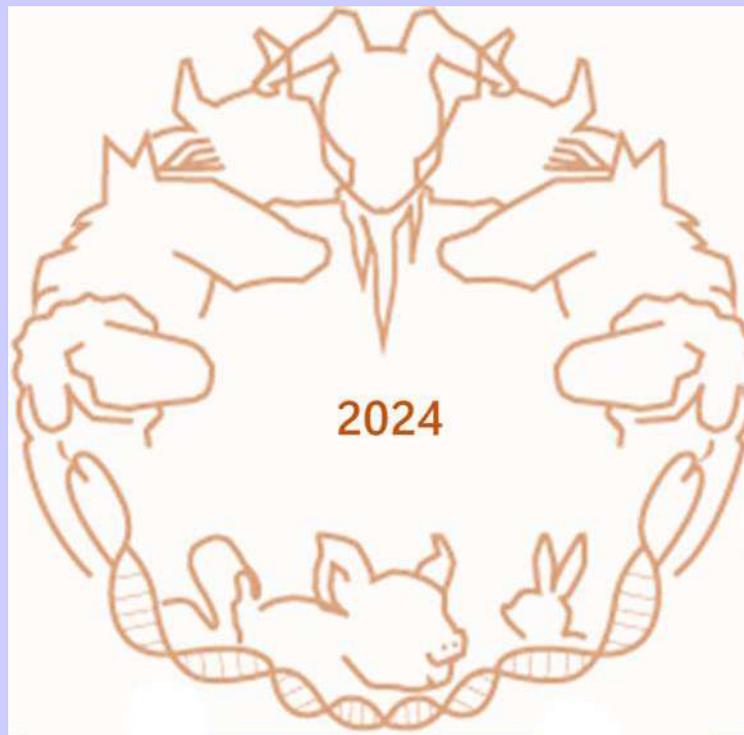


Breve recorrido por la investigación de recursos zoogenéticos en México.



Coordinadores

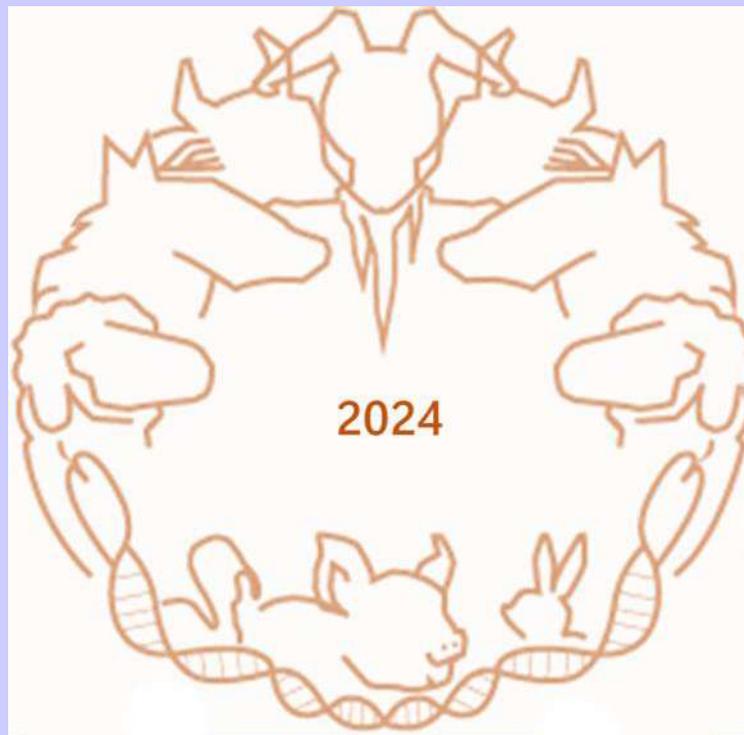
Cuerpo Académico Ciencias Veterinarias Aplicadas al Desarrollo Regional

Gisela Fuentes Mascorro, Miguel Ángel Domínguez Martínez y

Fernando Cuauhtémoc Solís Cortés



Breve recorrido por la investigación de recursos zoogenéticos en México.



Coordinadores

Cuerpo Académico Ciencias Veterinarias Aplicadas al Desarrollo Regional

Gisela Fuentes Mascorro, Miguel Ángel Domínguez Martínez y

Fernando Cuauhtémoc Solís Cortés

Breve recorrido por la investigación de recursos zoogenéticos en México.

©2024

Editorial.

Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca
Av. Universidad s/n, col. Cinco Señores. C.P. 68120
Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

<https://uabjo.slm.cloud/>

Todos los derechos reservados. Este libro está protegido por los derechos de autor. El material creado por los autores puede ser distribuido, copiado y exhibido por terceras personas siempre que se cite la obra y otorguen los créditos correspondientes. De lo contrario puede configurarse el delito de plagio.

Primera edición, 2024

ISBN versión electrónica: 978-607-8815-27-2

Este libro fue arbitrado por pares académicos de los comités científicos interno y externo de la Red Mexicana Sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos, con motivo de la 12 Reunión Internacional de la Red.

Portada y cuidado editorial: Cuerpo Académico Ciencias Veterinarias Aplicadas al Desarrollo Regional CiVADeR.

Arbitraje.

El contenido de los textos fue arbitrado por el Comité Científico del 12 Congreso Internacional. Red Mexicana Sobre Conservación y Utilización de los Recursos Zoogenéticos. A.C. En sistema de doble ciego. Los trabajos presentados por miembros del comité interno fueron evaluados por el comité externo, se cuidó que los trabajos en los que se encontraba algún miembro del comité interno fueran evaluados por miembros del comité externo sin lazos de trabajo en conjunto. La decisión de los árbitros fue inapelable. Los formatos de arbitraje fueron entregados al Comité Editorial de la UABJO, para su confirmación y resguardo.

Comité científico interno.

Cuerpo Académico Ciencias Veterinarias Aplicadas al Desarrollo Regional CiVADeR - UABJO

Dr. Miguel Ángel Domínguez Martínez

Dra. Gisela Fuentes Mascorro

M en C Fernando Cuauhtémoc Solís Cortes

M en C Luz María Ramírez Acevedo DxVet

M en C Adán Altamirano Zárate

PM en C Gustavo Ramos López

Cuerpo Académico Investigación en Producción Animal CAIPA-UABJO

PhD. Jorge Hernández Bautista

Dr. Teódulo Salinas Ríos

Dr. Héctor Maximino Rodríguez Magadán

Comité científico externo:

Dr. Marco Antonio Vázquez Dávila ITVO

Dr. Raúl Andrés Perezgrovas Garza UnACh

Dr. Víctor Hugo Severino Lendecky UnACh

Dr. Marco Antonio Camacho Escobar UMAR

Dra. Adelfa del Carmen García Contreras UAM-X

Dr. Jesús Alberto Guevara González UAM-X

M en C Gladys Isabel Manzanero Medina CIIDIR-Oaxaca

M en C Aurora Xolalpa Aroche UIMQRoo.

El presente texto cuenta con marcos de los colores
producidos por la grana cochinilla en rojo y el
caracol púrpura, dos recursos zoogenéticos prehispánicos
que se siguen empleando en Oaxaca.

En la parte inferior se encuentran
de izquierda a derecha los símbolos del calendario ritual mexica
para: flor emergiendo de la tierra, lluvia, piedra o pedernal,
movimiento, buitre y águila, del código Laúd o Laudianus.



ÍNDICE

Capítulo 1 Recursos zoogenéticos	
Se hace camino al andar. De los “animales corrientes” a los recursos zoogenéticos globales	1
Recursos zoogenéticos prehispánicos que aún se usan en Oaxaca	12
Del guajolote silvestre al pavo doble pechuga	21
Análisis genético de poblaciones de ganado local del estado de Oaxaca	29
Cuento ¿Por qué debemos conservar las cabras de la Mixteca?	42
Capítulo 2 Genética y biotecnología de razas locales	
Comparación de la vitrificación y congelamiento lento sobre la viabilidad de embriones ovinos producidos <i>in vitro</i>	46
Viabilidad de embriones del gusano de la seda después de ser expuestos a diferentes crioprotectores	53
Uso de chips SNP50K para estudios genéticos del cerdo pelón/lampiño en México. Ejemplo Yucatán	58
Sistema para evaluar el estrés del retículo endoplásmico en <i>Apis mellifera</i>	64
Repetibilidad de algunos caracteres reproductivos y productivos de ovejas de pelo en el sureste de México	77

Capítulo 3 Programas de selección de razas locales	
El ganado Suiz-Bú una raza de doble propósito: peso al nacer	82
Uso del ganado local como base de programas genéticos en Guadalupe y Calvo Chihuahua, México.	88
Factores que predisponen la tasa de morbilidad en gazapos durante la lactancia	94
Curva de crecimiento de pavos comerciales bajo condiciones tropicales	101
Capítulo 4 Conservación de la biodiversidad de las razas locales y fauna silvestre	
Situación y aprovechamiento del Pecarí de collar (Pecari tajacu) en unidades para el manejo y aprovechamiento de vida silvestre del estado de Yucatán	106
Evaluación de semen de zángano de <i>Apis mellifera</i>	113
Evaluación ecográfica del aparato reproductor de la hembra Pecarí de collar (Pecari tajacu)	119
Efecto del tratamiento hormonal sobre la actividad ovárica y tasa de gestación en vacas criollas de Nunkiní, Campeche	127
Indicadores de postura y eclosión de huevos de iguana verde (Iguana iguana) en Yucatán	132
Animales extraordinarios de las crónicas novohispanas tempranas	139
Crónicas relacionadas con la yegua de Juan Núñez Sedeño durante la conquista de México-Tenochtitlan	146
De lo divino a lo mundano: usos del jaguar por la población mexicana al inicio de la conquista	153
Conservación y aprovechamiento del banco de germoplasma apícola del INIFAP	160

Piezas antiguas de arte plumario hasta nuestros días; dos enfoques: Mexica y español	166
Clasificación de las gallinas desde la perspectiva de mujeres rurales	173
Resultados preliminares sobre la viabilidad y evaluación del semen de Pecarí de collar (Pecari tajacu) conservado en frío a diferentes tiempos de respuesta	180
Capítulo 5 Sistemas ganaderos sustentables y desarrollo ganadero local	
Caracterización de partos en borregas lecheras Assaf en una unidad de producción del estado de Hidalgo, México. Estudio preliminar	187
Comportamiento nocturno del <i>Gallus gallus domesticus</i>	194
Susceptibilidad de ovejas criollas y Suffolk a <i>Haemonchus contortus</i> durante el periodo periparto	200
Tasas de gestación utilizando embriones ovinos producidos in vitro: efecto de la etapa de desarrollo	207
Calidad seminal de los cerdos criollos del Valle del Mezquital	214
Índice gonadosomático testicular en machos del biotipo “ <i>Ts’üdi Xirgo</i> ”	218
Cambios morfológicos en el borrego Chiapas en un núcleo de selección abierto	222
Factores ambientales y su relación con el picaje y canibalismo en producción de pavos doble pechuga	227
Artrópodos y otros insectos asociados a la dieta de gallinas y pollos de traspatio en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, México	231
Cerdo patamuleño de la cuenca del Papaloapan. Descripción de una UPCPCP con fin zootécnico de producción de carne para abasto	241
Caracterización de las unidades de producción familiar de leche de bovinos en la región de Silao-Romita, Guanajuato	246

Capítulo 6 Gastronomía tradicional y productos de razas locales	
Características físico-químicas de la carne de cabritos lechales, pascuales, chivatos y cabras de descarte	252
Evaluación de calidad de carne de Guajolote Natico Mexicano (Meleagris gallopavo L) y su referencia con carne de pollo	258

PRESENTACIÓN

México cuenta con 71 pueblos indígenas (figura 1), cada uno de ellos poseedor de una gama de recursos pecuarios prehispánicos que están involucrados en su cosmovisión, algunos de estos recursos han sobrevivido y pueden seguir siendo usados, lamentablemente también existe una amplia cantidad de recursos que han desaparecido por falta de interés, negligencia, ignorancia, total desconocimiento y unas profundas ganas de no querer saber y reconocer por parte de los funcionarios gubernamentales, en todos los niveles desde local hasta nacional, además de la falta de identidad de innumerables catedráticos que pisan las aulas, pero jamás salen a conocer el lugar y entender el lugar en el que habitan.



Figura 1. Número de pueblos indígenas por estado, de acuerdo con la página de los pueblos indígenas de México. Mapa adaptado de Gerardo Montoya Pinterest, 2023.

