticos.

Dado lo anterior, resulta evidente la necesidad de una aproximación a la información que requiere de un sistema de bases de datos que permita la integración de los tres conceptos ya detallados, el manejo de la información biológica y de conservación, el manejo operativo, y el acceso a la información por los diferentes usuarios. Las diferentes instituciones han dado solución a estos requerimientos de diversas formas, las más utilizadas en México se presentan a continuación.

GRIN-Global.

Es el sistema global de gestión de información de bancos de germoplasma. El costo y los desafíos técnicos de desarrollar y mantener un sistema de gestión e información de bancos de germoplasma puede ser desalentador, el *Crop Trust* y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) han abordado estos desafíos a través de la evolución del sistema de información GRIN (Germplasm Resource



Information Network) en un escalable y flexible sistema sin costo alguno, llamado GRIN-Global. El objetivo del desarrollo del sistema GRIN-Global es proporcionar a los bancos de genes de cultivos del mundo un sistema de gestión de información de recursos genéticos vegetales poderoso, flexible y fácil de usar que constituirá la piedra angular para una red global eficiente y efectiva de bancos de germoplasma para salvaguardar permanentemente los recursos genéticos vegetales vitales para seguridad alimentaria mundial, y alentar el uso de estos recursos por parte de investigadores, criadores y productores agrícolas. Al mejorar la capacidad de los bancos de germoplasma para proporcionar datos a un sistema de información de nivel de acceso global, será posible evaluar con mayor precisión el *estado del mundo* para los recursos fitogenéticos e identificar necesidades globales prioritarias para la conservación de los recursos fitogenéticos.

GRIN-Global es utilizado actualmente por trece bancos de germoplasma a nivel mundial, cuatro en el Consorcio para la Investigación Agrícola (CGIAR) y nueve en programas nacionales. Otros veinticuatro bancos, incluidos cuatro del CGIAR, están evaluando o están en proceso de implementación de GRIN-Global como su principal sistema de gestión de sus bancos de germoplasma. En México, el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ubicado en Texcoco, Estado de México, es una organización de investigación y capacitación sin fines de lucro (<https://www.cimmyt.org/es/acerca-del-cimmyt/>) perteneciente al CGIAR y cuyo banco de germoplasma cuenta con un notable catálogo de diversidad genética viva que comprende más de 28,000 colecciones únicas de semillas de maíz y 150,000 de trigo gestiona todas las actividades y datos generados del banco de germoplasma con el sistema GRIN-Global (<https://www.cimmyt.org/es/nuestro-trabajo/recursos-geneticos/>).

GRIN-Global es una opción real para cualquier institución que cuente con un banco de germoplasma de recursos fitogenéticos ya que gestiona los procesos y almacena los datos generados por las actividades diarias de los bancos. Además de no tener costo alguno y, al ser un sistema de código abierto, cualquier usuario puede obtener este código (<https://gitlab.com/GRIN-Global>) y modificarlo según sea su conveniencia.

Genesys.

Genesys es una base de datos que permite a los usuarios explorar la diversidad mundial de cultivos conservada en bancos de germoplasma a través de un solo sitio web. No es un sistema de gestión de bancos de germoplasma; sin embargo, permite a los bancos de germoplasma, instituciones y centros de investigación publicar los datos de sus accesiones en el portal. Es un repositorio que permite publicar los datos relacionados a las accesiones de un banco de germoplasma y que reúne una gran cantidad de información debido al gran número de instituciones de todo el mundo que contribuyen a ello y permitiendo que a través de un solo sitio web se encuentre la información deseada; sin embargo, es importante tomar en cuenta que no es un sistema que gestione las actividades diarias de un banco de germoplasma, sino un repositorio de información a nivel mundial.

Actividades del CNRG.

Dadas las características del CNRG que alberga cinco tipos de germoplasma, para el manejo y documentación de la información al inicio se recurrió a diferentes plataformas que están disponibles para su uso libre, ya que no existía un sistema integral para el manejo de los cinco.

