UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA RUMINAL DEL GANADO RARÁMURI DEL ESTADO DE CHIHUAHUA POR NGS: UN ENFOQUE COMPARATIVO

POR:

I.Z.S.P. ADRIÁN OMAR MÁYNEZ PÉREZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

ÁREA MAYOR: NUTRICIÓN ANIMAL

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO **DICIEMBRE 2021**

Caracterización del microbioma ruminal del ganado rarámuri del estado de Chihuahua por NGS: un enfoque comparativo. Tesis presentada por Adrián Omar Máynez Pérez como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

Ph.D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

D.Ph. Agustín Corral Luna
Secretario de Investigación y Posgrado

Ph.D. Iván Adrián García Galicia
Coordinador Académico

Dra. Monserrath Félix Portillo
Presidente

17 DE DICIEMBRE DEL 2021
Fecha

Comité:
D.Ph. Agustín Corral Luna.
Dr. Francisco Joel Jahuey Martínez.
Dr. José Alfredo Martínez Quintana.

© Derechos Reservados
AUTOR: ADRIÁN OMAR MÁYNEZ PÉREZ
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO R. ALMADA KM.1, CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO C.P. 31453
DICIEMBRE 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la culminación de este proyecto a mi familia. Su amor, apoyo y confianza incondicional me permiten haber llegado hasta aquí.

A la Dra. Monserrath, por brindarme la confianza de afrontar un proyecto de investigación ambicioso y el reto que este supone. Pero principalmente, por la resiliencia mostrada durante momentos difíciles, sin duda un ejemplo como científica y como persona. Al resto de miembros del comité, Dr. Jahuey, Dr. Agustín y Dr. José Alfredo, pues sin su tiempo, enseñanzas y consejos hubiera sido imposible alcanzar los objetivos establecidos. Me quedo con la paciencia, profesionalismo y calidad humana que los caracteriza.

A mis amigos, su motivación y palabras de aliento en momentos difíciles fueron clave para no perder el rumbo y mantenerme enfocado en todo momento. De la misma manera, a los compañeros y amigos de laboratorio, así como al M.C. Octavio Roacho, por su disponibilidad, apoyo y profesionalismo en la recolección de muestras fue un gesto de compañerismo sumamente noble.

A la Facultad de Zootecnia y Ecología por ser mi casa desde la licenciatura. Así mismo, al CONACyT, PRODEP y los doctores Michael Hume y Robin Anderson, que fungieron como apoyo económico (Beca No. 745355), fuente financiadora del proyecto (UACH-PTC-373) y apoyo para la secuenciación de las muestras respectivamente. Finalmente, a la M.Sc. Alexandra Elbakyan, pues sin el acceso a la información que su controversial aportación brindó, la ciencia global y este trabajo no serían posibles.

DEDICATORIA

A Jesús Manuel “Chuma” Máynez Valenzuela, pensador crítico, inventor curioso, lector incansable y abuelo amoroso. Descansa en paz.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 07 de enero de 1996 en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

2014 - 2018	Estudios en la Universidad Autónoma de Chihuahua en la carrera Ingeniero Zootecnista en Sistemas de Producción. Título obtenido con mención honorífica
Enero 2019 - Julio 2019	Técnico laboratorista en el Laboratorio de Biotecnología para la Alimentación de la Facultad de Zootecnia y Ecología.
Agosto 2019 - 2021	Estudios de Maestría en Ciencias en Nutrición Animal en la Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua.

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA RUMINAL DEL GANADO RARÁMURI DEL ESTADO DE CHIHUAHUA POR NGS: UN ENFOQUE COMPARATIVO

POR:

I.Z.S.P ADRIÁN OMAR MÁYNEZ PÉREZ

Maestría en Ciencias

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dra. Monserrath Félix Portillo

Las razas bovinas adaptadas han cobrado importancia en los últimos años como alternativa ante la problemática que supone el cambio climático. Entender la relación entre el animal y el ecosistema microbiano que habita su rumen permitirá identificar características ventajosas de estas razas con respecto a otras comúnmente utilizadas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el microbioma ruminal del ganado Rarámuri en pastoreo y compararlo con el de razas europeas como con la cruza. Un total de 28 hembras bovinas de tres linajes se mantuvieron en pastoreo durante 45 d en un mismo potrero. Posteriormente, se obtuvo una muestra de líquido ruminal de la cual se extrajo DNA y la región V4 del gen 16s rRNA fue secuenciada. Los datos de secuenciación fueron analizados con el software QIIME2 y comparadas contra la base de datos SILVA

16s rRNA. Se realizó un análisis LEfSe para identificar grupos microbianos diferenciados. Se encontró en los animales la presencia de un núcleo microbiano conformado principalmente por los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Las diferencias en los ecosistemas microbianos entre el ganado Rarámuri y europeo se identificaron a través del índice de diversidad beta UniFrac no ponderado ($P<0.05$), así como en el análisis LEfSe que identificó cinco grupos microbianos diferenciados para cada uno de los linajes. Las diferencias observadas entre linajes muestran la capacidad de adaptación del ecosistema ruminal del ganado Rarámuri a las condiciones medioambientales hostiles pues se caracteriza por tener grupos microbianos especializados en la degradación de compuestos con un alto contenido fibroso.

ABSTRACT

NGS CHARACTERIZATION OF THE RUMEN MICROBIOME FROM RARAMURI CRIOLLO CATTLE: A COMPARATIVE APPROACH

BY:

I.Z.S.P. ADRIÁN OMAR MÁYNEZ PÉREZ

Adapted cattle breeds have gained importance in recent years as an alternative to the problems posed by climate change. Understanding the relationship between the animal and the microbial ecosystem that inhabits its rumen will allow to identify advantageous characteristics of these breeds with respect to others commonly used. The objective of this work was to characterize the rumen microbiome of grazing Rarámuri cattle and compare it to that of European breeds and of the cross. A total of 28 cows from three different lineages were kept in grazing for 45 days. Subsequently, a sample of rumen fluid was obtained from which DNA was extracted and the V4 region of the 16s rRNA gene was sequenced. The sequencing data were analyzed with the QIIME2 software and compared against the SILVA 16s rRNA database. A LEfSe analysis was performed to identify differentiated microbial groups. The presence of a microbial core consisting mainly of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* was found. The differences in the microbial ecosystems between the Rarámuri and European lineages were identified through the beta diversity index unweighted UniFrac ($P<0.05$), as well as in the LEfSe analysis that identified five differentiated microbial groups for each of the lineages. The differences observed between

lineages show the ability of the rumen ecosystem of Rarámuri cattle to adapt to hostile environmental conditions as it is characterized by having microbial groups specialized in the degradation of compounds with a high fibrous content.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN…….	vi
ABSTRACT……	viii
LISTA DE CUADROS……..	xii
LISTA DE GRÁFICAS……..	xiii
INTRODUCCIÓN……..	1
REVISIÓN DE LITERATURA…….	5
Desarrollo Sustentable y Seguridad Alimentaria…….	5
Razas Adaptadas……..	6
Ganado Rarámuri…….	8
Fisiología Digestiva del Rumiante……..	10
Microbiota ruminal…….	12
Factores que afectan la composición del microbioma…	14
Microbioma ruminal como órgano endocrino virtual……	16
Metagenómica Ruminal……...	17
MATERIALES Y MÉTODOS……..	24
Descripción del Área de Estudio……	24
Animales y Muestreo de Contenido Ruminal……..	25
Extracción de ADN y Secuenciación del gen 16s rRNA……	25
Análisis Bioinformático…….	28
Análisis Estadístico……...	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN……...	30

Diversidad Alfa…….. 30

Diversidad Beta…… 36

Abundancia Relativa…… 40

Comunidades Diferenciadas……... 49

CONCLUSIONES……. 55

LITERATURA CITADA……. 57

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Número de animales de cada linaje analizado..……..	26
2	Calidad promedio de las secuencias por muestra…….	32
3	Composición teórica y obtenida del estándar microbiano comercial ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard……..	34
4	Resumen de estadísticas para la diversidad alfa entre linajes……...	35
5	Resumen de estadísticas para la diversidad beta entre linajes……...	37
6	Abundancia relativa de microorganismos a nivel taxonómico de filo en microbioma ruminal de diferentes linajes……...	41
7	Abundancia relativa de microorganismos a nivel taxonómico de género con al menos el 1% de abundancia relativa en microbioma ruminal de ganado de diferentes linajes…….....	45

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Análisis de coordenadas principales para el índice de diversidad beta UniFrac no ponderada……..	38
2	Análisis de coordenadas principales para el índice de diversidad beta Bray Curtis……..	39
3	Relación *Bacteroidetes:Firmicutes* en comunidades microbianas ruminales de ganado de los tres linajes en el mismo sitio de pastoreo (P > 0.05)…….	44
4	Análisis discriminante lineal no estricto (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) con los grupos de microorganismos diferenciados por grupos de linaje……..	50

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la conservación de razas adaptadas de ganado ha tomado importancia para los sistemas de producción animal como una alternativa ante los retos que el cambio climático supone (Bowles *et al*., 2014). Estas razas naturalmente seleccionadas contribuyen al desarrollo de países en situación de desigualdad, así como a alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria establecidos por organismos internacionales (FAO *et al*., 2018). Además, la capacidad de estos animales adaptados para sobrevivir en ambientes hostiles y sus características de rusticidad los convierte en un componente benéfico significativo de la biodiversidad del ecosistema local, por lo que representan un recurso genético importante para los objetivos de hambre cero y vida de ecosistemas terrestres de la agenda 2030 para el desarrollo sostenible de la ONU, constituyéndose en una potencial fuente de proteína de origen animal para poblados en condiciones de desigualdad, al tiempo que atenúa la degradación de los ecosistemas (Bowles y Flury, 2015).

En las áridas condiciones del desierto Chihuahuense al norte de México, el ganado Rarámuri ha estado bajo selección natural durante los últimos cinco siglos, aislado del cruzamiento con razas exóticas y siendo manejado por las comunidades indígenas locales (Anderson *et al*., 2015). Esta raza local ha mostrado diferencias en el comportamiento materno, así como una mayor tolerancia al calor con respecto a otras razas (Nyamuryekung'e *et al*., 2017; Nyamuryekung'e *et al*., 2021a; de Alba Martínez, 2011). Así mismo, se ha reportado que el ganado Rarámuri tiene la capacidad de recorrer distancias más

largas para obtener mejores fuentes de alimento, así como un hábito de pastoreo diferenciado de otras razas europeas utilizadas en la región, que le permite diversificar su dieta incluyendo arbustos y cactáceas además de las gramíneas (Ortega-Ochoa *et al*., 2008; Anderson *et al*., 2015; Spiegal *et al*., 2019).

Como rumiantes, estos animales pueden transformar polisacáridos indigestibles en nutrientes absorbibles, gracias al proceso de fermentación ruminal llevado a cabo por un complejo ecosistema microbiano que incluye bacterias, arqueas, hongos y protozoarios (Noel *et al*., 2017). Este microbioma ruminal transforma los componentes de plantas en ácidos grasos volátiles de cadena corta, proteína microbiana y metabolitos secundarios que conforman el 80 % de los nutrientes digeridos por el animal (Bannink *et al*., 2008; Bergman, 1990). De estos microorganismos, la porción procariota representa la fracción más abundante y diversa del ecosistema ruminal con 10^{11} y 10^{9} organismos/mL de bacterias y arqueas, respectivamente. Entre sus funciones están la utilización de fibra y almidón y la degradación de proteína, con una concomitante producción de metano (Bach *et al*., 2005; Krause *et al*., 2013; Elliot *et al*., 2018; Newbold *et al*., 2020). La composición del ecosistema microbiano determina las rutas metabólicas en el rumen y un mayor entendimiento de las interacciones entre microorganismos permitiría explicar de mejor manera la degradación y utilización de nutrientes en el ecosistema ruminal (Edwards *et al*., 2004; Noel *et al*., 2017).