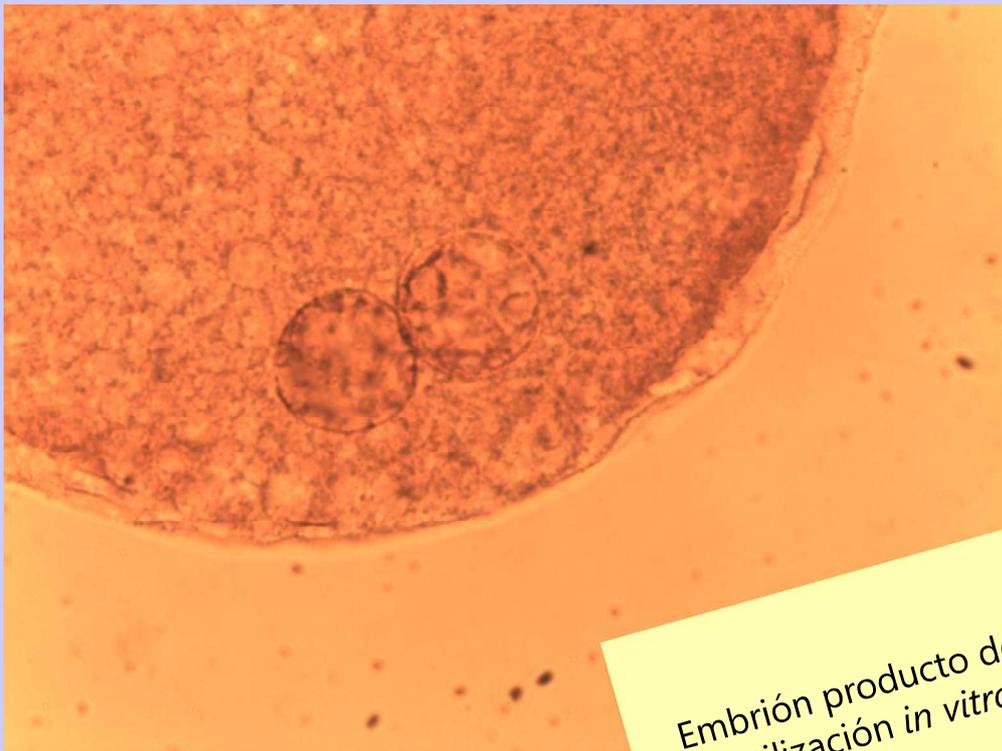
A esta gama se debe anexar la ganadería colonial, que después de instaurarse exitosamente en los ecosistemas apropiados para cada uno de ellos, se han mantenido generalmente en propiedad de los grupos indígenas, desarrollando las prácticas ancestrales bajo las cuales fueron criados desde la época prehispánica o colonial y que lamentablemente son despreciadas en la mayoría de las instituciones de educación superior, que poco o nada han hecho por entenderlas, estudiarlas y mejorarlas, pasando por alto que con algunos ajustes, pueden ser llevados al ámbito de la producción sustentable. En un país donde, de acuerdo con los datos del CONEVAL publicados en agosto de 2023 solo el 27.07% de la población no es ni pobre ni vulnerable, estamos hablando del sustento de 94 millones de personas.

El presente texto está comprendido por los trabajos extensos y posteriormente por los trabajos de investigación divididos en cinco áreas del conocimiento que brindan un breve panorama de lo que se hace por 18 Instituciones de Educación Superior de México, tres Universidades del extranjero y dos asociaciones de productores.

Este trabajo fue realizado por los Cuerpos Académicos Ciencias Veterinarias Aplicadas al Desarrollo Regional CiVADeR e Investigación en Producción Animal CAIPA, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, desde la publicación de la convocatoria hasta culminar con el arbitraje del conjunto de textos que se plasma en las páginas siguientes.

Dra. Gisela F. Mascorro.
Oaxaca de Juárez, Oax, 2024.

CAPÍTULO 2



Embrión producto de
fertilización *in vitro*
LIRA.

**Genética y biotecnología
de razas locales**

Comparación de la vitrificación y congelamiento lento sobre la viabilidad de embriones ovinos producidos *in vitro*

Comparison of vitrification and slow freezing on viability of *in vitro* produced ovine embryos

Zaira Paola González-Gómez^a, Horacio Álvarez-Gallardo^b, David Urbán-Duarte^b, Adriana Velázquez Roque^c, Francisco Javier Padilla-Ramírez^a.

^a Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias - Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria. Zaira Paola González-Gómez <https://orcid.org/0009-0004-8558-8444>, Email: zaira.gonzalez7628@alumnos.udg.mx, Francisco Javier Padilla-Ramírez <https://orcid/0000-0002-5388-3914>, Email: fjavier.padilla@academicos.udg.mx.

^b Centro Nacional de Recursos Genéticos. INIFAP Horacio Álvarez Gallardo <https://orcid.org/0000-0002-7200-8912>, David Urbán-Duarte <https://orcid.org/0000-0003-0820-8052> Email: urban.david@inifap.gob.mx.

^c H&A Biotecnologías en Reproducción Animal <https://orcid.org/0000-0002-7823-8073> Email: velazquezra0809@gmail.com.

Abstract:

The transfer of cryopreserved embryos has great potential to disseminate valuable genetics in sheep; however, a suitable protocol for cryopreservation of *in vitro* produced ovine embryos (IVP) is still being improved. A cryopreservation protocol would facilitate the conservation activities and the commercialization of IVP ovine embryos. The objective of this research was to evaluate vitrification and slow freezing cryotolerance of IVP ovine embryos. The IVP was performed with a continuous *in vitro* culture system based on IVF-Bioscience™ media, using ovaries collected in a slaughterhouse. On day 7 of *in vitro* culture, expanded blastocyst stage embryos, quality 1 and 2 (IETS) were divided in three groups (Control n=185), Vitrification group (VIT n=200) and Slow freezing group (SL n=200). For VIT, Cryotop device (Kitazato) was used. The SL was carried out with an automatic freezer (Cryologic 8800) using ethylene glycol (EG). The embryos (frozen/vitrified) were thawed/warmed and cultured for 48 h at 38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ at 100% humidity. Re-expansion and hatching rates were evaluated at 24 and 48 h. Statistical analysis was carried out using the Chi-squared procedure on the Jamovi software (version 1.2; The Jamovi project, Sidney, Australia). There were no significant differences (p>0.05) between the groups for re-expansion at 24 h and 48 h (62% and 59%; 20.5% and 21.5%), and for total re-expanded (82.5% and 80.5) respectively for VIT and SL. The percentages of hatching were 89.7%, 40%, and 64.5%, respectively for Control, VIT and SL being significantly different between three groups (p<0.05). There were significant differences (p<0.05) for hatching rates at 24 h and 48 h (86%, 33%, and 47%; 3.7%, 7%, and 17.5% respectively for

VIT and SL). In conclusion, under the conditions of this research, SL had better survival post-thawing for IVP ovine embryos compared to VIT.

Resumen:

La transferencia de embriones criopreservados tiene un gran potencial para diseminar genética valiosa en ovinos; sin embargo, aún hace falta un protocolo adecuado para la criopreservación de embriones ovinos (IVP) producidos *in vitro*. Un protocolo de criopreservación facilitaría las actividades de conservación y comercialización de embriones ovinos IVP. El objetivo de esta investigación fue evaluar la criotolerancia a la vitrificación y el congelamiento lento de embriones ovinos IVP. La IVP se realizó con un sistema de cultivo *in vitro* continuo con medios IVF-Bioscience™, a partir de ovarios recolectados en rastro. En el día 7 de cultivo *in vitro*, los embriones en estadio de blastocisto expandido, calidad 1 y 2 (IETS) se dividieron en tres grupos (Control n=185), Grupo de vitrificación (VIT n=200) y grupo de congelamiento lento (SL n=200). Para VIT, se utilizó el dispositivo Cryotop (Kitazato). El SL se realizó con una congeladora automática (Cryologic 8800) utilizando etilenglicol. Los embriones (congelados/vitrificados) se descongelaron/calentaron y cultivaron durante 48 h a 38,5 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂ y 90 % N₂ con 100 % de humedad. Se evaluaron las tasas de re-expansión y eclosión a las 24 y 48 h. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el procedimiento Chi-cuadrada en el software Jamovi (versión 1.2; The Jamovi project, Sidney, Australia). No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos para re-expansión a las 24 h y 48 h (62% y 59%; 20,5% y 21,5%) y para re-expansión total (82,5% y 80,5) respectivamente para VIT y SL. Los porcentajes de eclosión fueron 89,7%, 40% y 64,5%, respectivamente para Control, VIT y SL, siendo significativamente diferentes entre los tres grupos ($p < 0,05$). Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) para las tasas de eclosión a las 24 h y 48 h (86%, 33 % y 47 %; 3,7%, 7 % y 17,5 % respectivamente para Control, VIT y SL). En conclusión, bajo las condiciones de esta investigación, los embriones ovinos IVP tuvieron mayor viabilidad post-descongelación con SL en comparación con la VIT.

Introducción

En las últimas décadas, el uso de las técnicas de reproducción asistida (TRA) se ha implementado con el fin de ofrecer a los productores herramientas que les permitan mejorar la productividad de sus rebaños. La transferencia de embriones (TE) se ha convertido en una técnica indispensable para el mejoramiento genético de especies domésticas en el mundo [1]. Un componente crucial en la TE es la criopreservación. Existen dos técnicas principales para criopreservar embriones: el congelamiento lento (SL), que consiste en un descenso gradual y controlado de la temperatura, siendo este el más utilizado para criopreservar embriones ovinos y bovinos producidos *in vivo* [2] y la vitrificación (VIT), en la cual la caída de la



temperatura es ultrarrápida, pasando del estado líquido al vítreo [3,4,5]. La preservación de material genético, específicamente semen, ovocitos y embriones es fundamental para las TRA y programas de conservación [6], estas herramientas permiten optimizar el potencial de multiplicación de especies productivas, así como en peligro de extinción [3,7]. La aplicación de la mayoría de las biotecnologías reproductivas se ha generalizado en bovinos, siendo que en pequeños rumiantes se restringe casi en su totalidad al uso de la inseminación artificial [8], esto se debe al costo relativamente alto en comparación con el valor de los animales [9]. Entre las TRA se encuentra la producción *in vitro* de embriones (PIV), en pequeños rumiantes es una fuente que proporciona embriones a un bajo costo, ya sea para fines de investigación o comerciales para aplicaciones de otras biotecnologías [10], sigue habiendo factores que limitan que se puedan ampliar estas tecnologías debido a la baja calidad de los ovocitos después de la MIV, así como la baja criotolerancia embrionaria comparada con los que se obtienen *in vivo* [11], generalmente los producidos *in vivo* son de mayor calidad, dando como resultado mayor tasa de implantación, alta tasa de natalidad y supervivencia [12]. La baja criotolerancia de blastocistos PIV se relaciona con la acumulación excesiva de lípidos, la cual es favorecida por los medios de cultivo que contienen suero [13]. A pesar de esto, se han conseguido avances importantes en el manejo de embriones ovinos y caprinos, incluida la criopreservación de los mismos [14]. Los embriones, son muy sensibles a los daños que implica la criopreservación, tanto embriones producidos *in vivo* como *in vitro* presentan alteraciones a nivel morfológico y funcional, hay daño ultraestructural provocado por el daño a las células durante el proceso [9], estas afectaciones son provocados por el estrés térmico, osmótico y oxidativo [15,16] que causa el método de criopreservación.

Por todo lo anteriormente mencionado, el presente trabajo tiene el objetivo de evaluar la criotolerancia de embriones ovinos PIV utilizando VIT y SL.

Material y Métodos

Producción in vitro de embriones

Los ovarios fueron colectados en rastro, se transportaron por 2 h al laboratorio en solución salina fisiológica (0.9% NaCl), adicionada con penicilina G (100 UI/mL) y sulfato de estreptomycin (100 µg/mL), a una temperatura de 35 a 37°C. Los ovocitos se aspiraron mediante la técnica de aspiración folicular con aguja y jeringa [17]. Se seleccionaron ovocitos grados 1 y 2 [18], posteriormente se incubaron para su maduración en un medio BO-IVM (IVF Bioscience, Dinamarca) durante 24 h a 38.5°C y 5% de CO₂. Se transfirieron grupos de 17-20 ovocitos maduros a gotas de 50 µL de medio de fertilización BO-IVF (IVF Bioscience, Dinamarca) cubiertas con aceite mineral, para fertilizar se utilizó semen congelado, a una concentración de 2 x 10⁶, la capacitación espermática se realizó con la técnica Percoll de dos gradientes al 80% y 40 % [19]. La fertilización se realizó en condiciones de 100% de humedad, a 38.5°C, 5% de CO₂ durante 18 h. Los presuntos cigotos fueron denudados por agitación en vortex® durante 30 s, y posteriormente se colocaron en grupos de 50 presuntos



zigotos en pozos con 500 μ L de medio BO-IVC (IVF Bioscience, Dinamarca) cubiertos con aceite mineral, con mezcla de gases de 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ a 38.5°C y 100% de humedad. A las 56 h se revisó el porcentaje de divisiones y permanecieron hasta el día 6-7 post-fertilización. Los blastocistos expandidos calidad 1 [20] fueron seleccionados y puestos aleatoriamente en 3 grupos: el grupo control (embriones PIV frescos), el grupo criopreservado mediante vitrificación (VIT) y el grupo congelamiento lento (SL).

Criopreservación de embriones

Congelamiento lento

El SL se llevó a cabo con una congeladora automática Freeze Control CL-8800 (Cryologic™, Australia), se utilizó un protocolo con Etilenglicol, los embriones se colocaron en pajillas de 0.25 mL, la curva de descenso inició a los -6.5°C, se hizo el sembrado, se mantuvo durante 10 minutos y comenzó la curva de descenso a 0.5°C/min hasta llegar a -32°C permaneciendo por 10 minutos para posteriormente pasarse a nitrógeno líquido.