Cada una de estas plataformas está dedicada a un solo tipo de germoplasma, para el caso de los recursos fitogenéticos se implementó el sistema GRIN-Global el cual nos brinda la oportunidad de almacenar, manejar y compartir la información capturada con investigadores del mismo Instituto. Para el caso de los recursos genéticos pecuarios se implementó la plataforma Animal-GRIN, desarrollada por la Agricultural Research Service (ARS).

Este es un sistema que se configura en un servidor web y al igual que GRIN-Global se puede configurar para adaptarlo al banco de germoplasma, permitiendo también capturar la taxonomía que se requiera, aunque no se tiene el control de administrador.

Para el caso de los recursos genéticos microbianos se utilizó la base de datos World Data Centre for Microorganisms (WDCM) y una base de datos en Excel creada específicamente por ellos.

Sistema integral CNRG.

A pesar de que se han desarrollado varias bases de datos para el manejo de recursos genéticos y de los muchos beneficios brindados por los



sistemas implementados antes mencionados, una limitante importante para el CNRG, es que dichos sistemas de información obligan a manejar la información de manera independiente por cada laboratorio/subsistema. Esto deriva no sólo en una considerable redundancia en la información, sino además dificulta el adecuado intercambio de información inter-subsistema, entorpece el manejo relacionado con el almacenamiento, la regeneración, el uso y la distribución de los recursos genéticos. El CNRG requiere un sistema integral para el almacenamiento y manejo de la información en el cual se puedan unificar los cinco subsistemas independientemente de las considerables diferencias que existen en las características de la información de sus respectivos recursos.

Para esto, se comenzó el desarrollo de un sistema de bases de datos que permitiera un manejo fácil y adecuado de la información entre las colecciones de germoplasma del CNRG, este fue un trabajo que se inició en conjunto con la Universidad de Tsukuba (UT) y el entonces National Institute of Agrobiological Sciences --ahora National Agriculture and Food Research Organization (NARO). En 2015 como parte del proyecto "Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)" un nuevo programa internacional de investigación financiado por la Japan Science and Technology Agency (JST) y por la Japan International Cooperation Agency (JICA), implementado entre UT/NARO y el CNRG-INIFAP, que inició operaciones en el año 2012.

Esta cooperación entre México y Japón inició desde el proceso de establecimiento del CNRG en el cual Investigadores de la UT y NARO apoyaron en el área de manejo de germoplasma y diferentes enfoques de conservación *in vitro*.

El proyecto de cooperación fue propuesto para fortalecer la capacidad del CNRG y generar información de especies de plantas alimenticias de interés entre México y Japón. Se contemplaron tres metas: 1) evaluación de la diversidad genética y estrategia de utilización sustentable en el CNRG, 2) establecimiento de métodos de conservación a largo plazo para especies específicas y preparación de manuales relevantes y 3) definición de estrategia de acceso y distribución de beneficios en el CNRG.

Como parte de los objetivos de la meta tres, se contempló el de construir un sistema de acceso a la información referente a los datos pasaporte de

los recursos genéticos. Por lo que, se estableció el objetivo particular de desarrollar un sistema de base de datos para datos pasaporte.

Modelo de Base de datos del CNRG.

Derivado de este proyecto se planeó la estrategia para el manejo de los datos pasaporte. Esto permitió la proyección de un sistema de bases de datos mucho más robusto al originalmente planteado. Sin embargo, dada la complejidad del sistema completo, se decidió un abordaje gradual para el mismo, donde el desarrollo y la implementación de la base de datos pasaporte sería prioritaria, de tal forma que el objetivo relacionado con el manejo de la información de la meta 3 del proyecto de SATREPS fuese cubierto adecuadamente.

El sistema integral de bases de datos del CNRG contempla cuatro bases de datos. La primera, ya mencionada, contiene todos los datos pasaporte de los recursos genéticos. La segunda, comprende la localización de los recursos genéticos dentro del Centro. La tercera, incorpora toda la información relacionada a características para cada accesión, como lo son la evaluación, el genotipo, el fenotipo, así como imágenes tanto de la accesión como de su entorno y usos. La cuarta, consiste en una base de datos en web para la consulta pública de la información, así como para el adecuado intercambio de información con otras bases de datos del mundo.