La fermentación en rumen depende directamente de los sustratos disponibles que lleguen a éste, por ello, la dieta del hospedero resulta el factor más importante que afecta la composición del microbioma ruminal (Henderson *et*

al., 2015; Lu *et al*., 2019). En este sentido, el hábito de pastoreo podría determinar la colonización del rumen por grupos de microorganismos específicos, así como las rutas metabólicas utilizadas para el aprovechamiento de los nutrientes (Pereira y Berry, 2017; Shaani *et al*., 2018). Así mismo, el genoma del animal, la localización geográfica, la resistencia al calor, el comportamiento materno y la estación del año son algunos de los factores externos que influencian la composición del bioma ruminal (Meale *et al*., 2016; Noel *et al*., 2017; Golder *et al*., 2018; Dahl *et al*., 2020; Kim *et al*., 2020). A pesar de la información del impacto de estos otros factores sobre el ecosistema ruminal, y de que se sugiere la ocurrencia de un proceso coevolutivo entre el microbioma ruminal y el genoma hospedero, poco se sabe de la composición del ecosistema microbiano ruminal de razas locales adaptadas al pastoreo en condiciones climáticas adversas, en comparación con razas comerciales comúnmente utilizadas por su alto valor productivo, pero poco amigables con el medio ambiente (Guan *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2016; Hoffman, 2013).

En el contexto expuesto, la hipótesis de investigación en este estudio es que, derivado de la selección principalmente natural del ganado Rarámuri, así como de sus hábitos alimenticios, existen diferencias en el microbioma ruminal de este ganado en comparación con el ganado comercial.

Los recientes avances en la tecnología de secuenciación de nueva generación, así como la reducción significativa en los costos de la misma en las últimas dos décadas han permitido describir las poblaciones microbianas presentes en el ecosistema ruminal, incluyendo microorganismos que no habían

podido ser identificados mediante el uso de tecnologías previas, tales como cultivos anaerobios, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (TRFLP) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Schwarze *et al*., 2018; Thomas *et al*., 2017). Haciendo uso de esta potente herramienta de secuenciación masiva, el objetivo del presente estudio fue caracterizar y comparar el microbioma ruminal de tres linajes bovinos (Rarámuri, razas europeas y cruza entre ambas) pastoreando en un mismo potrero, sin suplementación y bajo las condiciones medioambientales hostiles del norte de México.

REVISIÓN DE LITERATURA

Desarrollo Sostenible y Seguridad Alimentaria

El desarrollo sostenible fue definido por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) como aquel que satisface las necesidades actuales sin comprometer las necesidades de generaciones futuras. Dicho concepto se estableció ante las diversas problemáticas ambientales emergentes en los últimos años, con el objetivo de ampliar el término que limitaba el desarrollo de los países a factores económicos (Asamblea general de las Naciones Unidas, 1987). Posteriormente, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA) definió como seguridad alimentaria, “el acceso físico, social y económico suficiente de todas las personas en cualquier momento a alimento seguro, nutritivo y de su preferencia” (FAO, 1996).

En septiembre de 2015, como parte de los esfuerzos para impulsar el bienestar humano mediante la administración integral de activos económicos, sociales y medio ambientales, fue aprobada la Agenda 2030 por los 193 Estados miembros que conforman la ONU (Clark *et al.*, 2016). La Agenda 2030 establece 17 objetivos para el desarrollo sostenible (ODS) y 169 metas que comprenden las dimensiones sociales, económicas y ambientales (Comisión económica para América Latina y el Caribe, 2016). Los ODS establecidos incluyen: fin de la pobreza; hambre cero; salud y bienestar; educación de calidad; igualdad de género; agua limpia y saneamiento; energía asequible y no contaminante; trabajo decente y crecimiento económico; industria, innovación e infraestructura; reducción de las desigualdades; ciudades y comunidades sostenibles;

producción y consumo responsable; acción por el clima; vida submarina; vida de ecosistemas terrestres; paz, justicia e instituciones sólidas; y alianzas para alcanzar los objetivos (Asamblea general de las Naciones Unidas, 2015).

El segundo objetivo establecido por la ONU, “Hambre Cero” tiene como propósito poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y mejorar la nutrición mundial (Swaminathan, 2014; Comisión económica para América Latina y el Caribe, 2016). Este objetivo está conformado por cinco metas principales y tres secundarias, dentro de las cuales destacan aquellas que buscan asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción a través de prácticas que contribuyan al mantenimiento de ecosistemas, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático y mejoren progresivamente la calidad de la tierra y el suelo, así como el mantenimiento de la diversidad genética de animales de granja y domesticados (Comisión económica para América Latina y el Caribe, 2016). La correcta adecuación de los sistemas de producción de ganado bovino puede contribuir al logro de estas metas en los renglones de seguridad alimentaria y en el alcance de los objetivos establecidos (Díaz, 2014).

Razas Adaptadas

El ganado bovino habita diversas zonas geográficas y ambientes socioculturales variables, consecuencia de la selección humana y de las condiciones medioambientales hostiles a las que se han enfrentado durante los últimos 10,000 años (Felius, 1995). Gracias a la domesticación, un proceso dinámico multifactorial, estos animales, han jugado un papel fundamental en el desarrollo de las culturas a nivel mundial, siendo parte de la alimentación,

economía, cultura y religión de las sociedades (Weldenegodguad *et al*., 2019). Así mismo, estos factores socioculturales y la diversidad en los sistemas de producción han propiciado las condiciones para el surgimiento de las diferentes razas de ganado adaptadas a diferentes regiones, entendiéndose “raza” como el concepto utilizado para agrupar animales con características similares en función de su origen y localización geográfica (Hoffmann, 2013).

No obstante, durante las últimas décadas, la demanda del modelo económico por rentabilizar los sistemas de producción ha provocado el abandono y dilución genética de razas locales adaptadas a su entorno (Marsoner *et al*., 2018). El uso de razas comerciales en la industria pecuaria cuyas características productivas permiten incrementar las ganancias ocasionó la pérdida a nivel mundial de hasta una raza local cada dos semanas para principios del siglo XXI (Köhler-Rollefson, 2008). La poca utilidad de las razas locales para el sistema económico actual y su eventual extinción como consecuencia del desplazamiento hacia otras razas, tienen además un impacto sociocultural sobre los pueblos que han desarrollado una relación simbiótica con los animales desde hace cientos de años (Gandini y Villa, 2003).

Sin embargo, en los últimos años la búsqueda de la sostenibilidad ha incrementado el interés por preservar las razas locales (Hoffmann, 2011). La rusticidad desarrollada, a través de siglos de adaptación por estos animales para sobrevivir en sus entornos específicos los convierte en un repositorio de material genético útil para los sistemas de producción ante la necesidad futura de adaptarse a condiciones medioambientales y sanitarias variables, como

consecuencia del cambio climático (Boettcher *et al*., 2010; Kantanen *et al*., 2015). Así mismo, la adaptabilidad de las razas locales les permite tener funciones ecológicas que contribuyan a la salud del ecosistema, a través de un impacto menos agresivo sobre la composición vegetal del hábitat, gracias al proceso coevolutivo entre los mamíferos de pastoreo y la flora presente en el entorno (Tasser *et al*., 2007; Pauler *et al*., 2019; Pauler *et al*., 2020). Finalmente, la contribución inmaterial del ganado adaptado en las áreas socioculturales, recreativas y educativas en los pueblos donde participa, es otra de las razones por las que el mantenimiento de las razas locales ha tomado importancia en años recientes como pilar fundamental del desarrollo sustentable de las regiones (Hoffmann *et al*., 2014).

Ganado Rarámuri

El ganado criollo chihuahuense, también conocido como ganado Rarámuri, es una raza de ganado nativa del estado de Chihuahua, México (de Alba, 1987; Quezada-Casasola *et al*., 2013). El ganado bovino fue introducido al sur del estado de Chihuahua en 1572 durante la conquista y posteriormente llevado a las culturas nativas de la Sierra Tarahumara por misioneros católicos durante el proceso de evangelización (Gajdusek, 1953). Actualmente, se estima que existen alrededor de 130,000 cabezas de ganado Rarámuri en las regiones montañosas y desérticas del norte de México con temperaturas variantes que oscilan entre los -15 y 45 °C y una precipitación media anual entre 225 y 540 mm (Ríos, 1997; Quezada-Casasola *et al*., 2013; INEGI, 2017).

El ganado Rarámuri tiene su origen en las cruzas de razas españolas, como Retinta andaluz, Rubia gallega, Murcia sanabranesa, entre otras (Quezada-Casasola *et al*., 2013). La selección natural y el aislamiento de los animales en zonas montañosas y desérticas junto a grupos indígenas, generó un acervo genético y le brindó características de raza propia (McTavish *et al.,* 2013; de Alba, 1987). Entre estas características, están sus capacidades físicas (fuerza, agilidad, velocidad y cornamenta) y temperamentales, que lo hacen ideal para deportes como el rodeo (Félix-Portillo *et al.,* 2004).

La adaptabilidad del ganado criollo es resultado de las condiciones ambientales a las que se enfrentó durante siglos, tales como la necesidad de obtener forrajes de mejor calidad, sobrevivir en condiciones climáticas extremas y en sistemas de producción extensivo con poco o nulo manejo sanitario. (Russell *et al.,* 2000). Este entorno obligó a la raza a desarrollar características particulares que incluyen: una mayor utilización de la superficie de terreno en la temporada de seca para obtener mejor calidad de forraje, superando a las razas europeas por entre 17.2 y 31.4 ± 6.5 ha (Spiegal *et al*., 2019); termotolerancia, que le permite mantener su temperatura corporal en 38.5 °C durante el día en verano en comparación con el ganado europeo que tiende a superar los 39.5 °C durante el día en la misma temporada (Nyamuryekung'e *et al*., 2021a); y resistencia a enfermedades posiblemente asociada al potencial genético del ganado criollo para responder a una mayor cantidad de antígenos presentes en patógenos (Félix-Portillo *et al*., 2006).

Debido a su alta adaptabilidad y bajo impacto ecológico, en las últimas décadas, el ganado criollo ha sido propuesto como alternativa productiva para obtener proteína de origen animal que no afecte negativamente las condiciones del ecosistema (Anderson *et al.*, 2015; Quezada-Casasola *et al.*, 2014; Núñez-Domínguez *et al.*, 2016; INIFAP, 2013). Así mismo, se ha sugerido el uso de razas de pastoreo locales como protector de áreas de pastizal al evitar la sucesión de especies arbóreas y preservar los recursos genéticos de la región (Rysiak *et al*., 2021).

Fisiología Digestiva del Rumiante

Los rumiantes en contraste con el resto de los mamíferos, tienen un sistema digestivo con marcadas diferencias que les permiten utilizar polisacáridos estructurales como la celulosa o hemicelulosa como fuentes de energía (McDonald *et al.*, 2002). Estos componentes de la fibra están presentes en la pared celular de la célula vegetal y representan la principal fuente de energía presente en la biósfera, por lo que su aprovechamiento resulta ventajoso para estos mamíferos (Saha *et al*., 2005; Church *et al*., 2002). Esta ventaja competitiva es producto de un largo proceso evolutivo y le permitió al ancestro de los rumiantes aprovechar grandes cantidades de alimento alejado de los depredadores y con competencia mínima (Nikkhah, 2011).

En contraste con otros mamíferos, los rumiantes carecen de incisivos superiores, así como de la capacidad de secretar enzimas degradadoras de almidón en la saliva. No obstante, pueden llegar a producir de forma constante más de 100 litros de saliva por día, la cual es fuente de nitrógeno (N), fósforo (P)

y sodio (Na) para el resto del sistema digestivo, además de funcionar como solución amortiguadora que ayuda a mantener el pH óptimo a nivel ruminal (Church *et al.*, 2010).