Vitrificación

Se utilizó como medio base TCM-199. El medio de equilibrio estaba compuesto por medio base adicionado con 10% de albumina sérica bovina (BSA), 7.5% de DMSO y 7.5% de etilenglicol. El medio de vitrificación compuesto de medio base más 10% de BSA, 15% de DMSO, 15% etilenglicol y 0.5 M de sacarosa. Para realizar la vitrificación se utilizó el dispositivo Cryotop (Kitazato™), para lo cual, los embriones se colocaron en una gota de 100 μ L de medio de equilibrio durante 1 minuto, luego se pasaron a una gota de 20 μ L de medio de vitrificación y después se colocaron en el Cryotop con una ligera capa de medio de vitrificación que solo cubrió al embrión y finalmente se colocaron en nitrógeno líquido en un periodo no mayor a 30 segundos.

Descongelamiento y calentamiento de embriones

Los embriones se descongelaron y calentaron para colocarlos en cultivo *in vitro* y evaluar la eficiencia de ambos métodos de criopreservación.

Para la descongelación, los embriones se sacaron del nitrógeno líquido y se dejaron 10 segundos al aire y posteriormente se colocaron en agua a 30°C, se enjuagaron en medio IVC y se evaluaron a las 24 y 48 horas post-descongelado.

Para el calentamiento, los medios están compuestos de medio base (PBS adicionado con 0.4% de BSA) más sacarosa al 1, 0.5 y 0.25 M. El calentamiento se realizó de forma secuencial, iniciando en solución de calentamiento con 1 M de sacarosa (1 minuto), seguido de solución de calentamiento 0.5 M de sacarosa (1 minuto), 0.25 M (1 minuto), por último un enjuague con medio IVC y se dejaron en cultivo en medio IVC, evaluándose a las 24 y 48 horas post-calentamiento.



Análisis estadístico

Las variables de respuesta a evaluar fueron re-expansión total, re-expansión a las 24 h y 48 h, eclosión total y eclosión a las 24 h y 48 h. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el procedimiento Chi-cuadrada del software Jamovi (versión 1.2; The Jamovi Project, Sidney, Australia).

Resultados

Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) para las variables de re-expansión a las 24 h y 48 h (62% y 59%; 20,5% y 21,5%) y para re-expansión total (82,5% y 80,5) respectivamente para VIT y SL.

En cuanto a la eclosión, se obtuvieron 89,7%, 40% y 64,5%, respectivamente para los grupos Control, VIT y SL, siendo significativamente diferentes entre los tres grupos ($p < 0,05$). Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) para las tasas de eclosión a las 24 h y 48 h (86%, 33% y 47%; 3.7%, 7% y 17,5% respectivamente para Control, VIT y SL).

Discusión

De acuerdo con lo observado en lo referente a las variables de re-expansión, donde no hubo diferencia significativa entre métodos (VIT, SL), es claro que ambos procesos de criopreservación mantienen la viabilidad de los embriones después del proceso de criopreservación.

La diferencia entre los porcentajes de eclosión obtenidos con VIT y SL, pueden deberse a que existen reportes que mencionan que el proceso de criopreservación afecta la zona pelúcida endureciéndola [21, 22], así como la exposición prolongada de los embriones a condiciones de cultivo artificiales [23, 24] lo cual interfiere de forma negativa con el proceso de eclosión. Por otra parte, se ha reportado que el proceso de vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* modifica la estructura de la zona pelúcida, disminuyendo de forma significativa tanto el diámetro como la cantidad de los poros de la zona pelúcida en comparación con los embriones congelados [25].

Conclusiones

En conclusión, bajo las condiciones de esta investigación, los embriones ovinos IVP tuvieron mayor viabilidad post-descongelación con SL en comparación con la VIT, lo cual presenta una alternativa con resultados prometedores para la conservación a largo plazo de los embriones ovinos PIV.



Referencias

- [1] Gibbson A., Cueto M. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos, segunda edición. INTA EEA Bariloche Centro Regional Patagonia Norte 2013; 2:1-44.
- [2] Dos Santos P., Cuadro N., Barrera M., Crispo A., Menchaca A. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology* 2017; 78: 8-14.
- [3] Shaw J., Oranratnachai A., Trounson A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 53: 59-72.
- [4] Kuleshova L., Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and sterility* 2002; 78: 449-454.
- [5] Mara L., Casu S., Carta A., Dattena. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science* 2013; 138: 25-38.
- [6] Mogas. Update on the vitrification of bovine oocytes and invitro-produced embryos. *Reprod Fertil Dev* 2019; 31: 105-117.
- [7] Holt W. Cryobiology, wildlife conservation & reality. *CryoLetters* 2008; 29: 43-52.
- [8] Isachenko, V. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 2003; 59: 1209-1218.
- [9] Bettencourt E., Bettencourt C., Silva JNCE., Ferreira P., de Matos C., Oliveira E, Romão R., Rocha A., Sousa M. (2009). Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology*. 947–958.
- [10] Cognié Y., Baril G., Poulin P., Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003; 59: 171-188.
- [11] Ferre L., Kjelland M., Strobech L., Hyttel P., Mermelloid P., Ross P. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2019; 1-14.
- [12] Zhu J., Moawad A., Wang C., Li H., Ren J., Dai Y. Advances in in vitro production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 2018; 6: S15-S26.
- [13] Romao R., Marques C., Baptista M., Barbas J., Horta A., Carolin, N., Bettencourt, E., Pereira R. (2015). Cryopreservation of in vitro-produced sheep embryos: Effects of different protocols of lipid reduction. *Theriogenology*. 84: 118-126.
- [14] Gupta, A., Singh, J., and Anzar, M. 2016. Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. *Anim Reprod Sci*. 164: 162-168.
- [15] Agca, Y., Liu, J., Peter, A. T., Critser, E. S. & Critser, J. K. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol. Reprod. Dev* 1998; 49: 408–415.



[16] Agca Y, Liu J, Rutledge JJ, Critser ES, Critser JK. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 212-9.

[17] Madani S, Marconetto A., De Nadai M., Bin C., Machaty Z., Vajta G. About oocytes and embryos 2022-2023; 2: 9-19.

[18] Hawk H., Wall R. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 1994; 41: 1571-1583.

[19] Velásquez-Roque A., Villaseñor-González F., Márquez-Márquez G., Kjelland M., Alvarez-Gallardo H., Romo S. Comparison of two percoll gradients for selection of frozen semen for in vitro production of ovine embryos. 2021.

[20] Palma G. *Biotecnología de la Reproducción*. Buenos Aires, Argentina: Reprobiootec 2008; 2: 237- 240.

[21] Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 1990 (2):547-53.

[22] Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(2):119-28.

[23] De Vos A, Van Steirteghem A. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. *Cells Tissues Organs*. 2000;166(2):220-7.

[24] Das M, Holzer HE. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil Steril*. 2012;97(5):1021-7.

[25] Moreira da Silva F, Metelo R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. *Reprod Domest Anim*. 2005;40(3):205-9.



Viabilidad de embriones del gusano de la seda después de ser expuestos a diferentes crioprotectores

Viability of silkworm embryos after exposure to different cryoprotectants

David Urbán-Duarte^a, Horacio Álvarez-Gallardo^a, Shuichiro Tomita^b, Hiroki Sakai^b, Hideki Sezutsu^b, Yooichi Kainoh^c, Seiichi Furukawa^c.

^a Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. David Urbán-Duarte, <https://orcid.org/0000-0003-0820-8052>, Email: urban.david@inifap.gob.mx; Horacio Álvarez-Gallardo, <https://orcid.org/0000-0002-7200-8912>, Email: alvarez.horacio@inifap.gob.mx.

^b Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization. Shuichiro Tomita, Email: tomita@affrc.go.jp; Hiroki Sakai, Email: sakaih786@affrc.go.jp; Hideki Sezutsu, Email: hsezutsu@affrc.go.jp; Keiro Uchino, <https://orcid.org/0000-0003-3650-7359>, Email: uchinok@affrc.go.jp.

^c Tsukuba University. Yooichi Kainoh, <https://orcid.org/0000-0002-7183-2483>, Email: kainoh.yooichi.gf@u.tsukuba.ac.jp; Seiichi Furukawa, Email: furukawa.seiichi.ew@u.tsukuba.ac.jp.

Abstract:

Advances in cryopreservation methods have enabled the long-term preservation of insect embryos. The cryoprotectant agents (CPAs) are required for the successful cryopreservation. Current permeabilization methods for silkworm embryos have been developed, which allow the flux of chemicals into the embryos. However, the toxicity effect of CPAs on the embryos remain not studied. Hence, the aim of this study was to assess the effect of different CPAs on the viability of non-diapause silkworm embryos. Dechorionated and permeabilized eggs at 163 h after egg laying were exposed to the CPAs ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol (GLY) and polyethylene glycol (PG) for 30 min, washed with Grace's insect medium, and then cultured using a dry-moist method. We found that EG and PG were less toxic than DMSO and GLY; only embryos exposed to EG and PG could develop to the second instar larvae. Our results could be used for the study and development of silkworm embryo cryopreservation protocols.

Resumen:

Avances en los protocolos de criopreservación han permitido la preservación de embriones de insectos a largo plazo. Los agentes crioprotectores (CPAs) son necesarios para una exitosa

criopreservación. Recientemente se han desarrollado protocolos para la permeabilización de embriones del gusano de la seda, lo cual ha permitido el flujo de agentes químicos hacia los embriones. Sin embargo, el efecto tóxico de los CPAs sobre la viabilidad de embriones no ha sido estudiada. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes CPAs sobre la viabilidad de embriones sin diapausa del gusano de la seda. Huevos decorionizados y permeabilizados a las 163 h después de la postura, fueron expuestos a los crioprotectores etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY) y polietilenglicol (PG) por 30 min, lavados en medio de insectos Grace's y cultivados usando el método seco-húmedo. Encontramos que el EG y el PG fueron menos tóxicos comparado con el DMSO y el GLY; solo los embriones expuestos al EG y PG pudieron desarrollar hasta el segundo instar larvario. Nuestros resultados podrían ser usados para el estudio y desarrollo de protocolos de criopreservación de embriones del gusano de la seda.

Introducción

El éxito de la sobrevivencia de células y organismos cuando son expuestos a bajas temperaturas está relacionado con la presencia intracelular de agentes crioprotectores (CPAs) para evitar la formación intracelular de cristales de agua [1]. Diversos CPAs han mostrado ser efectivos para criopreservación de células y embriones, entre los que destacan el glicerol (GLY), etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) y el propilenglicol (PG) [2,3]. Aunque la acción protectora de los CPAs es considerada coligativa, cada CPA presenta propiedades biológicas y biofísicas específicas [4]. Además de presentar diferentes efectos dependiendo del tipo de célula, estadio o especie [5,6].

Nuevos protocolos han sido desarrollados para la permeabilización de embriones del gusano de la seda, los cuales permiten el flujo de agentes químicos tales como el EG hacia los embriones [7]. Sin embargo, el efecto tóxico de los CPAs sobre la viabilidad de embriones del gusano de la seda no ha sido estudiada. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los CPAs EG, GLY, DMSO y PG sobre la viabilidad de embriones del gusano de la seda.

Material y métodos

La cepa pnd-w1 del gusano de la seda fue usada para este experimento. Los huevos fueron obtenidos de polillas hembras apareadas y fueron incubados a 25 °C hasta su uso. A las 163 h después de la postura de los huevos (DPH), estos fueron adheridos a una red de nailon para ser decorionizados con 30% KOH por 7 min y 2% NaClO por 5 min a 27 °C, lavados en una solución de buffer fosfato salino (PBS) por 10 min, inmersos en 1% de carbonato de sodio por 1 min, y lavados en PBS por 5 min [8]. Después, los huevos fueron permeabilizados con hexano por 30 segundos. El exceso de hexano fue removido de los huevos y entonces los huevos fueron transferidos a medio de insectos Grace's [7].



Los huevos decorionizados y permeabilizados fueron expuestos a una solución 2 M de EG, PG, DMSO y GLY en medio de insectos Grace's por 30 min. Después los huevos fueron removidos de las soluciones con CPAs y transferidos a soluciones decrecientes de trehalosa (0.5 M por 5 min; 0.25 M por 10 min; 0.125 M por 10 min) para remover los CPAs. Posteriormente, los huevos fueron lavados en medio de insectos Grace's dos veces por 5 min para finalmente ser cultivados usando el método seco-húmedo [8]. Los embriones fueron evaluados bajo un microscopio estereoscópico. Las variables de respuesta fueron embriones desarrollados a las 216 h DPH, embriones eclosionados 11 días DPH y embriones desarrollados hasta el segundo instar 19 días DPH. Los datos fueron analizados a través de la prueba Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para comparar cada grupo experimental. La significancia estadística fue de $p < 0.05$.