Desarrollo e implementación de la base de datos (BD) pasaporte. Diseño.

Se desarrolló el diseño del esquema de la BD de datos pasaporte en el cual se incluyen los cinco subsistemas de germoplasma.

Para el esquema de la Base de Datos Pasaporte (BDP) se utilizó el modelo de bases de datos relacional con el Sistema de Gestión de Base de datos Relacional (RDBMS) por medio del lenguaje de consulta estructurado MySQL (ref) y se utilizó la lista de datos pasaporte de EURISCO que es un estándar internacional para el manejo de información y que permite el intercambio adecuado de información con otros sistemas de BD del mundo.

Uno de los retos más importantes radica en las enormes diferencias entre la información relevante para cada subsistema, así como solucionar el intercambio de información entre estos, ya que un mismo organismo puede pertenecer a más de un subsistema en determinadas



circunstancias. Para dar solución a esta problemática, se recopiló información a partir de las diferentes formas que se tenían para registrar los datos del germoplasma y en conjunto con los curadores de cada subsistema se realizó el diseño del esquema, que derivó en la definición puntual del concepto de *Accesión*, así como el concepto de *Unidad de Germoplasma*.

Número de colección y Unidad de Germoplasma.

Uno de los objetivos principales es reducir al máximo la redundancia de información y poder unificar todos los subsistemas a nivel de accesión con un identificador, este identificador cumple con una definición interna de accesión; los criterios para la designación de una accesión consideran la taxonomía, referencia geográfica y fecha de colecta, entre algunos otros criterios específicos por el tipo de germoplasma, así que, si la información de estos criterios es la misma, las muestras comparten el identificador. El concepto de Unidad de Germoplasma permite lograr un identificador único para cada accesión independientemente del subsistema que la maneje, conservando la pertenencia a la accesión respectiva (Castro-Cortes *et al.*, 2018). La Unidad de Germoplasma contiene información relevante respecto a almacenamiento, tipo de muestra, origen, etc. conservando relación con los datos vinculados al Número de Colección, donde están los datos taxonómicos, de geolocalización y fecha de colecta. En consecuencia, elementos que tradicionalmente eran almacenados como accesiones independientes ahora serán almacenadas como un subgrupo del mismo número de colección. Este concepto permite manejar diferentes germoplasmas independientemente del tipo de muestra, tratamiento, el laboratorio en donde se encuentran, su ubicación física y el subsistema al que se encuentran asociadas.

Templado.

Una vez terminado el diseño del esquema se diseñó un templado en Excel (Microsoft) con todos los campos ordenados por categorías y con una clasificación general para todos los tipos de germoplasma y una particular para cada uno de ellos, aunque esto no impide que, si se requiere, se puedan utilizar campos exclusivos de otro tipo de germoplasma, lo cual permite al esquema ser flexible. Con éste templado se facilita la captura de los datos.

Sistema de entrada/salida.

Se diseñó un sistema de entrada/salida de datos en PHP, el cual de forma automática realiza la discriminación de criterios para hacer la asignación de una nueva accesión o de una unidad de germoplasma de una accesión ya existente. Para utilizar este sistema en la inserción de datos se utilizan los datos capturados en el templado en Excel.

Interfaz web.

Para la recuperación de información de la BD de datos pasaporte de forma fácil se diseñó y desarrollo de una interfaz web que permitiera a los usuarios curadores y técnicos realizar consultas de la información que corresponda al subsistema con el que trabajan (Chavez-Flores, 2018).

En esta interfaz se cuenta con un sistema de acceso restringido con diferentes perfiles de permisos. El acceso de Curador tiene acceso a todas las funciones de captura, edición y consultas básicas y avanzadas aplicando filtros de acuerdo a las necesidades de cada usuario, la información se puede visualizar por accesión y por Unidad de Germoplasma, así también puede obtener reportes personalizados en un archivo en formato PDF y en formato csv, este último puede ser utilizado en otros programas que requieran de este formato. Por otro lado, el perfil de técnico se encuentra limitado a realizar consultas y generar reportes de la información, mientras que el perfil de público, permite a cualquier usuario sin necesidad de registrarse consultar información básica del germoplasma que se tiene resguardado en el CNRG y generar un reporte con mínimo pero suficiente información. Esto permite el control sobre la visualización, la modificación y la eliminación de información.