El estómago de los rumiantes consta de cuatro compartimentos o cavidades con funciones diferentes: el retículo dirige el alimento ingerido en dirección ruminal u omasal, además de encargarse del proceso de regurgitación durante la rumia que permite incrementar la digestibilidad del bolo alimenticio mediante la remasticación; posteriormente se encuentra el rumen, el más grande de los compartimentos que además de almacenar alimento, funciona como una cámara fermentativa anaerobia, donde una vasta población de microorganismos a través de la secreción de enzimas, metabolizan compuestos indigestibles para el mamífero y proporcionan moléculas aprovechables para el individuo, principalmente en forma de ácidos grasos de cadena corta que se absorben en las paredes ruminales; el tercer compartimento es el omaso, en el cual se continúan absorbiendo ácidos grasos volátiles, producto de la fermentación previa y parte de agua. El omaso también reduce el tamaño del bolo alimenticio y funciona como control de paso del alimento al estómago verdadero; finalmente, en el abomaso, también conocido como estómago verdadero por su similitud al estómago glandular en los no rumiantes, enzimas proteolíticas y ácido clorhídrico son secretados por el organismo animal para la digestión proteica proveniente tanto de la dieta como de la masa microbiana y parte de los nutrientes son absorbidos (Curch *et al.*, 2010; Clauss y Hofmann, 2014; Leek, 2004).

Las porciones finales del aparato digestivo de los rumiantes son el intestino delgado y grueso. En el primero, continúa la secreción de enzimas propias del animal, principalmente aquellas que se encargan de la digestión de carbohidratos no estructurales y se lleva a cabo la absorción de los productos resultantes y de los lípidos (Harmon *et al.*, 2014). Por su parte, en el intestino grueso, además de la absorción de proteínas, ocurre una segunda fermentación en menor medida de la que se presenta a nivel ruminal, pues en ésta el hospedero obtiene del 5 al 10 % de la energía del alimento (Gressley *et al.*, 2011).

Microbiota Ruminal

La digestión de compuestos lignocelulósicos a nivel ruminal es llevada a cabo por un complejo microbiano conformado por protozoarios, arqueas, hongos y bacterias (Kim *et al.*, 2011). La degradación microbiana de los componentes de la pared celular de plantas, producen azúcares solubles y ácidos grasos de cadena corta, principalmente acético, propiónico y butírico. Así mismo, parte de los microorganismos pasan al resto del sistema digestivo para convertirse en fuente de proteína y aminoácidos para el organismo hospedero (Creevey *et al.*, 2014). Los productos finales de la fermentación ruminal incluyen dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), los cuales son liberados al medio ambiente a través del eructo y representan una pérdida de energía de entre 2 y 12 % de la energía total ingerida (Broueck, 2014; McCann *et al.*, 2014). Estos gases además de representar una pérdida de energía, generan un efecto invernadero que atrapa calor dentro de la atmósfera haciéndolos partícipes de la problemática ambiental actual (Fletcher y Schaefer, 2019). La producción de rumiantes es la actividad

antropogénica con mayor aporte de CH_4 al ambiente, la cual representa 2,448 millones de toneladas equivalentes de CO_2 anualmente (Baca-González *et al*., 2020).

Los protozoarios, representan hasta el 50 % de la biomasa presente en el rumen, mientras que los hongos pueden significar entre el 8 y 20 %, las arqueas entre 0.3 y 4 % y finalmente, el resto está conformado por las bacterias, que a pesar de no representar la mayor parte de la biomasa, son el grupo taxonómico más abundante del ecosistema ruminal (Williams y Coleman, 1992; Tapio *et al.*, 2017). La colonización del rumen se lleva a cabo de forma vertical por transferencia de la madre a la cría a través del canal de parto, saliva, piel, superficie del pezón, entre otros, y alcanza a colonizarse en más del 90% por bacterias anaerobias alrededor de los dos años de edad (Chaucheyras-Durand y Ossa, 2014).

La metabolización ruminal del alimento consumido por el hospedero depende de las características del mismo, pues los mecanismos de degradación serán diferentes dependiendo del sustrato. Los componentes de la pared celular de plantas, conformados principalmente por compuestos lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) son metabolizados por bacterias especializadas, protozoarios ciliados y hongos, los cuales tienen la capacidad de secretar celulasas (endo-glucanasas, exo-glucanasas y celobiohidrolasas) que permiten obtener glucosa de los componentes estructurales (Morgavi *et al.*, 2012). Los azúcares altamente fermentables como el almidón y la pectina son degradados por microorganismos capaces de secretar endo y exo amilasas, así

como α celobiasas, enzimas que permiten obtener monómeros de azúcar libres de estos sustratos (McSweeney y Mackie, 2012). La degradación de lípidos es llevada a cabo por algunas bacterias y protozoarios lipolíticos que hidrolizan triglicéridos, galactolípidos y fosfolípidos presentes en la dieta, en ácidos grasos de cadena corta, glicerol y galactosa. Por otro lado, los ácidos grasos insaturados de cadena larga sufren un proceso de biohidrogenación en el que son saturados por completo como mecanismo de defensa microbiana (Jenkins, 1992). Por último, bacterias proteolíticas metabolizan proteínas en amoníaco, el cual es aprovechado junto a la urea y fuentes de nitrógeno no proteico como el biuret o ácido úrico como precursores para la síntesis de proteína microbiana. Así, la actividad proteolítica es llevada a cabo por proteasas de tipo cisteína y serina, principalmente secretadas por grupos de bacterias proteolíticas, dando como resultado algunos péptidos y aminoácidos libres que posterior a la acción de peptidasas son aprovechados por microorganismos (McSweeney y Mackie, 2012).

Factores que afectan la composición del microbioma. Las diferencias presentes en el microbioma ruminal de los individuos varían no solamente en la composición del ecosistema, sino también en la proporción de los microorganismos (Seshadri *et al*., 2018). Esta diversidad en el microbioma es consecuencia de diversos factores externos a los que se enfrenta el animal, al variar la inoculación de microorganismos y las condiciones que promueven la predominancia de grupos específicos (Huws *et al*., 2018). La dieta es el factor principal que interfiere en la composición y proporción de microorganismos

presentes en el ecosistema ruminal; la metabolización de los sustratos modifica las condiciones ruminales beneficiando a las especies especializadas en la utilización de dichos sustratos (Newbold y Ramos-Morales, 2020). Por ello, el tipo de alimento al cual tienen acceso los animales impacta directamente sobre las poblaciones presentes en el ecosistema ruminal (Elliott *et al*., 2018; Belanche *et al*., 2012; Huws *et al*., 2018). De este modo, un aumento en la cantidad de fibra promueve un incremento en grupos como *Ruminococcaceae* o *Fibrobacteraceae* especializados en la degradación de estos compuestos (Thoetkiattikul *et al*., 2013); también, animales a los que se les ofrece proteína *ad libitum* tienden a incrementar su proporción de *Prevotellaceae* involucrados en el metabolismo de proteínas (Latham *et al*., 2018). Así mismo, el efecto del individuo también influye en el microbioma presente en el animal. Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado que ciertas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de algunos grupos bacterianos son altamente heredables, en el ganado bovino aún se desconoce la causa biológica de dicho patrón (Sasson *et al*., 2017). De la misma manera, la influencia materna, el tipo de parto, el sistema de producción, el estrés, la estación del año y el estado de salud en el cual se encuentre el animal son factores que tienen un impacto sobre la composición de la microbiota ruminal (Cui *et al*., 2020; Cunningham *et al*., 2018; Belanche *et al*., 2019; Kim *et al*., 2020; Noel *et al*., 2017; McCann *et al*., 2016).

A su vez, los cambios ocasionados en la fermentación ruminal como consecuencia de las variaciones en la composición del microbioma ruminal impactan el comportamiento productivo y sanitario del animal (McCann *et al*.,

2016; Matthews *et al*., 2019). Como ejemplo, poblaciones microbianas utilizadoras de H_2 como *Megasphaera elsdenii* o *Selenomonas ruminantium* están asociadas a diversas rutas metabólicas que les permiten redirigir el hidrógeno acumulado hacia la producción de propionato y butirato, disminuyendo las emisiones de metano del ganado (Huws *et al*., 2018; Wang *et al*., 2017; Direkvandi *et al*., 2021).

Microbioma ruminal como órgano endocrino virtual. Al igual que los órganos y sistemas endocrinos, el microbioma ruminal tiene la capacidad de producir una amplia variedad de hormonas que tienen efecto sobre el funcionamiento de otros órganos y sistemas (Clarke *et al*., 2014). Este ecosistema ruminal también puede considerarse un sistema, al estar compuesto por diversas células con diferentes roles como el sistema circulatorio o respiratorio (Evans *et al*., 2013). Por ello, entender la composición, el genoma y expresión de genes del vasto microbioma ruminal resulta fundamental para aprovechar su potencial endocrino (O'Callaghan *et al*., 2016).

Las vías de señalización entre el sistema nervioso y el microbioma incluyen la regulación de la secreción de neurotransmisores como cortisol, serotonina o triptófano en el ecosistema ruminal, los cuales a su vez impactan el eje hipotalámico pituitario adrenal y afectan el sistema nervioso central (Das y Ranjan, 2020). Por otro lado, el nervio vago funcionaría como puente entre el microbioma y el cerebro, al estar conectado al sistema nervioso ruminal por neuronas motoras que regulan la motilidad ruminal y que hacen sinapsis con neuronas sensoriales del plexo ruminal expuestas al microbioma (Powely *et al*.,

2008). A su vez, este impacto sobre el sistema nervioso central tiene efecto en el epitelio ruminal promoviendo el crecimiento de la superficie del mismo (Nicholson *et al*., 2005). Entender el eje cerebro-ruminal permitiría desarrollar estrategias potenciales de intervención al ecosistema ruminal como el uso de probióticos con impacto sobre la salud, producción y seguridad alimentaria de los sistemas de producción como alternativa al uso de antibióticos y promotores de crecimiento hormonales (O'Callaghan *et al*., 2016).

Metagenómica Ruminal

La metodología involucrada en el entendimiento del ecosistema ruminal, su funcionamiento y relación con el hospedero ha cambiado con el paso del tiempo (Li *et al*., 2012). Estas tecnologías incluyen el uso de cultivos anaerobios, polimorfismo terminal de la longitud de fragmentos de restricción (TRFLP), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) o PCR en tiempo real (qPCR) (Gijzen *et al*., 1985; Thoetkiattkul *et al*., 2013; Thomas *et al*., 2017). Sin embargo, a pesar de los avances que representaron, estas tecnologías no ofrecen la posibilidad de caracterizar y analizar el microbioma ruminal en su totalidad, limitándolas a ciertos microorganismos (Zeng *et al*., 2015). En este sentido, las técnicas recientes de secuenciación masiva han permitido en las últimas décadas expandir el área de conocimiento dentro de los microbiomas caracterizados (Koringa *et al*., 2018).

La secuenciación de nueva generación y el desarrollo de nuevas tecnologías como las ciencias "*Ómicas*", como la metagenómica, la

transcriptómica, la proteómica y la metabolómica en años recientes, han permitido incrementar el conocimiento de la microbiota ruminal y su relación simbiótica con el rumiante (Van Dijk *et al.*, 2014; Denman *et al.*, 2018). Así mismo, el interés por entender la relación del microbioma con características productivas en los animales como la producción de carne o huevo, ha incrementado (Jami *et al.*, 2014).