Resultados

Como se puede observar en la Figura 1, no se encontró diferencia significativa a los 30 minutos de exposición entre los CPAs evaluados respecto a la proporción de embriones evaluados. Sin embargo, la exposición a DMSO y GLY tuvo un efecto negativo en la proporción de embriones eclosionados, siendo significativa para GLY (Figura 2). Finalmente, se observó un decrecimiento de los embriones desarrollados hasta el segundo instar para todos los CPAs, especialmente para DMSO y GLY donde no hubo embriones que alcanzaran el segundo instar (Figura 3).

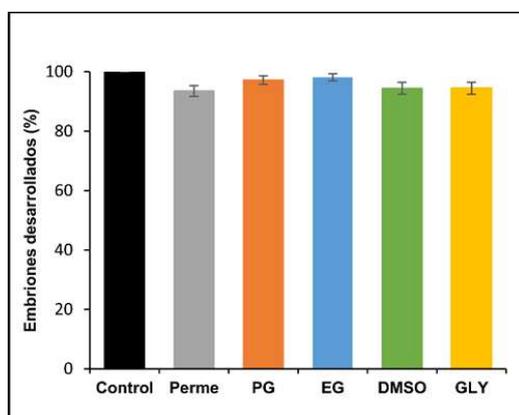


Figura 1. Efecto de la exposición a 2M de PG, EG, DMSO y GLY sobre el desarrollo de embriones del gusano de la seda. Media \pm SE, n=9.



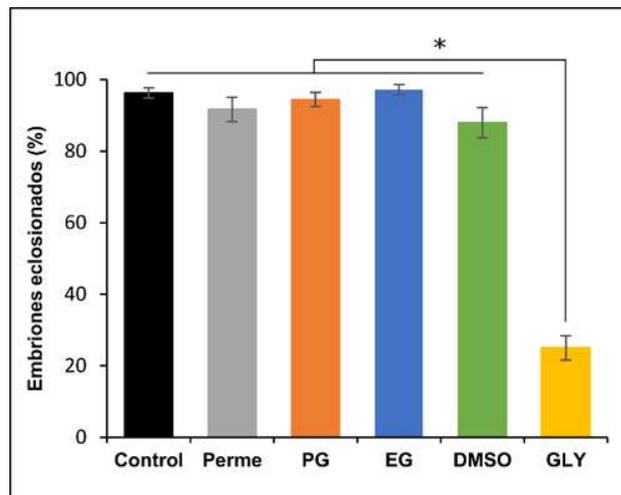


Figura 2. Efecto de la exposición a 2M de PG, EG, DMSO y GLY sobre la eclosión de los embriones gusano de la seda. Media \pm SE, n=9. * $p < 0.05$.

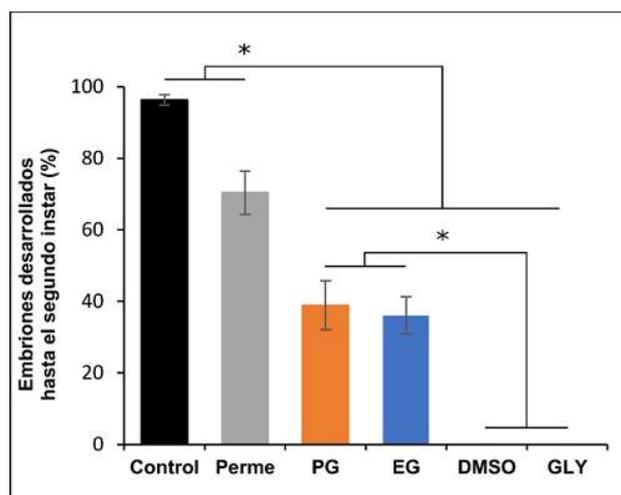


Figura 3. Efecto de la exposición a 2M de PG, EG, DMSO y GLY sobre el desarrollo de los embriones del gusano de la seda hasta el segundo estadio larvario. Media \pm SE, n=9. * $p < 0.05$.

Discusión

El éxito de la criopreservación de embriones de insectos recae en la suficiente cantidad de CPAs dentro de los mismos. Sin embargo, la toxicidad de los CPAs puede variar de acuerdo con el tipo de célula, estadio o especie [5,6]. Por lo tanto, se evaluó el efecto de 4 CPAs sobre los embriones del gusano de la seda. La exposición de embriones de la seda a EG y PG por 30 min mostró un desarrollo normal hasta el segundo estadio larvario. Los embriones



expuestos a el DMSO y GLY no desarrollaron hasta el segundo instar larvario. El EG es un CPA que ha mostrado baja toxicidad en especies Diptera [6] y Lepidóptera [9], mientras el PG ha mostrado ser poco tóxico para *Drosophila melanogaster* [6] y ha sido poco estudiado en embriones de insectos.

Conclusiones

El EG y el PG fueron los CPAs menos tóxicos para los embriones del gusano de la seda. Nuestros resultados podrían ser usados para el estudio y desarrollo de protocolos de criopreservación de embriones del gusano de la seda.

Referencias

- [1] Mazur P, Cole KW, Hall JW, Schreuders PD, Mahowald AP. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science* 1992; 258(5090): 1932-1935.
- [2] Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 2001; 36(2): 49-55.
- [3] Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 2007; 47(5): 935-945.
- [4] Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology* 2017; 76: 74-91.
- [5] Pedro PB, Yokoyama E, Zhu SE, Yoshida N, Valdez Jr DM, Tanaka M, Edashie K, Kasai M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development* 2005; 51(2): 235-246.
- [6] Zhan L, Li M, Hays T, Bischof J. Cryopreservation method for *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature Communications* 2021; 12(1): 1-10.
- [7] Urbán-Duarte D, Tomita S, Sakai H, Sezutsu H, De La Torre-Sánchez JF, Kainoh Y, Furukawa S, Uchino K. An Effective Chemical Permeabilization of Silkworm Embryos. *Bioengineering* 2023; 10(5): 563.
- [8] Urbán-Duarte D, Tomita S, Sakai H, Sezutsu H, De La Torre-Sánchez JF, Kainoh Y, Furukawa S, Uchino K. Effect of chemical dechoriation on silkworm embryo viability. *Journal of Insect Physiology* 2022; 137: 104327.
- [9] Luo L, Pang Y, Chen Q, Li G. Cryopreservation of the late-stage embryos of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *CryoLetters* 2006; 27(6): 341-352.



Uso de chips SNP50K para estudios genéticos del cerdo pelón/lampião en México. Ejemplo Yucatán

Use of SNP50K chip for genetic studies
of pelón/lampião pig in México.
Example Yucatán

Clemente Lemus-Flores^a y Raúl Sansor-Nah^b.

^a Universidad Autónoma de Nayarit, México. E-mail: clemus@uan.edu.mx.

^bAsociación Mexicana de Criadores de Cerdos de Origen Ibérico Yucatán, A. C. México.

Abstract:

A study of the diversity and genetic structure of the pelón/lampião pigs of Yucatan began in 2018, with a Project through the support of the state and an association of producers concerned about the identity and origin of their pigs. According to a census generated, 104 unrelated skin/hairless pigs (87 females and 17 males) were identified and used as a sample, considering phenotypically features of absence of hair (hairless), black skin, without spots, black hoof and straight snout, from the different geographical localities in Yucatan. SNP analyses were obtained using the SNP50K chip. For genetic comparisons with other Iberian and commercial breeds, the databases available at: Burgos-Paz, W. et al. (2013) and Yang et al. (2017) were used. With the use of the PLINK v1.9 program (Pursell et al., 2007) genetic diversity and population structure analyses were performed. The results allow the identification of the kinship and the degree of genetic diversity of the sampled herds, subpopulations can be identified according to their genetic composition, different value of random mating and genetic distance with Asian and commercial races. Identifying a European racial structure close to Iberian lampiños. With these technological strategies, support can be justified and requested for national conservation projects, ensuring the identity and racial origin of the conserved populations. It generates current useful genetic information and as a basis for the conservation of this local genetic resource.

Resumen:

Se dio inicio en el año 2018 a un estudio de diversidad y estructura genética de los cerdos pelón/lampião de Yucatán, con un Proyecto a través del apoyo del estado y de una asociación de productores preocupados por la identidad y origen de sus cerdos. De acuerdo con un censo generado se identificó y utilizó como muestra a 104 cerdos pelón/lampiños, sin parentesco

(87 hembras y 17 machos), considerando fenotípicamente rasgos de ausencia de pelo (lampiños), piel negra, sin manchas, pezuña negra y hocico recto, de las distintas localidades geográficas en Yucatán. Se obtuvo ADN y análisis de SNP empleando el chip SNP50K. Para las comparaciones genéticas con otras razas Ibéricas y comerciales se emplearon las bases de datos disponibles en: Burgos-Paz, W. et al. (2013) y Yang et al. (2017). Con el uso del programa PLINK v1.9 (Purcell et al., 2007) se realizaron los análisis de diversidad genética y estructura poblacional. Los resultados permitieron la identificación del parentesco y del grado de diversidad genética de los hatos muestreados, se pueden identificar subpoblaciones de acuerdo con su composición genética, diferente valor de apareamiento aleatorio y distancia genética con razas asiáticas y comerciales. Identificándose una estructura racial Europea cercana a ibéricos lampiños. Con el uso de chips para el estudio masivo del genoma es posible auxiliar estrategias de conservación. Con estas estrategias tecnológicas se puede justificar y solicitar apoyos para proyectos de conservación nacional, asegurando la identidad y origen racial de las poblaciones conservadas. Se genera información genética útil actual y como base para la conservación de este recurso genético local.

Introducción

Los cerdos desde su llegada a América han sido fuente de proteína y grasa para la alimentación de los pueblos rurales, reconociéndose actualmente la importancia de los cerdos criollos en los sistemas rurales de producción porcina tropical en México (Hernández et al., 2020; Ramos-Canché et al., 2020). Al cerdo lampiño procedente de España, la FAO (2019) lo clasifica como “pelón” y en peligro de extinción. El hecho importante es que los cerdos pelones o lampiños, han permanecido alejados genéticamente de los cerdos comerciales (Lemus-Flores et al., 2001, Lemus-Flores et al., 2020). Empleando estrategias tecnológicas moleculares actuales, como los chips para identificar variantes SNP, es posible identificar individuos y caracterizar poblaciones que permitirán establecer programas de conservación eficientes y viables (Burgos-Paz et al., 2013). Con el uso de estos chips de SNP se identifican parentescos, consanguinidad, estructura poblacional, distancias entre poblaciones e individuos, identificación de variantes y/o genes relacionados con poblaciones o características para selección o huellas de selección (Burgos-Paz et al., 2013; Lemus-Flores et al., 2020). Para continuar con programas de conservación *in situ* y *ex situ* en Yucatán y en otras poblaciones, es importante determinar cuáles cerdos se conservarán, sobre todo aquellos con mayor componente genético ibérico. Sumada a la clasificación fenotípica es necesaria la genotipificación molecular para estudiar su diversidad genética y estructura poblacional, en relación con cerdos Ibéricos y cerdos comerciales empleando chips de SNP.

El uso que se le ha dado en Yucatán al cerdo Pelón es ejemplar, se han difundido productos comerciales Gourmet, como es el lechón al horno y platillos envasados de la gastronomía Yucateca (Lechón, Cochinita y relleno). Esto propicia que sólo en este estado de Yucatán, el inventario de cerdo Pelón se conserve, lo que no ha sucedido en estados como Puebla, Guanajuato, Nayarit y Oaxaca que tienen modelos de conservación *ex situ* bajo protección



comercial o de investigación, lo que ha propiciado que estas poblaciones disminuyan o desaparezcan. Debido a la situación que prevalece los inventarios son bajos o nulos en muchos estados de la república, por lo que es importante contar con estrategias tecnológicas que justifiquen y apoyen proyectos de conservación nacional, asegurando la identidad y origen racial de las poblaciones conservadas.

Material y métodos

Bajo un proyecto entre la Asociación Mexicana de Criadores de Cerdos de Origen Ibérico Yucatán, A. C. y el parque científico tecnológico de Yucatán A.C. de la Secretaría de Investigación, Innovación y Educación Superior de Mérida, Yucatán, se desarrolla desde 2018 con la Universidad Autónoma de Nayarit, un proyecto del “Estudio de la composición genética de poblaciones de cerdos de origen Ibérico en Yucatán-México”. Dentro de los objetivos específicos del proyecto aquí se reporta:

- 1.- Diversidad genética del cerdo lampiño en Yucatán.
- 2.- Relaciones genéticas entre razas Ibéricas y el cerdo lampiño en Yucatán.
- 3.- Relaciones genéticas entre razas comerciales, Asiática y el cerdo lampiño en Yucatán.

De un padrón de 49 productores, se obtuvieron muestras sanguíneas de 104 cerdos pelón/lampiños sin parentesco (87 hembras y 17 machos) considerando fenotípicamente rasgos de ausencia de pelo (lampiños), piel negra, sin manchas, pezuña negra y hocico recto, de las distintas localidades geográficas en Yucatán, de las cuales se obtuvo ADN y análisis de SNP por la compañía NeoGen, empleando el chip SNP50K. Para las comparaciones genéticas con otras razas Ibéricas y comerciales se emplearon las bases de datos disponibles en: Burgos-Paz, W. et al. (2013) y Yang et al. (2017). Con el uso del programa PLINK v1.9 (Purcell et al., 2007) se realizaron los análisis de diversidad genética y estructura poblacional.