Desarrollo e implementación del sistema completo.

Actualmente se cuenta con el diseño del esquema de la BD de localización de las accesiones y UG dentro del CNRG y con un templado en Excel para comenzar con el llenado de la información y continuar con la relación a la BD para datos pasaporte. A la par, se comenzará con el diseño del esquema de la BD de características.

Fortalezas y capacidades.

El sistema de BD se encuentra alojado en un servidor en las Oficinas Centrales del INIFAP con 5429 accesiones y 7875 UG de los subsistemas de semillas ortodoxas, *in vitro*, microorganismos y pecuario, cuenta con cinco usuarios curadores, cinco usuarios técnicos y un administrador, por el momento sólo se tiene acceso localmente.

Se podrá realizar la captura de la información de datos pasaporte de todas las accesiones y UG que se resguarden en el CNRG y se podrán registrar tantos usuarios como sean necesarios.

Conclusiones.

La implementación del SBD cubre la necesidad de contar un con un sistema integral para el manejo adecuado de la información de los recursos genéticos resguardados en el CNRG, solventando las limitaciones previas derivadas por el uso de sistemas independientes. Aun cuando por el momento el manejo de la información es sólo de datos pasaporte, este abordaje es pionero en la materia y será de utilidad para usuarios a diferentes niveles; posteriormente representará una alternativa para el manejo de toda la información (pasaporte, características, logística, etc.) implementable por cualquier institución relacionada con el manejo de los recursos genéticos.

Literatura consultada.

- Castro-Cortes ME, Martínez-Peña MD, Arteaga-Garibay RI, Álvarez-Gallardo H, Cortés-Cruz MA, *et al.* Sistema de Base de Datos pasaporte para las colecciones de germoplasma del CNRG-INIFAP. Simposio Internacional de Recursos Genéticos para las Américas y el Caribe. Guadalajara, México. INIFAP. 2018;1(1).
- Chávez-Flores E. 2018. Residencia Profesional. Tecnológico Nacional de México. Arandas. México.
- Machida-Hirano R, Cortés-Cruz M, Shirata K, Castillo-Martínez R, Niino T, De la Torre-Sánchez JF, Kawase M, Fernández-Rivera S, Watanabe K. Diversity assessment and development of sustainable use of Mexican genetic resources: Prospects of a SATREPS Project. *Tropical Agricultural Development*. 2014;58:37-41.
- Painting KA, Perry MC, Denning RA, Ayad WG. 1993. Guía para la Documentación de Recursos Genéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma.



- Yamasaki F, Borrayo E, Castro-Cortes ME, Martínez-Peña MD, Takeya M. Development of a national center of genetic resources passport database: managing agriculture, forestry, livestock, microbial, and aquatic genetic resources with an integrated schema. JARQ. 2016;50:387-393.

La presente publicación se terminó de imprimir
en los talleres gráficos de Prometeo Editores S.A. de C.V.
Libertad 1457, Colonia Americana, Guadalajara, Jalisco, México
C.P. 44160. Tel. (33) 3826 2726 y 82
E-mail: prometeoeditores@prodigy.net.mx

Tiraje de 600 ejemplares

Impreso en México / Printed in Mexico

La presente obra es parte de las celebraciones del INIFAP por los 10 años de desarrollar actividades de conservación en el Centro Nacional de Recursos Genéticos y donde el lector tendrá la oportunidad de adentrarse en temas de mucho interés en recursos genéticos, no solamente como una introducción al tema si no como una guía de la infraestructura con la que se cuenta en el CNRG, incluyendo también temas de actualidad donde se esta generando nueva información de manera constante. Al mismo tiempo nos señale los caminos para acceder a información especializada, cuando sea menester hacerlo.