La caracterización del genoma a través de marcadores taxonómicos se ha denominado “metataxonómica”, mientras que la caracterización basada en el genoma a través de secuenciación del genoma completo o “*shotgun*” ha sido denominada “metagenómica” (Marchesi y Ravel, 2015). La metataxonómica, analiza regiones conservadas del genoma, pero con la suficiente variación entre estas para diferenciar géneros y especies presentes en el microbioma (Kim *et al.*, 2011). Esta reciente ciencia ómica apareció con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, que permiten identificar microorganismos en ambientes complejos con un alto rendimiento (Marchesi y Pavel, 2015; Janda y Abbott, 2005). El gen 16S rRNA en bacterias y arqueas, así como el gen 18S rRNA en células eucariotas son las regiones habitualmente utilizadas para la caracterización taxonómica (Kittelmann *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2015). Las secuencias de la región del gen utilizado son agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs): grupos de lecturas que difieren en menor cantidad de un umbral definido, generalmente 3 % para especies, 5 % para género y 20 % para filo (Westcott y Schloss, 2015).

El análisis de secuencias crudas del gen 16s rRNA es un proceso que incluye: la unión de lecturas pares en secuencias individuales, un control de calidad, recorte de las lecturas y por último, la asignación taxonómica en comparación con una base de datos (Marizzoni *et al*., 2020). Diversos programas de procesamiento de datos en serie se han desarrollado para el análisis de datos crudos de secuenciación que sigan los pasos previamente mencionados, tales como QIIME2, Bioconductor, USEARCH o mothur, los cuales funcionan en diversos sistemas operativos como Windows, Mac o Linux (Bolyen *et al*., 2019; Callahan *et al*., 2016). Para el análisis específico de microbioma ruminal, QIIME y mothur son los principales programas de procesamiento utilizados, sin diferencia estadística entre ambos al ser comparados (López-García *et al*., 2018). Por otra parte, las principales bases de datos utilizadas para la asignación taxonómica incluyen SILVA, GreenGenes y RDP, las cuales a diferencia de la metodología de análisis tienen impacto sobre el conjunto de datos referenciado, siendo SILVA el ideal en el análisis del microbioma ruminal, debido a que es una base de datos con resultados constantes independientemente de la herramienta de procesamiento de datos utilizada, además, está en continua actualización a diferencia de otras (López-García *et al*., 2018; Han *et al*., 2015). El análisis de estas secuencias permite conocer entonces, la riqueza del ecosistema ruminal, definida como el número de especies en un área o muestra, así como la diversidad del microbioma, definida como la relación entre el número de especies y el número de individuos por especie (Spellerberg y Fedor, 2003). Estos términos son empleados para determinar índices de diversidad en la población, siendo los índices de diversidad α los que evalúan la riqueza de especies en un ecosistema,

mientras que los índices de diversidad β incluyen la proporción de las especies encontradas para determinar la diversidad del ecosistema microbiano (Crist *et al*., 2003). Dentro de estos índices, los propuestos por Shannon (1949) y Simpson (1949) han sido los más utilizados en la ecología de poblaciones durante las últimas décadas (Gorelick, 2006). El índice de Shannon estima el promedio para predecir el tipo de individuos que se encontrarán en una subunidad del ecosistema, mientras que el índice propuesto por Simpson indica la probabilidad de que dos subunidades del ecosistema de igual tamaño contengan las mismas especies (Nagendra, 2002). Ambos índices han sido ampliamente utilizados en estudios de microbioma ruminal (Wang *et al*., 2021; Kim *et al*., 2020; Freetly *et al*., 2020). Aunado a los índices de diversidad, el estudio del microbioma ha impulsado el desarrollo de métodos estadísticos que permitan entender mejor el complejo ecosistema ruminal y sus interacciones. Uno de estos métodos es el análisis discriminante lineal no estricto (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe), el cual identifica características en un conjunto de datos como organismos, especies, OTUs, genes o metabolitos, que expliquen las diferencias entre clases mediante pruebas de significancia estadística (Segata *et al*., 2011). Esta prueba apoya a la identificación de biomarcadores que expliquen la diferenciación de dos o más fenotipos de interés por medio de la estimación de cada una de las características involucradas en un fenómeno observado (Segata *et al*., 2011). Para estudios de diversidad microbiana en ecosistemas ruminales, este análisis ha sido ampliamente utilizado en la identificación de grupos de microorganismos diferenciados entre clases, ya que el algoritmo desarrollado para la prueba LEfSe incluye información biológica que en conjunto con las pruebas estadísticas

proporciona una tasa de falsos positivos más baja con respecto a otras pruebas estadísticas utilizadas en análisis metagenómicos (Segata *et al*., 2011).

Con la utilización de estas herramientas para estudiar la microbiota ruminal, se ha sugerido el uso del término de núcleo o "*core*" microbiano, que se define como el conjunto de microorganismos que está presente en todos o la mayoría de los rumiantes, independientemente de la especie, sexo, alimentación o ubicación geográfica (Henderson *et al.*, 2015). En ganado en pastoreo, Pitta *et al.* (2014) encontraron diferencias en la proporción entre especies de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* de 2:1 a 4:1 cuando se incrementa el contenido de proteína al que el ganado tiene acceso. Estos resultados difieren con los reportados por Noel *et al.* (2017), quienes encontraron una proporción mayor de *Firmicutes* en relación a *Bacteroidetes* (82.1 % y 11.8 %, respectivamente) en ganado en pastoreo sin suplementación, sin embargo, concuerdan en que los cambios en la proporción varían dependiendo de la época del año, como consecuencia del cambio de alimentación por la variación de especies vegetales presentes en el pastizal. Así mismo, la aplicación de estas tecnologías ha permitido diferenciar el ecosistema ruminal en función de la raza del animal (Huws *et al*., 2018). Wallace *et al.* (2019) identificaron 39 grupos de microorganismos en el microbioma ruminal asociados al genoma y fenotipo de los individuos hospederos en un estudio que incluyó 1,000 hembras lecheras de diversos países europeos. De la misma manera, Li *et al.* (2019) observaron diferencias en el perfil ruminal microbiano entre las razas Angus, Charolais y Kinsella; estas diferencias fueron asociadas en mayor medida a nivel

metagenómico (diversidad de especies dentro del ecosistema) que a nivel metatranscriptómico (expresión de genes por las comunidades del ecosistema) donde la diferencia fue menos evidente.

Así mismo, el uso de tecnologías y técnicas de nueva generación para la caracterización del microbioma, ha permitido la identificación de "*keystone species"* o "especies clave" en el ecosistema microbiano (Gibbons, 2020). El término de especie clave surge para señalar a aquellas especies dentro del ecosistema cuyo impacto sobre el resto de las comunidades sea desproporcional con respecto a su abundancia relativa, es decir, grupos microbianos en baja proporción que tienen un efecto considerable sobre el ecosistema (Gotoh *et al*., 2019). Esto sugiere que incluso un cambio minúsculo sobre la microbiota podría perturbar el ecosistema por completo si alguna de estas especies clave resulta afectada (Fisher y Mehta, 2014). No obstante, en los últimos años se ha propuesto sustituir el uso del término de "especie clave" por el de "*keystone group"* o "grupo clave", ya que el impacto de estas comunidades suele ser en pequeños grupos y rara vez está asociado a una sola especie (Ze *et al*., 2013).

La aplicación de estas herramientas contribuye al entendimiento de las complejas interacciones tanto de los componentes del microbioma entre sí, como de este último con el organismo hospedero, mediante la construcción de modelos metabólicos orientados a la aplicación productiva, sanitaria, reproductiva y ambiental (van der Ark *et al.*, 2017; Denman *et al.*, 2018). Tales como, los reportados por Tapio *et al.* (2017), quienes señalan la relación entre la abundancia de grupos como *Proteobacteria* y ciertos *Bacteroidetes* con la

producción de metano del ecosistema ruminal. Stergiadis *et al.* (2021) por su parte, reportaron el impacto de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Weisella* sobre la presencia de ácidos grasos saturados en leche. A su vez, la presencia de familias como *Veillonellaceae* y *Lachnospiraceae*, y géneros como *Dialister* y *Acidaminococcus* han sido reportados como grupos de microorganismos relacionados con la ganancia diaria de peso en ganado de carne (Myer *et al*., 2015). De la misma manera, *Prevotella* e *YRC22* han sido reportados como los géneros con mayor abundancia en hembras Holstein que presentan un cuadro de acidosis ruminal subaguda (McCann *et al*., 2016). Estos resultados ejemplifican la importancia de continuar caracterizando el microbioma ruminal de razas adaptadas tales como el ganado Rarámuri que habitan en condiciones medioambientales específicas que permita expandir la frontera del conocimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología para la Alimentación de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, en Chihuahua, Chihuahua, México. Todos los experimentos que incluyeron animales se realizaron bajo protocolos aprobados y siguiendo el Código de Bioética y Reglamento de Bienestar Animal FZyE de la Universidad Autónoma de Chihuahua (2015), basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Descripción del Área de Estudio

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Experimentación y Transferencia de Tecnología Teseachic de la Universidad Autónoma de Chihuahua (28° 48’ N; 107°25’ O) ubicado al noreste de la Sierra Madre Occidental a 210 km de la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México. El rancho experimental tiene una superficie de 10,000 ha con una elevación variable entre 1,900 y 2,800 msnm y un clima caracterizado por gélidos inviernos con una temperatura mínima de -14 °C en diciembre y calurosos veranos con una temperatura máxima de 36 °C en junio. La precipitación pluvial anual del área de estudio oscila alrededor de los 580 mm y tiene una humedad relativa del 60%. La vegetación presente está conformada por bosque de pino, bosque de roble, pastizal con bosque de roble, pastizal abierto y matorral (Nyamuryekung’e *et al*., 2020). El potrero que los animales habitaron (La Selva) tiene una superficie de 200 ha y una elevación entre 2,090 y 2,256 msnm.

Animales y Muestreo de Contenido Ruminal

Un total de 28 hembras bovinas en su segundo ciclo productivo fueron dividas en tres grupos en base a su linaje (Cuadro 1). Los animales permanecieron 45 días (noviembre-diciembre) en el potrero pastoreando sin suplementación; posteriormente fueron transportados al área de manejo del rancho experimental 24 horas previas a la toma de muestra donde se mantuvieron con agua a libre acceso y sin alimento para facilitar el procedimiento de muestreo. Un total de 40 mL de líquido ruminal por animal fueron tomados mediante el método modificado de Geishauser y Gitzel (1995) utilizando una sonda ororuminal y un fragmento de madera que evitara el masticado de la sonda por parte del animal y la subsecuente contaminación con saliva. La muestra de fluido se extrajo por gravedad inclinando la cabeza del animal y se descartaron los primeros 100 mL del fluido para evitar la contaminación con saliva. Las muestras recolectadas en tubos cónicos de 50 mL fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido a -196 °C y finalmente transportadas al laboratorio para su procesamiento. El periodo de obtención de líquido ruminal desde la toma de la muestra hasta su congelado fue no mayor a 10 s.

Extracción de ADN y Secuenciación del Gen 16s rRNA

El procesamiento de cada muestra previo a la extracción de ADN consistió en agitación en vórtex durante 1 min y filtración a través de una gasa estéril hasta obtener 15 mL que se centrifugaron a 10,000 x g por 10 min a 4 °C (Centrifuge 5810R, Eppendorf, USA).

Cuadro 1. Número de animales de cada linaje analizado.