Resultados

Diversidad genética.

Dentro de la población de Yucatán, Cuadro 1, se pueden identificar subpoblaciones de acuerdo con su composición genética para los SNP analizados. YUC1 corresponden a la región de Tizimin, YUC2 y YUC3 a la región centro Mérida. Pueden identificarse con los resultados un mayor apareamiento aleatorio en subpoblaciones (YUC1 y YUC3) lo que disminuye su consanguinidad y aumenta la heterocigosidad. Indicador muy importante para continuar con apareamientos con animales no emparentados ni con cruzamiento.



Cuadro 1. Diversidad genética del cerdo pelón/lampião de Yucatán.

	YUC1	YUC2	YUC3	eem
Muestras	70	14	20	
Media MAF	0.260 ^a	0.216 ^c	0.247 ^b	0.025
Consanguinidad (F)	0.039 ^a	0.067 ^a	-0.006 ^b	0.011
Ho	0.328 ^b	0.305 ^b	0.359 ^a	0.011
Fis	0.079 ^a	0.142 ^a	-0.007 ^b	0.021
Índice de alogamia (t)	0.870 ^b	0.782 ^b	1.0278 ^a	0.027

MAF, frecuencia de alelo menor. Ho, Heterocigosidad observada. Fis, índice de fijación subpoblacional. eem, error estándar medio. Diferentes letras en las filas indican diferencias estadísticas entre las poblaciones (ANOVA, $p < 0.05$).

Considerando las distancias genéticas entre pelón/lampião y otras poblaciones Ibéricas, se aprecia que se encuentran cercanos a cerdos lampiños ibéricos y más distantes de Chato y Manchado (Figura 1).

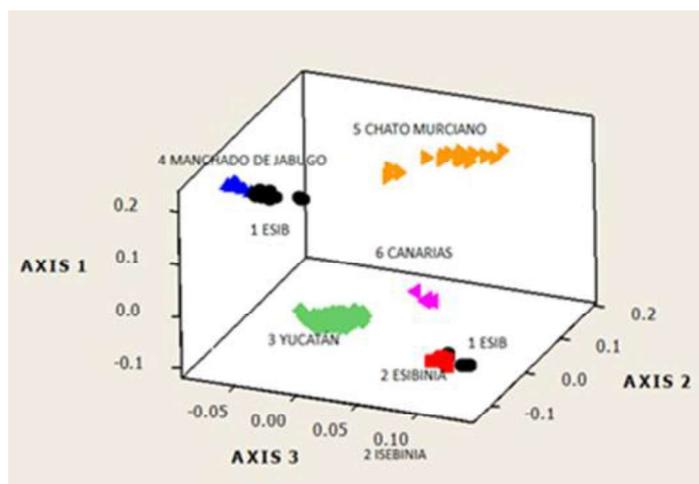


Figura 1. Distancias genéticas entre poblaciones Yucatán, Ibéricas lampiñas y no lampiñas.

Las distancias entre pelón/lampião y otras poblaciones comerciales y asiática (Figura 2) muestran una cercanía con Duroc y Hampshire, distantes de Meishan. Situación relevante desde el punto de vista genético, que da pauta a un origen Europeo e Ibérico del cerdo pelón/lampião de Yucatán. La identificación del paralelismo del cerdo pelón/lampião de Yucatán es necesaria e importante para diseñar estrategias reproductivas que lo acerquen a su origen, pero lo distancien de los comerciales y asiáticos, para darle un valor agregado e identidad racial a estas poblaciones, propiciando también trazabilidad y autenticidad de sus productos.



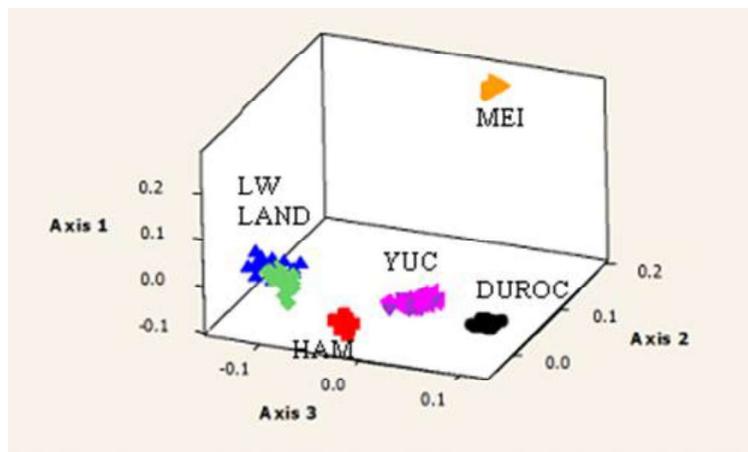


Figura 2. Agrupamiento genético entre pelón/lampión de Yucatán, comerciales y asiático.

Conclusiones

Con el uso de chips para el estudio masivo del genoma, es posible auxiliar estrategias de conservación. Con estas estrategias tecnológicas se puede justificar y solicitar apoyos para proyectos de conservación nacional, asegurando la identidad y origen racial de las poblaciones conservadas. Se puede proporcionar información genética útil actual y como base para la conservación de este recurso genético local.

Referencias

- [1] Burgos-Paz W, Souza CA, Megens HJ, Ramayo-Caldas Y, Melo M, Lemus-Flores C, Caal E, Soto HW, Martínez R, Álvarez LA. Porcine colonization of the Americas: a 60k SNP story. *Heredity*. 2013;110:321–330. <https://www.nature.com/articles/hdy2012109>. <https://doi.org/10.5061/dryad.t1r3d>.
- [2] FAO. Food and Agriculture Organization. Domestic Animal Diversity Information System (DADIS). 2019. URL: <http://www.fao.org/dad-is/regionalnational-nodes/efabis/en/>.
- [3] Hernández AA, García-Munguía CA, García-Munguía AM, Ortiz-Ortiz JR, Sierra-Vásquez AC, Morales-Flores S. Sistema de producción del cerdo pelón mexicano en la Península de Yucatán. *Nova Scientia*. 2020;24(12):1-21. <https://doi.org/10.21640/ns.v12i24.2234>.
- [4] Lemus-Flores C, Ulloa-Arvizu R, Ramos-Kuri M, Estrada FJ, Alonso RA. Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *Journal Animal Science*. 2001;79:3021–3026. <https://doi.org/10.2527/2001.79123021x>.



[5] Lemus-Flores C, Alonso-Morales R, Toledo-Alvarado H, Sansor-Nah R, Burgos-Paz W, Dzib-Cauich D. Genetic diversity and population structure of Yucatan black hairless pig using SNP50K chip. *Abanico Veterinario*. 2020;10:1-12. <https://10.21929/abavet2020.10>.

[6] Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal Human Genetics*. 2007;81(3):559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>.

[7] Ramos-Canché ME, Magaña-Magaña MA, Aguilar-Urquizo E, Pech-Zapata A, Piñero-Vázquez AT, Toledo-López VM, Sanginés-García JR. Óptimos económicos en la cría del cerdo pelón mexicano: propuesta de integración para cadena productiva. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2020;7(1):e2302. <https://doi.org/10.19136/era.a7nl.2302>.

[8] Yang B, Cui L, Perez-Enciso M, Traspov A, Crooijmans R, Zinovieva N, Schook L, Archibald A. Genome-wide SNP data unveils the globalization of domesticated pigs. *Genetics Selection Evolution*. 2017;49:71-85. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0345-y>.



Sistema para Evaluar el Estrés del Retículo Endoplásmico en *Apis mellifera*

A System for Evaluating Endoplasmic Reticulum Stress in *Apis mellifera*

Ernesto Orozco-Lucero^a, Marbella Chávez-Solano^a, Diana M. Beristain-Ruiz^a, Mateo F. Itzá-Ortiz^a, Armando Varela-Ramírez^b.

^a Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Marbella Chávez-Solano, <https://orcid.org/0000-0003-2432-1477>, Email: marbella.chavez@uacj.mx; Diana M. Beristain-Ruiz, <https://orcid.org/0000-0002-9189-3750>, Email: diana.beristain@uacj.mx; Mateo F. Itzá-Ortiz, <https://orcid.org/0000-0003-0313-586X>, Email: mateo.itza@uacj.mx; Ernesto Orozco-Lucero, <https://orcid.org/0000-0003-3238-2341>, Email: ernesto.orozco@uacj.mx.

^b The Border Biomedical Research Center of the University of Texas at El Paso. Armando Varela-Ramírez, <https://orcid.org/0000-0002-2071-487>, Email: avarela2@utep.edu.

Abstract:

The honey bee (*Apis mellifera*) population suffers a worldwide decrease due to diverse stress factors, as parasitosis by *Varroa destructor*. Knowledge of the regulatory mechanisms underlying cell stress in *A. mellifera*, including endoplasmic reticulum stress (ERS), a stress pathway with pivotal importance and closely related to the unfolded protein response (UPR), is far from complete. We present here a System for Evaluating Endoplasmic Reticulum Stress in *A. mellifera* (SEERSAm), whose aim is to determine if varroa infestation alters ERS and its related pathways (UPR, autophagy, and apoptosis) in *A. mellifera*. Primers targeting ERS/UPR (*grp78*; *atf6*; *ire1*; *eif2a*; *calr*; *Xbp1*; and *grp94*) and autophagy (*atg7*) transcripts were designed and primers targeting apoptosis-related transcripts (*Apaf1*; *bsk*; *casp3*; *casp9*; *iap*; and *buffy*) were chosen from the literature. Beehives with null-low, medium, and high *V. destructor* infestation (according to the method of natural mite mortality) will be sampled. Total RNA from the fat body of nurse worker bees will be extracted for qPCR with the corresponding cDNA. The abundance levels of the transcripts of interest will be assessed. The SEERSAm, currently in progress, will be instrumental to know the molecular regulation of ERS and its related pathways in the fat body of *A. mellifera* due to *V. destructor* infestation.

Resumen:

La población mundial de la abeja melífera (*Apis mellifera*) sufre una disminución debido a diversos factores estresantes, como la parasitosis por *Varroa destructor*. El conocimiento de

los mecanismos reguladores propios del estrés celular en *A. mellifera*, incluyendo el estrés del retículo endoplásmico (ERE), una vía de estrés con importancia central y cercanamente relacionada con la respuesta a las proteínas mal plegadas (RPMP), está lejos de ser completo. Aquí presentamos un Sistema para Evaluar el Estrés del Retículo Endoplásmico en *A. mellifera* (SEEREAm), cuyo objeto es determinar si la infestación con varroa altera al ERE y sus vías relacionadas (RPMP, autofagia y apoptosis) en *A. mellifera*. Se diseñaron primers correspondientes a transcritos de ERE/RPMP (*grp78*; *atf6*; *ire1*; *eif2a*; *calr*; *Xbp1*; y *grp94*) y autofagia (*atg7*), y se seleccionaron de la literatura primers correspondientes a transcritos relacionados con apoptosis (*Apaf1*; *bsk*; *casp3*; *casp9*; *iap*; y *buffy*). Se muestrearán colmenas con infestación nula-baja, media y alta (de acuerdo con el método de la mortalidad natural del ácaro) con *V. destructor*. Se extraerá el ARN total del cuerpo graso de abejas obreras nodrizas para realizar qPCR con el ADNc en cuestión. Se explorarán los niveles de abundancia de los transcritos de interés. El SEEREAm, actualmente en desarrollo, será útil para conocer la regulación molecular del ERE, y sus vías relacionadas en el cuerpo graso de *A. mellifera* debido a la infestación con *V. destructor*.

Introducción

A nivel mundial, las abejas melíferas (*Apis mellifera*) enfrentan una grave disminución de su población y capacidad polinizadora. Esto se debe a una combinación de fuentes bióticas y abióticas de estrés (amenazas o factores estresantes) [1]. La infestación con ácaros del género Varroa (varroasis), dentro de los cuales destaca el daño por *V. destructor*, se encuentra entre los principales problemas de *A. mellifera* [1, 2]. Por ejemplo, estos ectoparásitos provocan severos daños morfológicos y funcionales a las abejas portadoras y son capaces de transmitirles enfermedades virales altamente debilitantes, con lo cual incluso producen la muerte de los insectos. Todo ello puede llevar al colapso de la colmena. En cuanto a la forma en que las varroas parasitan a las abejas, Ramsey et al. [2] indican que los ácaros pertenecientes a *V. destructor* se alimentan no solo de la hemolinfa, sino también a un grado importante del cuerpo graso de *A. mellifera*. En consecuencia, es clara una interacción cercana de las varroas con el tejido graso de las abejas [2].

Si bien se conocen parte de los estragos que la varroasis genera a las abejas a nivel molecular, aún se desconoce la mayor parte de la regulación molecular del estrés celular que las varroas ocasionan a *A. mellifera*. La misma falta de conocimiento aplica a los mecanismos de estrés celular que otras amenazas ocasionan a esta abeja [1].

A nivel molecular, existen diversas vías de estrés. Una de ellas, con un papel preponderante en la fisiología de la célula, es el estrés del retículo endoplásmico (ERE). El ERE ocurre cuando una fuente de estrés, interna o externa a la célula, induce fallas en el funcionamiento del retículo endoplásmico (RE), principalmente en cuanto a la regulación de la síntesis y plegamiento de proteínas por el organelo. A su vez, esto altera la homeostasis proteica [3]. La proteína GRP78, chaperona miembro de la familia de las proteínas del choque térmico,



es considerada la reguladora principal del ERE. La GRP78 funciona como sensor del ERE por medio de su unión a proteínas plegadas incorrectamente. Una vez que GRP78 se une a proteínas mal plegadas, las proteínas ATF6, IRE1 y PERK se activan, induciendo (a nivel del transcrito y de la proteína) las tres vías principales de la respuesta a proteínas mal plegadas (RPMP). La RPMP es el mecanismo celular cuyo propósito es disminuir el ERE, con objeto de recuperar la homeostasis proteica por medio de autofagia. En caso de que la célula no recupere su homeostasis, sobreviene la muerte por apoptosis [3]. A pesar del conocimiento del ERE en otros modelos animales, la información sobre estos mecanismos en *A. mellifera* es escasa [4].

Dado todo lo anterior, nuestra hipótesis de trabajo es que la varroasis en *A. mellifera* afecta a nivel molecular al cuerpo graso, lo cual se refleja como una alteración del ERE y la RPMP. Por tanto, el objetivo es determinar, a nivel transcrito, si la varroasis induce ERE y sus vías relacionadas en el cuerpo graso de *A. mellifera*.

Material y métodos

Los primers (oligonucleótidos; cebadores) para la PCR cuantitativa (qPCR, tiempo real) de los transcritos candidato relacionados con ERE/RPMP (*grp78*; *atf6*; *ire1*; *elf2a*; *calr*; *Xbp1*; y *grp94*) y autofagia (*atg7*) se diseñaron y validaron *in silico* con los software PrimerQuest™ Tool (www.idtdna.com/Primerquest) y OligoAnalyzer™ Tool (www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer) de Integrated DNA Technologies® (IDT; Coralville, IA), junto con el algoritmo blastn (nucleotide ► nucleotide) de BLAST® (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

La información para alimentar al PrimerQuest™ Tool consistió en las secuencias reportadas en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para los ARNm maduros de *A. mellifera*. Los primers correspondientes a transcritos relacionados con apoptosis (*Apaf1*; *bsk*; *casp3*; *casp9*; *iap*; y *buffy*), así como de los transcritos constitutivos (*Arp1*; y *RpS5a*), se obtuvieron de la literatura [5, 6]. La información de las secuencias del GenBank para todos los primers se encuentra en el Cuadro 1. Todos los primers se surtirán de T4 Oligo (Irapuato, México).

Entre agosto y septiembre se muestrearán colmenas (caja tipo Langstroth) de *A. mellifera* en producción, en el área del Valle de Juárez y los alrededores de Samalayuca, Chihuahua. Las colmenas carecerán de cualquier tratamiento farmacológico o de suplementos naturales; tampoco recibirán alimentación por el apicultor. Las colmenas contarán con al menos tres cuadros con cría, operculada y destapada, y se evaluarán para clasificarlas según su grado de infestación con *V. destructor* en: nulo-bajo (0–350 ácaros/colmena); medio (351–2,000); o alto (> 2,000) [7]. Para ello, se muestreará semanalmente la mortalidad natural del ácaro (caída y recuperación en papel sobre el piso de la colmena). Se estimará el número total de ácaros por colmena a partir del conteo de ácaros caídos, el cual se procesará con la ecuación lineal de Branco et al. [8].



Cuadro 1. Secuencias para el diseño de primers

Tipo de transcrito	Símbolo	Sinónimo	# acceso en GenBank
ERE	<i>grp78</i>	<i>Hspa5</i>	NM_001160072.2
ERE	<i>atf6</i>	<i>Achm7</i>	XM_026439714.1
ERE	<i>ire1</i>	<i>ern1; ire1a</i>	XM_006565605.3
ERE	<i>EIF2A</i>	<i>Mstp004</i>	XM_625140.6
ERE	<i>calr</i>	<i>crt</i>	XM_006559506.3
ERE	<i>Xbp1</i>	<i>Treb5</i>	XM_392383.7
ERE	<i>grp94</i>	<i>Hsp90b1; Endoplasmin</i>	XM_395614.6
Autofagia	<i>atg7</i>	<i>Apg7l; Gsa7</i>	XM_001122360.5
Apoptosis	<i>Apaf1</i>	<i>Apaf1L; Ark</i>	NC_007071.3 [5]
Apoptosis	<i>bsk</i>	---	XM_392806.4 [6]
Apoptosis	<i>casp3</i>	Apopain	XM_394855.6 [5]
Apoptosis	<i>casp9</i>	<i>APAF3</i>	XM_026444610.1 [5]
Apoptosis	<i>iap</i>	<i>BIRC2</i>	XM_396819.4 [6]
Apoptosis	<i>buffy</i>	---	NC_007072.3 [5]
Constitutivo	<i>Arp1</i>	---	NM_001185145.1 [5]
Constitutivo	<i>RpS5a</i>	<i>RpS5; US7</i>	XM_006570236.3 [5]

ERE, estrés del retículo endoplásmico/respuesta a proteínas mal plegadas.

Se colectarán únicamente abejas nodrizas completamente al azar (sin observar si portan o no varroas). Cada nodriza se anestesiara a 4°C/5 min. Se aislara el abdomen del agujón, glándula de veneno y vísceras. El cuerpo graso, adherido al abdomen, se diseccionara y almacenara a -70°C. Se extraera individualmente el ARN total del cuerpo graso de cada nodriza por medio del reactivo TRIzol™ (ThermoFisher; Waltham, MA), tratando con ADNasa I (ThermoFisher) [7]. El ADN complementario (ADNc) de cada cuerpo graso se sintetizará con el RevertAid First Strand Synthesis Kit (ThermoFisher). La concentración y pureza, tanto del ARN, como del ADNc, se evaluarán con el NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher).

Previo a la qPCR, la especificidad de los primers se verificara por secuenciación de ADN (Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos, INMEGEN, CDMX, México) del respectivo amplicón (purificado con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System; Promega; Madison, WI), generado por PCR punto final (programa: 1X 95°C/5' 00"; 35X 95°C/0' 30", Tm/0' 30" y 72°C/0' 30"; y 1X 72°C/5' 00", termociclador MyCycler™, Bio-Rad, Hercules, CA) a partir de ADNc de cuerpo graso. Para la qPCR se usara el Radiant™



Green Fluorescein qPCR Kit (Alkali Sci.; Ft. Lauderdale, FL); cada mezcla de reacción será de 20 μ L con 20 ng de ADNc [7] y cada primer estará a 150 nM. Se usará el termociclador iCycler®, equipado con MyiQ2™ Two-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El programa de qPCR se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programa de PCR cuantitativa.

Número de ciclos	Fase	Tiempo/cambio	T° (°C)
1	Pre calentamiento	5' 00"	95
40	Desnaturalización	0' 30"	95
	Alineamiento	0' 30"	T _m
	Extensión	0' 30"	72
1	Extensión final	2' 00"	72
71	Curva de fusión	0.5°C/0' 30"	60–95
1	Pausa	∞	4

Para calcular los niveles crudos de todos los transcritos, los datos de qPCR se someterán al método de $\Delta\Delta C_t$ [9]. Los niveles crudos se procesarán con un factor de normalización GeNORM [10] con el software qBase+ (Biogazelle; Gent, Bélgica): se verificará que los dos transcritos constitutivos sean estables entre muestras independientes. La normalización con dos transcritos constitutivos corregirá la variación endógena de material biológico inicial entre muestras, con lo que se estimarán los niveles finales de transcrito (unidades arbitrarias, U.A).

Se determinarán los efectos de tres distintos grados de infestación con varroa sobre los niveles de transcrito. Consecuentemente, los grupos serán:

Nulo-bajo (Ctrl.); medio; y alto. Para cada grupo se evaluarán cuatro colmenas. En cada colmena se muestrearán cinco nodrizas, cada una de las cuales se evaluará por triplicado. Se usará el software GraphPad Prism 8.0.0 for Windows (GraphPad Software; San Diego, CA; www.graphpad.com). Los datos de nivel de transcrito se analizarán por ANOVA con bloques al azar. La variable grado de infestación se considerará el bloque. Si se encuentran diferencias grupales, las medias se compararán con una prueba de Tukey. Un valor de $p \leq 0.05$ se considerará estadísticamente significativo. El esquema general de los métodos se observa en la Figura 1.



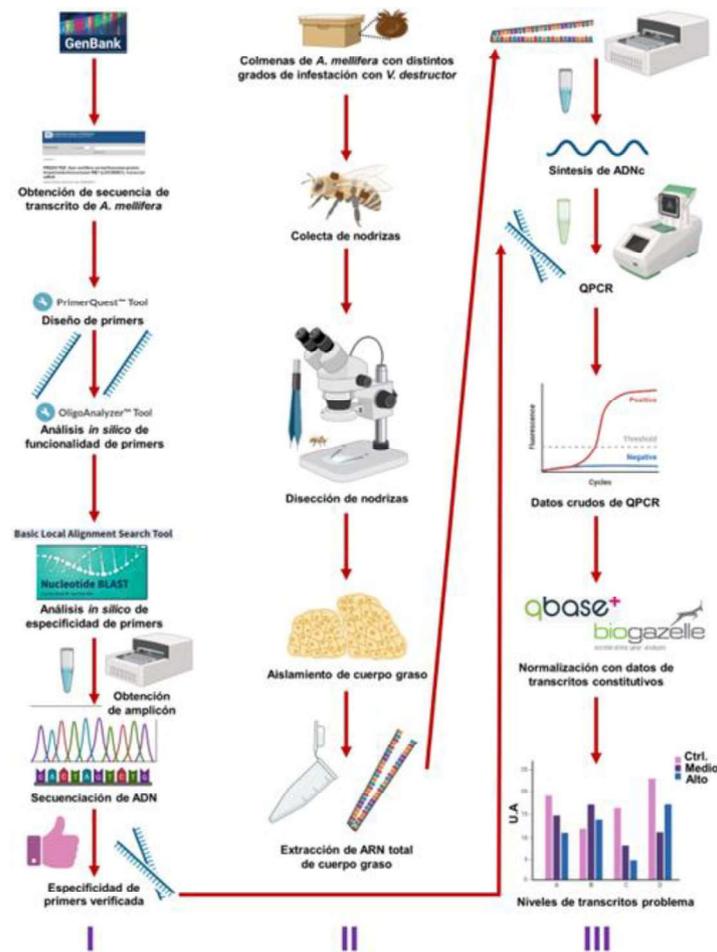


Figura 1. Esquema general de los métodos. Diseño y análisis *in silico* de primers, seguida de la verificación final de su funcionalidad y especificidad. Los primers diseñados serán acompañados por primers reportados en la literatura (I); colecta de obreras nodrizas de colmenas con diferente grado de infestación con *V. destructor*, seguida del aislamiento de su cuerpo graso y extracción de ARN total (II); síntesis de ADNc y qPCR hasta la estimación de los niveles finales de transcritos problema (III). ADNc, ADN complementario; Ctrl., Control (grado nulo-bajo de infestación); qPCR, PCR cuantitativa; U.A., unidades arbitrarias de transcrito. Esquema construido con BioRender (www.biorender.com).

Resultados

A través del diseño in silico se obtuvieron ocho pares de primers para amplificar transcritos de *A. mellifera* y detectarlos por qPCR (*grp78* a *grp94*; Cuadro 3).



Cuadro 3. Información de los primers

Símbolo Forward (sentido 5') Reverse (antisentido 3')	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
<i>grp78-F</i>	GACCCTCCAGAAAGAAATC	57.3
<i>grp78-R</i>	CAACTCCTGTTCACTCATC	57.5
<i>atf6-F</i>	ACCCATTTCCTCCACAA	60.9
<i>atf6-R</i>	GAACCCAAACACGTTTAGCA	61.1
<i>ire1-F</i>	CGAATTGTCACCGTAGATAG	57.6
<i>ire1-R</i>	CAACGAGAGATGGTAAAGC	57.9
<i>eil2a-F</i>	GCTGTAAGAGGTTCCATTG	57.9
<i>eil2a-R</i>	TCTCCAGTCTCTGATTTCC	58.0
<i>calr-F</i>	GGTGAAGTAGAAGCAGATTG	58.1
<i>calr-R</i>	CTCCATCCATTTTCATCATCC	58.1
<i>atg7-F</i>	CTGAGTCATCTAGTGGGTT	58.0
<i>atg7-R</i>	GAGAACTCTTGCTACAGAAC	57.7
<i>Xbp1-F</i>	GCATCAACTCTGACACTAAC	58.3
<i>Xbp1-R</i>	CCCACCACTCTTTCTGAATA	59.1
<i>grp94-F</i>	CTGGGTGTGATTGAAGATG	57.9
<i>grp94-R</i>	CAGGAAGAGCAGAAATAGC	57.7
<i>Apaf1-F</i>	ACAGATGATAATTTACAGGTGTGGG	54.8
<i>Apaf1-R</i>	TCCGTTCACTCTATCCGTTTGT	55.9
<i>bsk-F</i>	ACAAGATAATCGAGCAACTGGGA	56.1
<i>bsk-R</i>	CCTGTTCTCCACGTAATTCCTGA	56.4

Teóricamente, dada la evaluación de los primers por OligoAnalyzer™ y BLAST®, se esperarían altas probabilidades de que los primers funcionen adecuadamente. Esto sería tanto para PCR punto final, como para qPCR de una manera específica para amplificar transcritos de *A. mellifera*. Dentro de este grupo de transcritos, siete (*atf6*; *ire1*; *eil2a*; *calr*; *atg7*; *Xbp1*; y *grp94*) no han sido previamente detectados experimentalmente en *A. mellifera*.