Linaje	Raza	Número de Animales	Total
Rarámuri	Rarámuri	13	13
Europeas	Angus	3	9
	Hereford	2	
	Angus x Hereford	4	
Cruzas	Angus x Rarámuri	6	6

A partir del precipitado que se obtuvo por centrifugación, se extrajo el ADN utilizando el kit comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit siguiendo las indicaciones del fabricante (Zymo Research, Irvine, CA, USA). La concentración de ADN por muestra a 260 nm y grado de pureza por la relación 260/280 fue determinada por absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Walmington, DE, USA) y la integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Posteriormente, las muestras fueron diluidas a 10 ng/µL y 100 µL fueron enviados a un laboratorio comercial de secuenciación, MR DNA Lab (Shallowater, TX, EUA) para su procesamiento, incluyendo 50 µL del control de comunidades microbianas ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Zymo Research, Irvine, CA, USA). La región hipervariable V4 del gen 16s rRNA fue amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), que contienen un código de barras de 8 bases en la región 5' del primer forward. La mezcla incluyó 2.5 µL del DNA microbiano (5 ng/µL), 5 µL de cada primer (1 µM) y 12.5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix, para un volumen final por reacción de 25 µL. La reacción de PCR consistió en 30 ciclos utilizando la enzima HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, Ca, USA) con las siguientes condiciones: 94 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, seguido de una elongación final de 72 °C por 5 min. Los fragmentos de PCR fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, posteriormente purificados para remover dNTPs y componentes de la reacción mediante AMPpure (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, USA). Las

librerías de ADN Illumina fueron preparadas agrupando los fragmentos para finalmente, llevarse a cabo la reacción de secuenciación de 250 pb en la plataforma MiSeq Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de la secuenciación se observó en el programa FastQC (versión 0.11.9) mediante la calificación de Phred donde el valor Q es la propiedad logarítmica de encontrar error en alguna base dentro de la secuenciación (Liao *et al*., 2017). A mayor calificación Q menor probabilidad de error.

Análisis Bioinformático

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron demultiplexados utilizando el software Quantitative Insights into Microbial Ecology 2.0 (QIIME2, versión 2019.1) siguiendo el protocolo establecido por Bolyen *et al.* (2019). Las secuencias demultiplexadas fueron filtradas por puntaje de calidad (Q > 25) y traslapadas con la herramienta DADA2 (Challahan *et al*., 2016). Posteriormente, se hizo la clasificación taxonómica de las secuencias utilizando como referencia la base de datos SILVA 16s rRNA gene (versión 132) (Quast *et al*., 2013).

Los índices de diversidad alfa incluyendo OTUs observados, Shannon y Simpson se calcularon con el software QIIME2. Así mismo, los índices de diversidad beta, Bray-Curtis y UniFrac no ponderada fueron obtenidos y visualizados en gráficas de coordenadas principales (PCoA) mediante el mismo software (Bray y Curtis, 1957; Lozupone y Knight, 2005).

Análisis Estadístico

Una vez verificados los supuestos de normalidad y homocedasticidad por medio de pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente, los índices de diversidad alfa y la relación *Bacteriodetes*:*Firmicutes* fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) entre grupos, utilizando el linaje como factor en el paquete estadístico (versión 3.6) del software Rstudio (versión 1.2.1335). Por otro lado, los índices de diversidad beta fueron analizados mediante un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA) con 999 permutaciones para identificar diferencias entre grupos mediante el software QIIME2 (Bolyen *et al*., 2019). Las diferencias entre grupos a nivel taxonómico de filo y género (con al menos el 1% de abundancia) fueron analizados mediante la prueba Kruskal-Wallis de un solo factor, seguido de una prueba de Wilcoxon en Rstudio (versión 1.2.1335). Para determinar grupos de microorganismos abundantemente diferenciados entre linajes se llevó a cabo un análisis discriminante lineal no estricto (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) con un valor de LDA mayor a 2.0 en https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy (Segata *et al*., 2011). El nivel de significancia estadístico establecido fue de $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad de la secuenciación mostró una calificación Q Phred que oscila alrededor del 35 para todas las muestras (Cuadro 2), lo que se considera una secuenciación de alta calidad por su baja tasa de error en una base de cada 3,500 (Kim *et al*., 2020). Por su parte, el estándar microbiano comercial ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard mostró una composición similar a la composición teórica señalada por el fabricante (Cuadro 3). Los datos de estos grupos microbianos en el presente estudio alcanzaron un nivel de especificidad en la identificación hasta el nivel taxonómico de género, mismo que posteriormente se reflejó en el resto del estudio.

Diversidad Alfa

Un total de 1,010,882 lecturas con una media de 36,102 lecturas por muestra pasaron el control de calidad y la remoción de secuencias compuestas formadas por dos o más secuencias concatenadas, también denominadas quimeras (Wright *et al*., 2012). Las secuencias tuvieron una longitud media de 291 ± 10.34 nt correspondiente a la región hipervariable V4 del gen 16s rRNA. Posterior a su agrupamiento considerando un 97% de similitud, las secuencias mostraron una cobertura de Good's de 99.99% (Cuadro 4). La diversidad taxonómica fue de 10,732 OTUs con una media de 817 ± 107.74 por muestra, sin diferencia estadística significativa entre grupos ($P > 0.05$). Al igual que los OTUs, los índices de Simpson y Shannon no mostraron diferencias entre linajes ($P > 0.05$). Los índices de diversidad demuestran una alta diversidad bacteriana en el rumen del ganado Rarámuri, razas europeas y cruza entre estas, pastoreando en

temporada seca en un sitio caracterizado por sus áridas condiciones medioambientales con respecto a estudios de microbioma ruminal en ganado, con 7.48 y 0.974 para Shannon y Simpson, respectivamente (Kim *et al*., 2020). Los 10,732 OTUs encontrados en las 28 muestras son similares a los 12,361 y 14,561 OTUs reportados para ganado de carne y leche, respectivamente, en resultados de secuenciación de la región hipervariable V4 del gen 16s rRNA (Snelling *et al.,* 2019; Shaani *et al.,* 2018). Adicionalmente, el rango de 573 a 1,067 OTUs por muestra es similar al rango de 653 a 926 OTUs considerado robusto, reportado por pirosecuenciación ruminal de alto rendimiento para ganado en pastoreo (Noel *et al.,* 2017). Los índices de Shannon y Simpson fueron establecidos por Haegman *et al.* (2013) como la metodología más eficaz para comparar diversidad en comunidades microbianas. Para el presente estudio los resultados de ambos índices son similares a los reportados para comunidades bacterianas en rumen bovino, considerados buenos para los complejos ecosistemas que habitan el rumen (McCann *et al.,* 2016; Petri *et al.,* 2018). Finalmente, una cobertura Good's > 99 % es similar al 97 % y 95.7 % mostradas en otros estudios de microbioma ruminal (Huang *et al.,* 2020; Paz *et al.,* 2016). Estos resultados no significativos en los índices de diversidad alfa, que comparan la diversidad entre ecosistemas concuerdan con lo reportado por Lourenco *et al.* (2019), quienes señalaron que para animales viviendo en condiciones medioambientales y de manejo similares es poco probable encontrar diferencias en los índices de diversidad alfa, debido a que el proceso de colonización ruminal en animales jóvenes está íntimamente relacionado con el entorno en el que se desenvuelven.

Cuadro 2. Calidad promedio de las secuencias por muestra.

Muestra	Calificación Q de Phred	
	Forward	Reverse
596	35.42	34.57
625	35.27	35.22
3097	35.38	35.38
3314	35.66	35.23
4797	35.82	34.82
8009	35.63	35.05
8020	35.16	35.41
8035	35.70	35.83
8062	35.30	35.26
8074	34.87	35.00
8075	35.06	34.37
8078	35.79	35.58
8091	35.52	35.52
8105	35.12	35.04
8125	35.55	35.45
8179	35.28	35.00
8398	35.23	34.61
8546	35.43	35.31
8551	35.18	35.18
8772	35.75	35.00

Cuadro 2. Calidad promedio de las secuencias por muestra. Continuación

Muestra	Calificación Q de Phred	
	Forward	Reverse
8775	35.47	35.52
8781	35.70	35.58
8817	35.18	35.31
9375	35.33	35.00
9396	35.80	35.80
9409	35.70	35.07
9413	35.00	35.21
9417	35.11	34.66
Estándar microbiano	35.26	35.39

Cuadro 3. Composición teórica y obtenida del estándar microbiano comercial ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard.

Especie	**Composición teórica (%)**	**Composición (%)**
Pseudomonas aeruginosa	4.2	1.6
Escherichia coli	10.1	8.7
Salmonella enterica	10.4	6.8
Lactobacillus fermentum	18.4	11.2
Enterococcus faecalis	9.9	12.4
Staphylococcus aureus	15.5	11.8
Listeria monocytogenes	14.1	6.9
Bacillus subtilis	17.4	39.4
Saccharomyces cerevisiae	NA	NA
Cryptococcus neoformans	NA	NA

Cuadro 4. Resumen de estadísticas para la diversidad alfa entre linajes.

Linaje	OTUs	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Cobertura de Good's
Rarámuri	803.84 ± 91.63	8.94 ± 0.22	0.995 ± 0.00	99.99 ± 0.00
Europeas	833.66 ± 99.93	8.90 ± 0.17	0.995 ± 0.00	99.99 ± 0.00
Cruzadas	824.33 ± 159.84	8.95 ± 0.07	0.996 ± 0.00	99.99 ± 0.00
P-valor	0.816	0.902	0.347	0.822

En pre-rumiantes, el tiempo de lactación y método de destete, la fuente de agua, el tipo de vegetación y/o el microbioma de los animales adultos tienen impacto sobre las comunidades bacterianas que posteriormente colonizarán sus respectivos tractos digestivos estableciendo un núcleo microbiano común entre estos (Arshad *et al*., 2021).

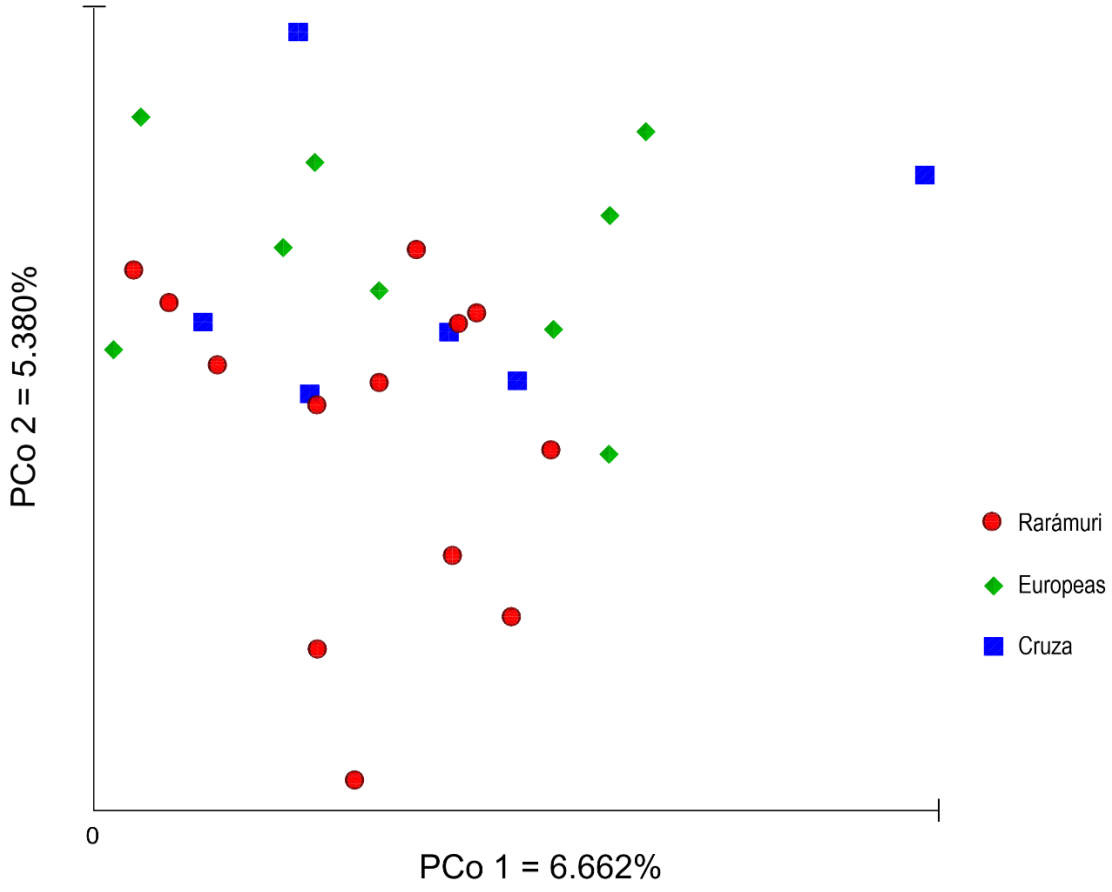
Diversidad Beta

Los resultados del presente estudio muestran diferencias en los índices de diversidad beta entre linajes (Cuadro 5). El índice UniFrac no ponderado mostró diferencia estadística al comparar las comunidades microbianas ruminales entre ganado Rarámuri y europeo ($P < 0.05$). Por su parte, la cruza no mostró diferencia con respecto a alguno de los grupos puros en ninguno de los índices ($P > 0.05$). Estas diferencias entre comunidades microbianas de diferentes linajes son observables en el análisis PCoA tanto para el índice UniFrac no ponderado (Gráfica 1) como para el Bray Curtis (Gráfica 2); donde, a pesar de mostrar porcentajes de coordenadas bajos, estos son similares a los reportados en estudios de microbioma ruminal que incluyen la raza como factor influyente en la composición del ecosistema microbiano (Mani *et al*., 2021; McGovern *et al*., 2020). Estas diferencias en los índices de diversidad que incluyen además de la cantidad de microorganismos, la proporción de estos en el ecosistema ruminal, son similares a los reportados por Li *et al.* (2019), quienes encontraron diferencias en el índice Bray Curtis para microbiomas ruminales de razas puras Angus y Charolais, pero sin diferencias entre la cruza Angus x Charolais y cualquiera de las razas puras.

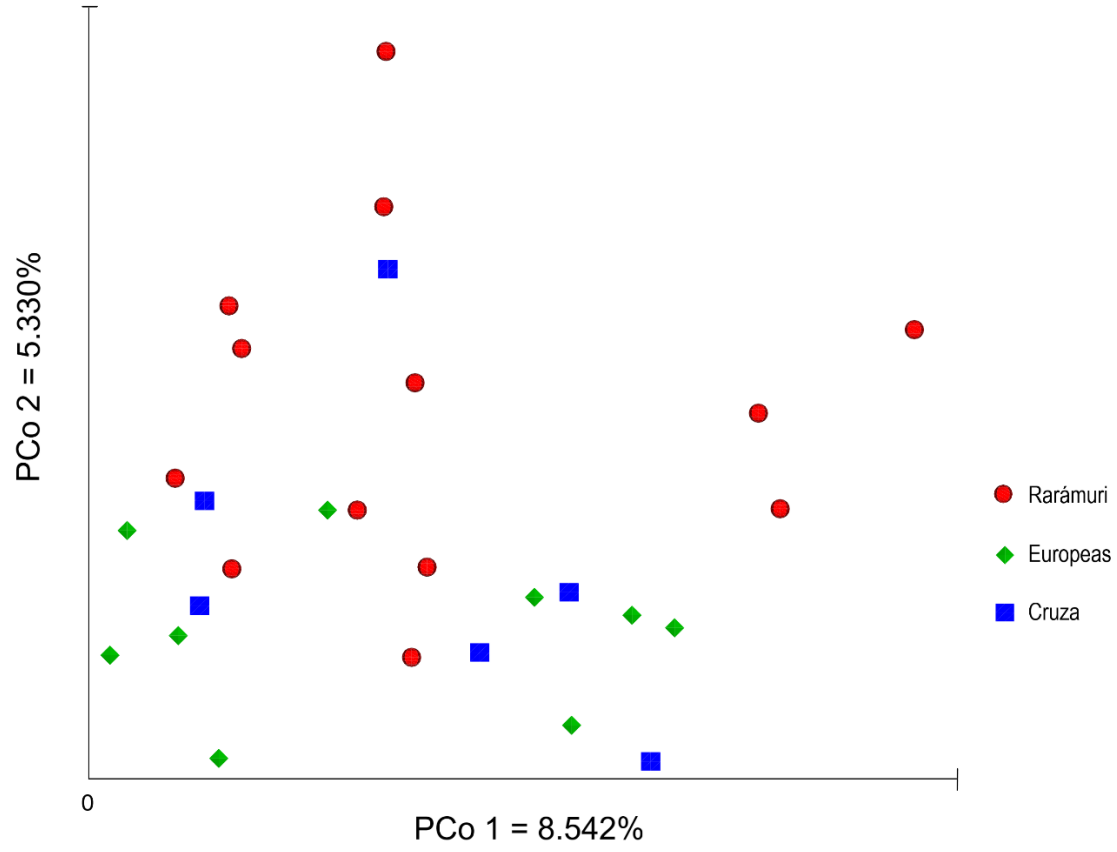
Cuadro 5. Resumen de estadísticas para la diversidad beta entre linajes.

Linaje	Comparación	n	Permutaciones	P-valor	
				Unifrac no ponderado	Bray Curtis
Rarámuri	Europeas	22	999	0.039*	0.052
	Cruza	19	999	0.105	0.887
Europeas	Cruza	15	999	0.348	0.769

* Diferencia estadística entre grupos (P < 0.05)



Gráfica 1. Análisis de coordenadas principales para el índice de diversidad beta UniFrac no ponderado.



Gráfica 2. Análisis de coordenadas principales para el índice de diversidad beta Bray Curtis.

Así mismo, el efecto de la raza ha sido asociado con diferencias en comunidades microbianas en razas de ganado lechero como Holstein y Jersey, aunque en sistemas de producción intensivos (Noel *et al.,* 2019; Paz *et al.,* 2016). En este estudio, además del efecto de raza, el hábito de pastoreo de los animales podría tener impacto sobre las comunidades microbianas presentes en el rumen de los animales.

El ganado Rarámuri tiene un comportamiento de pastoreo distinto al de razas europeas comúnmente utilizadas en la región (Nyamuryekung'e *et al.,* 2019), caracterizado por abarcar una mayor superficie en comparación con el ganado europeo (152.3 y 57.69 ha para Rarámuri y europeo, respectivamente), así como mayor tiempo pastoreando (9.37 y 7.45 h) y menor tiempo en reposo (13.07 y 15.68 h), lo que, en teoría modificaría la diversidad de especies vegetales consumidas y con ello cambiaría la composición microbiana del ecosistema ruminal (Nyamuryekung'e *et al.,* 2021b; Zeng *et al.,* 2019; Auffret *et al.,* 2018; Golder *et al.,* 2018).

Abundancia Relativa

El análisis de OTUs identificó un total de 21 filos en los ecosistemas ruminales (Cuadro 6). Los grupos más abundantes en los tres linajes ($P > 0.05$) fueron aquellos cuya representación individual fue de al menos el 1 % del total de los microorganismos identificados e incluían los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Euryarchaeota*, *Patescibacteria* y *Proteobacteria*.

Cuadro 6. Abundancia relativa de microorganismos a nivel taxonómico de filo en microbioma ruminal de diferentes linajes.

Filo	Linaje			P-valor
	Rarámuri	Europeas	Cruza	
	Abundancia superior al 1 %			
Bacteroidetes	53.991 ± 6.15	53.472 ± 8.45	53.019 ± 8.48	0.973
Firmicutes	33.083 ± 5.09	34.087 ± 7.49	33.228 ± 6.74	0.986
Euryarchaeota	3.026 ± 1.34	2.943 ± 1.53	3.041 ± 1.25	0.891
Patescibacteria	2.123 ± 0.53	2.170 ± 0.46	2.212 ± 0.77	0.986
Proteobacteria	1.195 ± 0.40	1.047 ± 0.15	1.247 ± 0.31	0.447
	Abundancia entre 0.1 y 1 %			
Kiritimatiellaeota	0.997 ± 0.39	0.866 ± 0.47	1.171 ± 0.32	0.290
Spirochaetes	0.860 ± 0.18	0.872 ± 0.52	0.774 ± 0.15	0.364
Planctomycetes	0.904 ± 0.57	0.663 ± 0.30	0.636 ± 0.38	0.661
Chloroflexi	0.776 ± 0.46	0.698 ± 0.29	0.874 ± 0.63	0.961
Tenericutes	0.636 ± 0.17	0.713 ± 0.19	0.665 ± 0.03	0.804
Actinobacteria	0.483 ± 0.27	0.506 ± 0.30	0.728 ± 0.58	0.696
Synergistetes	0.502 ± 0.17	0.472 ± 0.08	0.484 ± 0.11	0.951
Fibrobacteres	0.259 ± 0.22	0.214 ± 0.11	0.261 ± 0.19	0.809

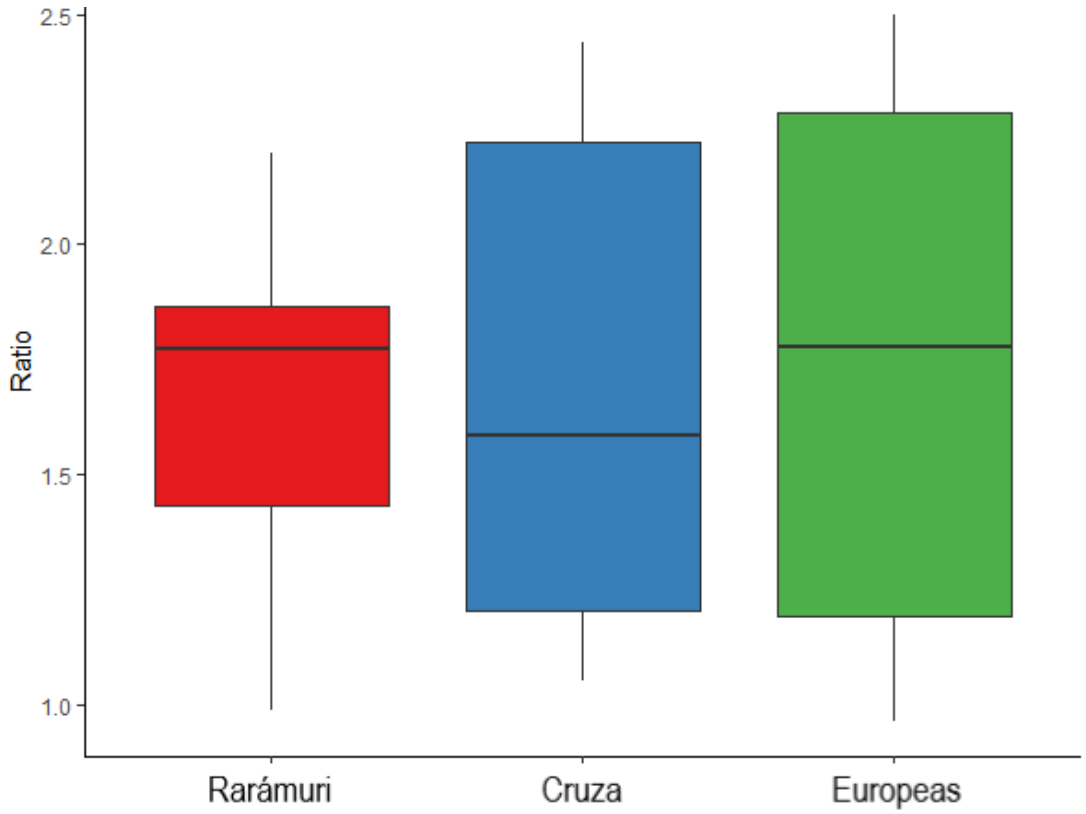
Cuadro 6. Abundancia relativa de microorganismos a nivel taxonómico de filo en microbioma ruminal de diferentes linajes. Continuación.