Por otro lado, las secuencias de los pares de primers correspondientes a *Apaf1*; *bsk*; *casp3*; *casp9*; *iap*; *buffy*; *Arp1*; y *RpS5a* se obtuvieron de la literatura y ya han sido previamente utilizados para qPCR en *A. mellifera* [5, 6].



Continuación Cuadro 3. Información de los primers.

Símbolo Forward (sentido 5') Reverse (antisentido 3')	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
<i>casp3</i> -F	CATGCACAGAAGAAATTCGCCA	56.3
<i>casp3</i> -R	GTTCCGTCCCCTTCGTTGTG	56.8
<i>casp9</i> -F	TGGCCAAAGCTTGTGAAAATCA	56.1
<i>casp9</i> -R	ATGCAAAAGGTCCCCTGTT	57.7
<i>iap</i> -F	TTCAACGTGATGATGAAGTACAATG	53.7
<i>iap</i> -R	TGGATCATCACC AAGCTCCC	57.0
<i>buffy</i> -F	TGCCGATGCCCTGAAAAGTCT	57.1
<i>buffy</i> -R	TCTCCGATAAGGTTGCCCTG	57.4
<i>Arp1</i> -F	TTGTATGCCAACACTGTCCTTT	54.9
<i>Arp1</i> -R	TGGCCGATGATCTTAATTT	52.5
<i>RpS5a</i> -F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	51.8
<i>RpS5a</i> -R	TAACGTCACGAGAATGTGGTA	55.9

Discusión

El presente trabajo propone el establecimiento del Sistema para Evaluar el Estrés del Retículo Endoplásmico en *A. mellifera* (SEEREAm). Hasta este momento, se cuenta con progreso completo en el diseño y selección de primers para realizar las pruebas iniciales en este trabajo, mientras que el resto del SEEREAm se encuentra en desarrollo. Los productos de amplificación de todos los primers a emplear en el estudio, tanto los de nuevo diseño, como aquellos cuya secuencia se obtuvo de la literatura, se secuenciarán. Esto se debe a que a pesar de la alta especificidad de la técnica de PCR, junto con un aparentemente adecuado diseño de primers, aún existen posibilidades de amplificar inespecíficamente transcritos de la misma especie, pero que no correspondan a los transcritos blanco inicialmente propuestos. Una vez corroborada por secuenciación la identidad de los productos amplificados por los primers en el estudio, se procederá sin riesgo con la qPCR.

Como se ha mencionado, al día de hoy siguen sin conocerse los detalles de los mecanismos de estrés celular en general en *A. mellifera*. Un mayor conocimiento de la fisiología del estrés celular es crucial para comprender cómo los factores estresantes afectan a cualquier organismo, así como para investigar sobre posibles estrategias para disminuir el impacto del estrés. Esto es sumamente apremiante para *A. mellifera*, dados los problemas que actualmente presenta a escala mundial la población de este polinizador. Además, se debe considerar el papel central de *A. mellifera* en prácticamente todos los ecosistemas terrestres, así como para la seguridad alimentaria humana [1]. Similarmente, aún se carece de información sobre el



control del ERE en *A. mellifera* [4]. Considerando la importancia del ERE y sus vías moleculares relacionadas para la fisiología de cualquier célula [3], un mayor conocimiento del ERE en los polinizadores en cuestión es sumamente requerido.

Para la puesta en marcha del SEEREAm, se propone el uso del modelo de varroasis dados los graves estragos que la varroa genera en *A. mellifera*. Además, se sabe que *V. destructor* se alimenta de manera importante del cuerpo graso de esta abeja [2]. De esta forma, el presente modelo ofrece claramente un tejido blanco a estudiar, con alta probabilidad de encontrar afectaciones a nivel molecular, específicamente ERE. En consecuencia, el SEEREAm podría emplearse para conocer la manera en que la varroasis impacta la fisiología molecular de la abeja melífera. No obstante, si bien las distintas vías moleculares del estrés se interrelacionan en algunos puntos, y el ERE juega un papel central en el estrés celular, es necesario corroborar que cierto factor estresante realmente estimule una vía de estrés en particular (en nuestro caso, la varroasis y el ERE, respectivamente). Esto ocurre porque las respuestas universales al estrés pueden presentarse o no en contextos particulares, o suceder de maneras distintas [12].

Al inicio del uso del SEEREAm, se muestrearán únicamente abejas nodrizas al azar para aumentar la probabilidad de afectación tisular por ácaro, e incrementar la posibilidad de detectar cambios en ERE y sus vías relacionadas. Esto obedece a que Xie et al. [11] reportan que *V. destructor* prefiere infestar abejas nodrizas. El hecho de muestrear las nodrizas al azar tiene como propósito evitar el sesgo en el estudio, así como disminuir el tiempo de manipulación durante el muestreo.

En estudios de qPCR de transcritos, uno de los requisitos indispensables es la confiabilidad de los transcritos constitutivos para normalizar adecuadamente la expresión génica de las muestras problema (para corregir los datos de expresión en caso de variabilidad inicial en la cantidad de muestra en cada reacción). En este aspecto, se debe asegurar la estabilidad de los niveles de los transcritos constitutivos entre diversas muestras [10]. Consecuentemente, al comenzar este trabajo será necesario verificar la estabilidad de los niveles de *Arp1* y *RpS5a*, transcritos constitutivos, entre muestras de los distintos grupos estudiados. En caso de que dichos transcritos no cumplan con las condiciones para una adecuada normalización, se sustituirán por otros transcritos constitutivos.

Acercas de los transcritos problema, se espera que a mayor nivel de varroasis se induzcan alteraciones en la abundancia de transcritos marcadores de ERE/RPMP, tales como *grp78*, *atf6*, *ire1*, *eif2a* y *calr* (con la direccionalidad aún por determinar: aumento o decremento). Asimismo, consideramos factible que este mismo escenario conlleve a un menor nivel del transcrito *atg7*, cuya proteína codificada favorece la autofagia y por tanto, la homeostasis celular. De la misma manera, sería posible que la mayor infestación con varroa genere una disminución de la abundancia de los transcritos *iap* y *buffy*, que codifican para proteínas antiapoptóticas (favorecen la supervivencia celular). Al contrario, se esperaría que los transcritos proapoptóticos, *Apaf1*, *bsk*, *casp3* y *casp9*, muestren niveles más elevados a una



mayor incidencia de varroasis. Sin embargo, estas hipótesis deben corroborarse experimentalmente, para lo cual el SEEREAm sería de gran utilidad.

Actualmente, no se cuenta con anotaciones adecuadas de las secuencias de *A. mellifera* correspondientes a importantes transcritos involucrados en ERE/RPMP, tales como *atf4* y *Perk* [3]. En el caso de *atf4*, la secuencia disponible en el GenBank (que requiere actualización, pues data del año 2006) tiene una gran homología con otros miembros de la familia CREB. Esto vuelve altamente probable la amplificación inespecífica por PCR al utilizar primers para *atf4* de *A. mellifera* basándose en la secuencia actualmente conocida. Acerca de *Perk*, todavía no se conoce el gen homólogo (y por tanto, el transcrito) en *A. mellifera*, lo que impide el diseño de primers para *Perk* con la estrategia que actualmente utilizamos. Sin embargo, es posible mejorar las anotaciones de los transcritos *atf4* y *Perk* de *A. mellifera* con relativa facilidad. Para ello, se podría emplear la bien conocida estrategia de PCR con primers degenerados, seguida de RACE-PCR y secuenciación [13].

En mamíferos, el transcrito *Xbp1* es normalmente sometido a procesos de splicing alternativo, como parte de la regulación de su proteína codificada en la RPMP [3]. Hasta ahora, únicamente se tiene conocimiento de una variante constitutiva del transcrito de *A. mellifera* en el GenBank. Por tanto, únicamente hemos diseñado primers para dicha variante constitutiva. No obstante, se debe contemplar la exploración de formas del transcrito *Xbp1* generadas tras splicing en *A. mellifera*, dada la importancia de la forma alternativa de *Xbp1* en la RPMP en mamíferos [3].

La mayor parte de los transcritos pertenecientes a ERE/RPMP en el presente trabajo tienen un estatus de predicho (“PREDICTED”) en el GenBank. Consecuentemente, el SEEREAm podría contribuir al conocimiento experimental de las secuencias parciales de importantes transcritos de *A. mellifera* involucrados en el estrés celular. Esto sentaría las bases para la exploración de la secuencia completa de dichos transcritos, lo cual es de suma utilidad en estudios de genómica y transcriptómica [13].

Finalmente, entre otras de las aplicaciones potenciales del SEEREAm, tras su debida adaptación, se pueden mencionar las siguientes (Figura 2): I) investigar sobre ERE/RPMP en otras castas de abeja; II) monitorear otras edades de adultos; III) monitorear distintos estadios de desarrollo; IV) investigar la incidencia de estrés celular en diferentes tejidos; V) verificar si diversos factores estresantes provocan ERE/RPMP; y VI) sentar las bases para el estudio de otros tipos de estrés, tales como el oxidativo o el mitocondrial.



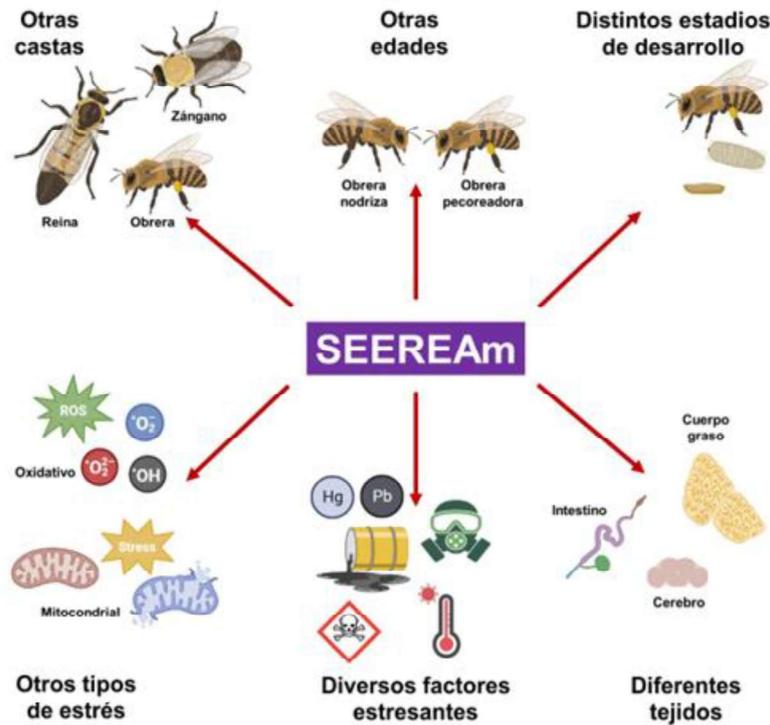


Figura 2. Otras aplicaciones potenciales del presente trabajo. Hg, mercurio; $\cdot O_2^-$, radical superóxido; $\cdot O_2$, radical peróxido; $\cdot OH$, radical hidroxilo; Pb, plomo; ROS, especies reactivas de oxígeno; SEEREAm, Sistema para Evaluar el Estrés del Retículo Endoplásmico en *A. mellifera*. Esquema construido con BioRender (www.biorender.com).

Conclusiones

El ERE y sus vías moleculares relacionadas tienen un papel preponderante en el estrés celular en distintas especies. *A. mellifera* no parece ser la excepción y el ERE en esta especie necesita ser estudiado. El SEEREAm, actualmente en desarrollo con el modelo de varroasis (un importante factor estresante, cuya modulación molecular aún debe conocerse), podría ser muy útil para conocer la regulación del ERE en *A. mellifera*. Este trabajo cuenta con posibles aplicaciones en las distintas castas de abeja, así como edades y estadios de desarrollo. El SEEREAm podría adaptarse para el estudio de otros factores estresantes y tipos de estrés celular.

Agradecimientos

AV-R es apoyado por el Grant-U54MD007592 otorgado a el Border Biomedical Research Center (BBRC) de la University of Texas at El Paso por el RCMI-National Institute on



Minority Health and Health Disparities, un componente de los National Institutes of Health (NIH).

EO-L agradece a PRODEP-SEP.