Filo	Linaje			P-valor
	Rarámuri	Europeas	Cruza	
	Abundancia entre 0.1 y 1 %			
Verrucomicrobia	0.158 ± 0.06	0.185 ± 0.07	0.290 ± 0.23	0.653
Lentisphaerae	0.126 ± 0.77	0.140 ± 0.06	0.133 ± 0.03	0.819
Elusimicrobia	0.167 ± 0.13	0.101 ± 0.07	0.093 ± 0.09	0.436
	Abundancia inferior al 0.1 %			
WPS-2	0.068 ± 0.05	0.067 ± 0.05	0.016 ± 0.02	0.078
Cyanobacteria	0.058 ± 0.05	0.062 ± 0.03	0.128 ± 0.14	0.309
Armatimonadetes	0.026 ± 0.02[a]	0.062 ± 0.02[b]	0.015 ± 0.01[a]	0.002*
Epsilonbacteraeota	0.011 ± 0.01	0.027 ± 0.03	0.018 ± 0.01	0.257
Fusobacteria	0.001 ± 0.00	0.002 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.706

[abc] Literales distintas denotan diferencia estadística entre linajes (P <0.05)

En aquellos grupos de abundancia media representados entre el 0.1 y 1 % se encontraron *Kiritimatiellaeota*, *Spirochaetes*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Tenericutes*, *Actinobacteria*, *Synergistetes*, *Fibrobacteres*, *Verrucomicrobia*, *Lentispharae* y *Elusimicrobia* sin diferencia estadística entre linajes ($P > 0.05$). Finalmente, *WPS-2*, *Cyanobacteria*, *Armatimonadetes*, *Epsilonbacteraeota* y *Fusobacteria* fueron los filos menos abundantes, representados por debajo del 0.1 % del total de la abundancia. En *Armatimonadetes* se identificó diferencia estadística entre el ganado europeo y los otros dos linajes estudiados ($P < 0.05$). La relación *Bacteroidetes:Firmicutes* (Gráfica 3) no mostró diferencias estadísticas entre grupos ($P > 0.05$).

En el análisis taxonómico también se identificaron 21 géneros con al menos el 1 % de la abundancia relativa del ecosistema ruminal (Cuadro 7). Los géneros representados por encima del 2 % del total fueron *Rikenellaceae RC9*, *Christensenellaceae*, *U-Bacteroidales 1*, *U-Bacteroidales 3*, *Prevotella*, *U-Bacteroidales 2* y *Ruminococcaceae NK4A214*. Por otro lado, *U-Absconditabacteriales*, *Methanobrevibacter*, *SP3 e08*, *Ruminococcaceae UCG-010*, *Eubacterium*, *U-Muribaculaceae*, *Prevotellaceae UCG 003*, *Succiniclasticum*, *U-Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae UCG-014*, *Anaerovorax*, *Papillibacter*, *Ruminococcus 1* y *Saccharofermentans* están representadas por debajo del 2 % del total de abundancia. Derivado de los análisis de la prueba Kruskal-Wallis se encontró diferencia ($P < 0.05$) entre el ganado Rarámuri y el europeo en el género *Ruminococcus 1*. No hubo diferencias entre la cruza y alguno de los grupos de ganado puro.



Gráfica 3. Relación *Bacteroidetes:Firmicutes* en comunidades microbianas ruminales de ganado de los tres linajes en el mismo sitio de pastoreo (P >0.05).

Cuadro 7. Abundancia relativa de microorganismos a nivel taxonómico de género con al menos el 1% de abundancia relativa en microbioma ruminal de ganado de diferentes linajes.

Género	Linaje			P-valor
	Rarámuri	Europeas	Cruza	
Rikenellaceae RC9	27.39 ± 4.58	28.47 ± 4.20	27.49 ± 3.80	0.843
Christensenellaceae	5.86 ± 1.42	6.10 ± 2.85	5.97 ± 2.15	0.997
U-Bacteroidales 1	4.60 ± 0.84	4.01 ± 0.60	4.74 ± 0.73	0.162
Prevotella	2.91 ± 0.79	3.18 ± 0.98	3.67 ± 1.12	0.328
U-Bacteroidales 3	2.92 ± 1.01[a]	1.87 ± 0.76[b]	2.34 ± 1.06[ab]	0.038*
U-Bacteroidales 2	2.88 ± 0.65	2.61 ± 0.64	2.75 ± 0.56	0.574
Ruminococcaceae NK4A214	2.11 ± 0.59	2.14 ± 0.80	2.08 ± 0.81	0.845
U-Absconditabacteriales	1.93 ± 0.49	2.01 ± 0.37	2.07 ± 0.70	0.997
Methanobrevibacter	1.72 ± 0.95	1.81 ± 1.09	1.78 ± 0.75	0.812
SP3 e08	1.70 ± 0.32	1.77 ± 0.35	2.06 ± 0.38	0.202
Ruminococcaceae UCG-010	1.60 ± 0.19	1.56 ± 0.17	1.50 ± 0.45	0.500
Eubacterium	1.55 ± 0.37	1.70 ± 0.56	1.57 ± 0.59	0.748

Cuadro 7. Abundancia relativa de microorganismos a nivel taxonómico de género con al menos el 1% de abundancia relativa en microbioma ruminal de ganado de diferentes linajes. Continuación.

Género	Linaje			P-valor
	Rarámuri	Europeas	Cruza	
U-Muribaculaceae	1.28 ± 0.38	1.52 ± 0.38	1.25 ± 0.27	0.274
Prevotellaceae UCG 003	1.25 ± 0.40	1.24 ± 0.32	1.18 ± 0.60	0.894
Succiniclasticum	1.18 ± 0.29	1.39 ± 0.23	1.34 ± 0.40	0.156
U-Lachnospiraceae	1.16 ± 0.33	1.16 ± 0.52	1.10 ± 0.44	0.955
Ruminococcaceae UCG-014	1.09 ± 0.34	0.95 ± 0.25	0.95 ± 0.32	0.416
Anaerovorax	1.04 ± 0.26	1.05 ± 0.23	1.08 ± 0.28	0.851
Papillibacter	1.03 ± 0.20	0.98 ± 0.23	1.05 ± 0.25	0.900
Ruminococcus 1	0.92 ± 0.28[a]	1.31 ± 0.29[b]	0.98 ± 0.38[ab]	0.041*
Saccharofermentans	1.01 ± 0.18	1.21 ± 0.37	1.11 ± 0.29	0.433

[abc] Literales distintas denotan diferencia estadística entre linajes (P <0.05).

A nivel de filo, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Eryarchaeota*, *Patesibacteria* y *Proteobacteria* fueron los grupos de microorganismos dominantes en los tres linajes analizados, y son también los descritos en la caracterización del microbioma ruminal de ganado de carne de las razas Nellore, Luing y Limousin en sistemas de producción tanto en pastoreo como estabulado (Granja-Salcedo *et al*., 2019; Snelling *et al*., 2019), así como en ganado de leche en pastoreo (Bowen *et al*., 2018). Las relaciones *Bacteroidetes*:*Firmicutes* de 2:1 y 1.4:1 reportadas en otros estudios para la cruza Hereford x Angus y Jersey respectivamente (Pitta *et al*., 2014; Henderson *et al*., 2013) son similares a los 1.6:1 reportados en este estudio. Esto sugiere que las diferencias en la dieta del ganado Rarámuri no cambia los grupos de microorganismos ruminales mayores a nivel de filo comparado con razas de origen europeo y cruzas. Sin embargo, se encontró diferencia estadística entre linajes de ganado para el filo menor *Armatimonadetes*, siendo mayor en el ganado europeo (0.062 ± 0.02) sobre el ganado Rarámuri (0.026 ± 0.02) y la cruza (0.015 ± 0.01), lo cual concuerda con el reporte de que las diferencias ruminales entre razas se encuentran en grupos de microorganismos de menor representación De Mulder *et al*. (2018). La función del filo *Armatimonadetes* dentro del ecosistema ruminal sigue siendo desconocida, pues este grupo procariota fue clasificado recientemente y sus especies comenzaron a ser identificadas la década pasada (Lee *et al*., 2014; Vyssotski *et al*., 2011).

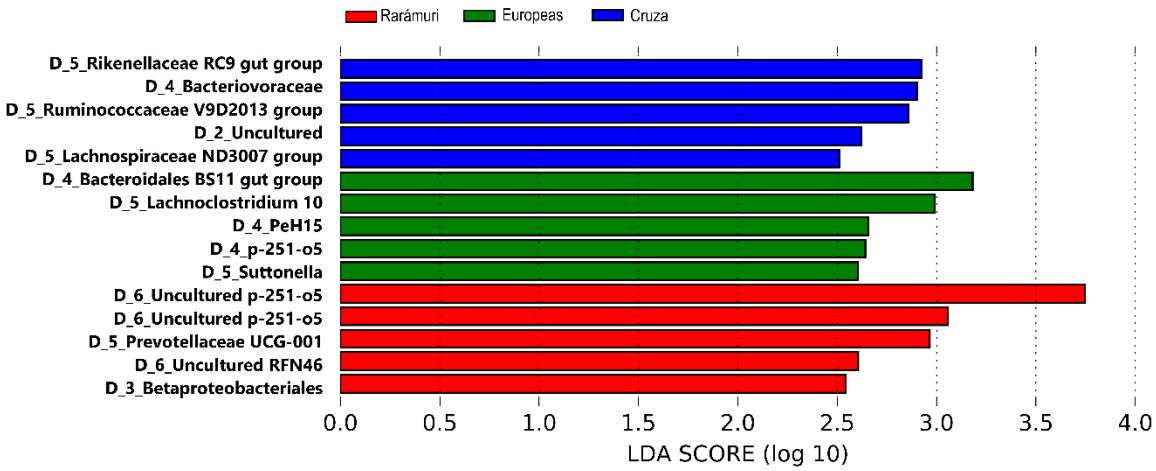
A nivel de género, los grupos de microorganismos dominantes que están representados por encima del 1 % del total de grupos identificados, refleja la

presencia de un núcleo microbiano común en el rumen de los tres linajes de animales analizados, como se ha reportado en estudios anteriores (Hartinger *et al*., 2019; Derakhshani *et al*., 2017; Henderson *et al*., 2015). Algunos microorganismos dentro de este núcleo microbiano tienen funciones similares; esta redundancia funcional demuestra la importancia de mantener las condiciones esenciales en el ecosistema ruminal, a pesar de las variaciones filogenéticas encontradas en grupos menores (Shade y Handelsman, 2012). Miembros del núcleo microbiano tales como *Rikenellaceae RC9*, *Ruminococcaceae NK4A214*, *SP3 e08*, *Ruminococcaceae UCG-010*, *Eubacterium*, *U-Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae UCG-014* y *Ruminococcus 1* tienen funciones fibrolíticas involucradas en la degradación de celulosa, hemicelulosa y xilanos (Hartinger *et al*., 2019; Chaucheyras-Durand y Fonty, 2001; Kim *et al*., 2018; Ozbayram *et al*., 2017; Boonsaen *et al*., 2018). Por otro lado, *Prevotellaceae UCG 003* participa en la degradación de proteína y algunos como *Bacteroidales* (1, 2 y 3) y *Prevotella* se involucran tanto en el catabolismo de polisacáridos como en el de proteínas (Clemmons *et al*., 2019). Además, el género *Bacteroidales 3* que se encontró en mayor proporción en el ganado Rarámuri ($P < 0.10$) ha sido reportado como especie clave en el microbioma ruminal del yak en pastoreo, mismo que se enfrenta a condiciones medioambientales hostiles y que presenta características de adaptación similares al ganado Rarámuri, tales como, la capacidad de incluir especies arbóreas en su dieta (Guo *et al*., 2020). Así mismo, algunos géneros como *Christensenellaceae*, *U-Muribaculaceae*, *Succiniclasticum*, *Papillibacter* y *Saccharofermentans* producen ácidos grasos volátiles como acético, propiónico y butírico (Lima *et al*.,

2015; Sun *et al*., 2019; Liu *et al*., 2017; Qian *et al*., 2019; Yang *et al*., 2016), en tanto que *Methanobrevibacter* se asocia con la producción de metano (Leahy *et al*., 2010). Finalmente, *Anaerovorax* está relacionado con la biohidrogenación ruminal y *U-Absconditabacteriales* tiene una función desconocida dentro del ecosistema ruminal debido a su reciente identificación (Carreño *et al*., 2019; Coil *et al*., 2019).