Referencias

- [1] Hristov P, Shumkova R, Palova N, Neov B. Factors associated with honey bee colony losses: a mini-review. *Vet. Sci.* 2020; 7(4): 166.
- [2] Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019; 116(5): 1792–1801.
- [3] Guzel E, Arlier S, Guzeloglu-Kayisli O, Tabak MS, Ekiz T, Semerci N, Larsen K, Schatz F, Lockwood CJ, Kayisli UA. Endoplasmic reticulum stress and homeostasis in reproductive physiology and pathology. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 792.
- [4] Shih SR, Bach DM, Rondeau NC, Sam J, Lovinger NL, Lopatkin AJ, Snow JW. Honey bee sHSP are responsive to diverse proteostatic stresses and potentially promising biomarkers of honey bee stress. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 22087.
- [5] Mookhploy W, Krongdang S, Chantawannakul P. Effects of deformed wing virus infection on expressions of immune- and apoptosis-related genes in western honeybees (*Apis mellifera*). *Insects* 2021; 12(1): 82.
- [6] Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Widder M, Moritz RF. *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140174.
- [7] Bataglia L, Simões ZLP, Nunes FMF. Transcriptional expression of m6A and m5C RNA methyltransferase genes in the brain and fat body of honey bee adult workers. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10: 921503.
- [8] Branco MR, Kidd NAC, Pickard RS. A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation. *Apidologie* 2006; 37: 452-461.
- [9] Fuentelsaz-Romero S, Cuervo A, Estrada-Capetillo L, Celis R, García-Campos R, Ramírez J, Sastre S, Samaniego R, Puig-Kröger A, Cañete JD. GM-CSF expression and macrophage polarization in joints of undifferentiated arthritis patients evolving to rheumatoid arthritis or psoriatic arthritis. *Front. Immunol.* 2021; 11: 613975.
- [10] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034.
- [11] Xie X, Huang ZY, Zeng Z. Why do *Varroa* mites prefer nurse bees? *Sci. Rep.* 2016; 6: 28228.



[12] Luo D, Wu Z, Bai Q, Zhang Y, Huang M, Huang Y, Li X. Universal stress proteins: from gene to function. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(5): 4725.

[13] Lang M, Orgogozo V. Identification of homologous gene sequences by PCR with degenerate primers. *Methods Mol. Biol.* 2011; 772: 245-256.



Repetibilidad de algunos caracteres reproductivos y productivos de ovejas de pelo en el sureste de México

Repeatability of some reproductive and productive traits of hair sheep in southeastern Mexico

Juan Gabriel Magaña-Monforte^a, José E. Tec-Canche^a, José C. Segura-Correa^a Gaspar M. Parra-Bracamonte^b.

^a Universidad Autónoma de Yucatán. Juan Gabriel Magaña Monforte, <https://orcid.org/000-0002-0128-6747>, Email: jmagana@correo.uady.mx; Jose E. Tec Canche, <https://orcid.org/0000-0002-6898-5622>, Email: josetec09@hotmail.com. José C. Segura Correa, <https://orcid.org/000-0003-1329-9948>, Email: jose.segura@correo.uady.mx.

^b Gaspar M. Parra Bracamonte, Instituto Politécnico nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas. Email: pabraman@hotmail.com.

Abstract:

The objective of this study was to estimate the repeatability of the interval between lambing Interval (LI, n=1881), litter size at lambing (LSL, n=2877), litter weaning weight adjusted to 60 days of age (LWW, n=2728) and kg of lamb weaning per ewe each cycle of days (PROD, n=1785) corresponding to 996 hair ewes. The data were analyzed through mixed models that included the fixed effects of breed or cross of the ewe, year, season, number of parity and litter size and the ewe nested within each racial group as a random effect and the error. The repeatability values for LI, LSL, LWW and PROD were 0.08, 0.15, 0.11 and 0.14, which are considered low, and the improvement of these characters would be slow by genetic means than by improvements in the management environment of the sheep.

Resumen:

El objetivo del presente estudio fue estimar la repetibilidad del intervalo entre partos (IEP, n=2881), tamaño de la camada al nacer (TCN, n=2877), el peso de la camada al destete ajustada a 60 días de edad (PCD, n=2728) y los kg de destete por ciclo de 240 días de la oveja (PROD, n=1785) correspondientes a 996 ovejas de pelo. Los datos se analizaron a través de modelos mixtos que incluyeron los efectos fijos de raza o cruce de la oveja, año, época, número de parto y tamaño de la camada y la oveja anidada dentro de cada grupo racial como efecto aleatorio y el error. Los valores de la repetibilidad para el IEP, TCN, PCD y PROD

fueron 0.08, 0.15, 0.11 y 0.14 mismos que se consideran bajos y el mejoramiento de estos caracteres sería lento por medios genéticos en comparación al mejoramiento que se lograría a través de ajustes en el ambiente de manejo de las borregas.

Introducción

Muchos caracteres pueden ser medidos varias veces en el mismo individuo, Por ejemplo, el tamaño de la camada, el peso al destete, el intervalo entre partos de una población de borregas en diferentes momentos de la vida productiva. Cuando puede medirse más de una medición del carácter en un individuo, la variación fenotípica puede partirse entre la variación dentro de individuos y la variación entre individuos. Esto conduce a un cociente de componentes de varianza llamado repetibilidad cuya notación es r . La repetibilidad puede ser utilizada para mostrar cuánto se puede ganar por la repetición de las mediciones durante la vida, así como para establecer los límites superiores de la heredabilidad y para predecir el comportamiento futuro a partir de los registros pasados. Esto también se puede utilizar para estimar la habilidad producción más probable (HPMP) (MPPA en sus siglas en inglés) de la oveja en función de los registros de rendimiento existentes, de modo que se pueda realizar una clasificación de la superioridad e inferioridad de las ovejas para los caracteres de reproducción y producción. La repetibilidad regularmente se puede utilizar como una medida de la consistencia o confiabilidad de la relación entre registros repetidos (valores fenotípicos repetidos) para un carácter en una población.

La población ovina en México es de 8.7 millones de cabezas con las que se producen 18.4 toneladas de carne. Los ovinos de pelo han tenido un gran auge y expansión en los últimos años en las diferentes zonas agroclimáticas del país, especialmente en el trópico [1]). Las principales razas utilizadas son Pelibuey, Black Belly, Dorper, Katahdin y sus cruces.

La eficiencia productiva depende del desempeño reproductivo de las ovejas y de la supervivencia y crecimiento de sus crías [2, 3,4,]. El intervalo entre partos, tamaño y peso de la camada al parto, al destete y kg de destete por ciclo productivo son características que en conjunto determinan la productividad de las ovejas [3,5,6].

Por lo tanto, es muy importante tener una visión general de lo que se espera con estas razas de pelo y sus cruces entre sí, considerando de igual forma los factores no genéticos que pueden influir en el comportamiento productivo de las ovejas, reflejado a su vez en el rebaño en general. En consecuencia, el presente estudio tiene como objetivo estimar los valores de la repetibilidad de algunos caracteres del comportamiento reproductivo, el crecimiento predestete y la productividad de ovinos de pelo bajo condiciones semi-intensivas en el sureste de México.



Material y métodos

El estudio se desarrolló en un sistema de producción ovina de ciclo completo del estado de Yucatán, México, localizado entre los paralelos 20°24' y 20°35' de latitud norte y los meridianos 89°37' y 89°47', de longitud oeste; posee una altura de 29 metros sobre el nivel del mar, con clima cálido sub-húmedo, con lluvias en verano, temperatura media anual de 25.5°C y precipitación pluvial media anual de 697mm.

Se utilizó la información de 996 ovejas paridas durante cuatro años. Las razas que manejaron fueron Katahdin de registro (Kr) y comercial (K), Pelibuey de registro (PR) y comercial (P), Blackbelly (B), Dorper (D) y las cruizas entre ellos, mediante un sistema de empadre continuo durante todo el año y pastoreo bajo irrigación y suplementación con concentrado comercial a las ovejas lactantes y sus crías. Las ovejas se agruparon por raza mediante tablas dinámicas, comparando en primera instancia los indicadores a través de estadísticas descriptivas. A partir de entonces se utilizó el procedimiento de modelo lineal general del paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2005) incluyendo el grupo con efectos fijos de los factores no genéticos (año, época, número de parto y tamaño de la camada).

Los primeros análisis estadísticos incluyeron algunas interacciones de primer orden consideradas relevantes entre el grupo racial y los demás factores ambientales; sin embargo, fueron eliminadas del modelo final por no ser significativas ($p > 0.05$). El modelo mixto final utilizado incluyó el efecto fijo del grupo de raza (BG, con nueve 9 niveles (Pr, Kr, P, K, B, P x K, D x K, D x B, K x B), año de parto (2016-2019), época de parto (seco, lluvioso y norte), número de partos (1, 2, ... ≥ 5), tamaño de la camada (simple y doble para características de destete), y efectos aleatorios de la oveja dentro del grupo de raza y error.

La repetibilidad se estimó a través de los componentes de varianza de la oveja y el fenotípico [7] y los errores estándar [8].

Resultados

Las medias generales y desviación estándar del IEP, TCN, PCD y PROD fueron 258.72 ± 67.02 , 1.38 ± 0.22 , 22.24 ± 3.35 y 23.02 ± 3.25 , respectivamente. Los valores de la repetibilidad y sus errores estándar para IEP, TCN, PCD y PROD fueron 0.08 ± 0.01 , 0.15 ± 0.04 , 0.13 ± 0.03 y 0.14 ± 0.04 , respectivamente.

Discusión

Los valores de las medias aritméticas encontradas en el presente trabajo están dentro del rango de valores reportados en el trópico en general [9,10] y en México en particular [5,6,11]. Las diferencias entre los valores se deben a diversos factores como son la raza de pelo utilizada, manejo y ambientes dentro del mismo trópico.



Con respecto a la repetibilidad, para el IEP el valor de 0.08 es similar a 0.07 y 0.08 reportados por [6 y 11] para ovejas Pelibuey. Para el TCN la repetibilidad de 0.15 es mayor a lo reportado a 0.09 y 0.12 por [6 y 11] respectivamente, y similar a 0.15 y 0.13 por [12 y 13], respectivamente. Para PCD y PROD, los valores son similares a los reportes con ovejas Pelibuey en la misma zona de estudio [5 y 11].

Conclusiones

Bajo las condiciones de manejo semi-intensivo en el trópico del presente estudio, las medias de las características reproductivas y productivas de ovejas de pelo evaluados estuvieron dentro del rango de medias reportadas en diversos estudios en los trópicos. Sin embargo, las repetibilidades fueron bajas y representan los límites máximos de la heredabilidad por lo que sugieren que el mejoramiento del desempeño reproductivo y productivo sería muy lento por medio de selección genética que a través de mejoras de las condiciones de manejo en la población estudiada.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONAHCyT por la beca otorgada al segundo autor para sus estudios de posgrado.

Referencias

- [1] Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2021. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/744954/Inventario_2021_ovino.pdf.
- [2] Magaña-Monforte JG, Nasrat MM, Montes-Pérez RC, Aké-López RC, Segura-Correa JC. Factors affecting the productivity and efficiency at weaning of hair sheep ewes in a dry tropical environment. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2018; 30(11):946-951.
- [3] Mokhtari MS, Rashidi A, Esmailzadeh AK. Estimates of phenotypic and genetic parameters for reproductive traits in Kermani sheep. *Small Ruminant Research*. 2010 88:27-31.
- [4] Snowden GD. Genetic improvement of overall reproductive success in sheep: A review. *Archivos Latinoamericanos de Producción animal*. 2008; 16(1):32-40.
- [5] Magaña-Monforte JG, Huchin M, Ake RJ, Segura JC. A field study of reproductive performance and productivity of Pelibuey ewes in Southeastern Mexico. *Trop Anim Health Prod*. 2013; 45:1771–1776.



- [6] Hinojosa-Cuellar J.A, Regalado-Arrazola FM, Oliva-Hernández, J. Crecimiento prenatal y predestete en corderos Pelibuey, Dorper, Katahdin y sus cruces en el sureste de México. Revista Científica. 2009a; vol. XIX, núm. 5:522-532.
- [7] Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. Introducción a la Genética Cuantitativa. 2001. Cuarta Edition, Ed. Acribia, Zaragoza, Spain.
- [8] Becker, W.A. Manual of Quantitative Genetics. Third Edition. Washington State. 1992. University Press.
- [9] Combellas J. Comportamiento reproductivo en ovinos tropicales. Revista Científica FCV-LUZ.1993; 3,135-141.
- [10] Dickson, L., Torres, H.G., Aubeterre, R.D. y Garcia, O. Factors influencing the interval between calving and the prolificacy of a ram's herd Pelibuey in Venezuela. Cuban Journal of Agricultural Science. 2004; 38:13-17.
- [11] González-Garduño, R., Torres-Hernández, G., Becerril-Pérez, C., Díaz-Rivera, P. Relationship of hair color and environmental factors with reproductive traits in tropical ewes. Agrociencia. 2001; 35:41-50.
- [12] Tec-Canche JE, Magaña-Monforte JG & Segura-Correa JC. Environmental effects on productive and reproductive performance of Pelibuey ewes in Southeastern México, Journal of Applied Animal Research. 2016; 44:(1): 508-512.
- [13] Van-Wyk JB, Fair MD, Cloete SWP. Revised models and genetic parameter estimates for production and reproduction traits in the Elsenburg Dormer sheep stud. S Afr J Anim. Sci. 2003; 33:213-222.