Comunidades Diferenciadas

Para identificar a las comunidades exclusivas entre linajes se llevó a cabo un análisis LEfSe en su versión no estricta con un valor LDA mínimo de 2, en el que se identificaron 15 grupos de microorganismos diferenciados en los diferentes linajes (Gráfica 4). En el ecosistema ruminal del ganado Rarámuri se identificaron cinco grupos diferenciados que incluyen a la familia *Prevotellaceae UCG 001*, la clase *Betaproteobacteriales* y tres géneros no clasificados *Uncultured p-251-o5*, *Uncultured p-251-o5* (2) y *Uncultured RFN46*, dos del orden *Bacteroidales* y uno de la familia *Bacteroidales RF16 group* respectivamente. Dentro del linaje europeo, los grupos de microorganismos diferenciados están conformados por los órdenes *Bacteroidales BS11 gut group*, *PeH15* y *p-251-o5*, así como las familias *Lachnoclostridium 10* y *Suttonella*. Finalmente, se detectaron cinco grupos de microorganismos ruminales identificados como particulares para la cruza entre ganado Rarámuri y europeo, e incluyen al orden *Bacteriovoraceae*, las familias *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Ruminococcaceae V92013 group* y *Lachnospiraceae ND3007 group*, así como un grupo no identificado.



Gráfica 4. Análisis discriminante lineal no estricto (LDA) por efecto de tamaño (LEfSe) con los grupos de microorganismos diferenciados por grupos de linaje. La letra y número previo al nombre del grupo microbiano se refiere al nivel taxonómico del mismo (D2: Filo; D3: Clase, D4: Orden; D5: Familia; D6: Género; D7: Especie).

El hallazgo de grupos de microorganismos diferenciados tales como *Uncultured p-251-o5* y *Uncultured RFN46* demuestra la singularidad del ecosistema ruminal del ganado Rarámuri, pues a pesar de no conocerse su función, su presencia podría asociarse a características de rusticidad, dado que se los ha encontrado también en especies animales escasamente seleccionadas pero adaptadas a condiciones medioambientales hostiles. Estas especies incluyen a rumiantes como el yak, el búfalo y razas de ganado locales como Maremmana y Aubrac (Liu *et al*., 2019; Chiariotti *et al*., 2020; Daghio *et al*., 2021). Aunado a esto, el grupo *Uncultured p-251-o5* fue reportado como especie clave en el ecosistema ruminal del yak en pastoreo, debido a su constante interacción con otras especies microbianas dentro del ecosistema ruminal de dicho animal (Guo *et al*., 2020). Así mismo, la identificación de *Prevotellaceae UCG-001* como grupo bacteriano diferenciado en el ganado Rarámuri y cuya participación ruminal incluye la actividad fibrolítica sinérgica a través de la producción de enzimas celulolíticas como CMCasa y xilanasa en conjunto con otros grupos microbianos (Ozbayram *et al*., 2018; Sbardellati *et al*., 2020) apoya los resultados reportados por Spiegal *et al*. (2019) quienes señalan que estos animales tienen la capacidad de diversificar su dieta incluyendo especies arbóreas con un mayor contenido de fibra. Aunado a esto, se ha reportado que la presencia de *Prevotellaceae UCG-001* en el microbioma intestinal tiene una correlación positiva con rutas metabólicas como la vía de señalización de proteína quinasa activada por 5’ AMP (AMPK), la vía de señalización de esfingolípidos y la ruta de sinapsis dopaminérgica; así como una correlación negativa con la síntesis de hormona tiroidea y el metabolismo del ácido araquidónico (Song *et al*., 2019). La ruta de

señalización AMPK forma parte de los mecanismos que contribuyen a proteger el rumen de lesiones e inflamación como consecuencia del estrés calórico (Eslamizad *et al*., 2020), esto estaría relacionado con los resultados reportados por Nyamuryekung'e *et al*. (2021a) quienes mencionan que el ganado Rarámuri presenta una mayor termotolerancia en ambientes con condiciones climáticas extremas. Por otra parte, la vía de señalización de esfingolípidos está involucrada en los procesos de apoptosis, supervivencia y proliferación de células eucariotas y ha sido reportada en células del epitelio ruminal de cabras (Shen *et al*., 2017). El impacto de estas vías en la proliferación celular del epitelio ruminal y por ende el crecimiento en la superficie de absorción le provee a los animales una barrera preventiva ante organismos patógenos, así como una absorción más eficiente de los nutrientes producidos por el microbioma ruminal (Ma *et al*., 2021), esto representaría una característica ventajosa para el ganado Rarámuri en un entorno adverso como el que presenta el desierto Chihuahuense, donde el alimento es escaso. Por otra parte, la vía de sinapsis dopaminérgica está relacionada con la actividad locomotora, memoria, aprendizaje y regulación endocrina en mamíferos (Fomenky *et al*., 2018). Además, estas vías de sinapsis tienen efecto sobre el hábito de pastoreo en rumiantes y estimulan el comportamiento del animal que promueve la búsqueda y consumo de alimento constante (Ginane *et al*., 2015). Estos resultados explicarían la tendencia del ganado Rarámuri reportada por Nyamuryekung'e *et al*. (2021b), de pasar una mayor cantidad de tiempo pastoreando con respecto a razas europeas utilizadas en la región. Finalmente, las hormonas tiroideas están relacionadas con diversos factores como crecimiento, reproducción y/o gestación (Polat *et al*., 2014),

mientras que el ácido araquidónico se asocia a animales con una baja ganancia diaria de peso (Artegoitia *et al*., 2017) y su presencia en sangre es indicativa de acidosis ruminal (Andersen *et al*., 1994). Por otra parte, los *Betaproteobacteriales* fueron también identificados en el microbioma ruminal del ganado Rarámuri. Este grupo de microorganismos juegan un papel fundamental en el ciclo del N ruminal al oxidar junto a *Gammaproteobacteria* el NH_3 (Gala y Boyazoglu, 2001; Xue *et al*., 2019).

Para el ecosistema ruminal del ganado europeo los microorganismos diferenciados sugieren una baja adaptación a las condiciones medioambientales presentes en el desierto Chihuahuense. Tanto el orden *Bacteroidales BS11 gut group* como la familia *Lachnoclostridium 10* son grupos microbianos caracterizados por la degradación no especializada de carbohidratos particulares, pues tienen la capacidad de metabolizar tanto carbohidratos estructurales como azúcares altamente fermentables, así como la fermentación de AGVs como acético y butírico (Solden *et al*., 2017; Liu *et al*., 2019; Hu *et al*., 2020). De la misma manera, *Sutonella* es un cocobacilo gram negativo involucrado en la degradación de fibra, sacarosa y glucosa que además produce indol, metabolito involucrado en la señalización celular de microorganismos entéricos patógenos como *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda* y *Vibrio cholera* (Zhan *et al*., 2017; Chen *et al*., 2021). Por último, *PeH15* es un orden de cuya función en el rumen no existe información, debido a su reciente identificación dentro de este ecosistema (Palma-Hidalgo *et al*., 2021).

Finalmente, el microbioma ruminal de la cruza (Rarámuri x Europeas) muestra cierta similitud con los ecosistemas ruminales de ambas razas puras en sus microorganismos diferenciados según el análisis de LEfSe. La familia del grupo intestinal *Rikenellaceae RC9 gut group* está involucrada a nivel ruminal con la degradación de fibra y almidón, la producción de propionato y la expulsión de H_2, con lo cual, la producción de metano se disminuye (Tong *et al*., 2020; Daghio *et al*., 2021; Ren *et al*., 2020). De la misma manera, *Ruminococcaceae V9D2013* es una familia relacionada con el metabolismo de carbohidratos estructurales y azúcares fermentables, así como con la biohidrogenación ruminal por lo que el ganado cruza entre Rarámuri y europeo tiene un ecosistema ruminal con la capacidad de adaptarse a diferentes fuentes de carbohidratos (McLoughlin *et al*., 2020; Huws *et al*., 2011; Liu *et al*., 2019). Por su parte, el grupo *Lachnospiraceae ND3007* tiene características celulolíticas y ha sido ampliamente reportado en el ecosistema ruminal (Yang *et al*., 2018; Stewart *et al*., 2019). Del orden *Bacteriovoraceae* se conoce poco en el contexto ruminal; sin embargo, pertenece a la clase *Deltaproteobacteria*, que se caracteriza a nivel ruminal por su capacidad para reducir el sulfato a súlfidos, que posteriormente pueden ser utilizados por los microorganismos ruminales para la síntesis de algunos aminoácidos (Gagen *et al*., 2010). No obstante, el exceso de estos súlfidos a nivel ruminal puede ocasionar poliencefalomalacia que se caracteriza por presencia de necrosis en algunas regiones del cerebro (Kung *et al*., 1998).

CONCLUSIONES

El microbioma ruminal del ganado Rarámuri posee un núcleo microbiano compartido con los otros linajes evaluados durante el estudio, así como con lo reportado en la literatura. La presencia de este núcleo microbiano es evidenciado por el análisis de la diversidad alfa, así como en los filos y principales géneros encontrados en los animales, pues a pesar de su linaje no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos. No obstante, mediante el análisis de la diversidad beta -que evalúa, además de la diversidad del ecosistema la composición del mismo-, se identificaron diferencias estadísticas entre el ecosistema ruminal del ganado Rarámuri y el ganado europeo, sin diferencias significativas entre la cruza y alguno de los dos linajes puros.

Las diferencias específicas entre linajes son observadas en los resultados del análisis LEfSe, donde los grupos microbianos identificados como diferenciales en el ganado Rarámuri parecen contribuir con la adaptación a las condiciones medioambientales hostiles presentes en el desierto Chihuahuense. Estos grupos se caracterizan por la capacidad de degradar específicamente compuestos fibrosos presentes en arbustos y cactáceas que en condiciones de sequía abundan en comparación con las gramíneas. En comparación, en el microbioma ruminal del ganado europeo se identificaron algunos grupos microbianos capaces de degradar carbohidratos altamente fermentables y solo algunos estructurales. Particularmente, la presencia diferenciada de grupos clave en el ecosistema ruminal del ganado Rarámuri que a su vez han sido identificados en otras razas de ganado y especies de rumiantes adaptadas, sugiere que estos

grupos (Bacteroidales 3, *Uncultured p-251-o5* y *Prevotellaceae UCG-001*) llevan a cabo funciones relacionadas con el aprovechamiento de los recursos y la adaptación a condiciones medioambientales específicas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permitirían darle continuidad a la identificación de características ventajosas del ganado Rarámuri a nivel ruminal sobre razas europeas usadas en la región como un proceso evolutivo de adaptación al ambiente hostil que incluyan la caracterización del microbioma ruminal y comparación con el linaje europeo y cruza en temporada de lluvias, la caracterización de microorganismos eucariotas que permita conocer el ecosistema microbiano completo, la expresión de genes microbianos orientados a rutas metabólicas de degradación de nutrientes específicos, así como la expresión de genes en células del epitelio ruminal que permita diferenciar la absorción de nutrientes entre razas. Así mismo, se podrían identificar metabolitos clave producidos por el microbioma con impacto fisiológico sobre el animal que permita conocer el funcionamiento del ecosistema ruminal como órgano microbiano y abra la posibilidad de desarrollar un inóculo de probióticos que incluyan grupos clave identificados en el microbioma ruminal del ganado Rarámuri con impacto positivo sobre la fermentación ruminal.

LITERATURA CITADA

Andersen, P. H., M. Hesselholt y N. Jarløv. 1994. Endotoxin and arachidonic acid metabolites in portal, hepatic and arterial blood of cattle with acute ruminal acidosis. Acta Veterinaria Scandina. 35: 223-234.

Anderson, D. M., R. E. Estell, A. L. González, A. F. Cibilis y L. A. Torell. 2015. Criollo cattle: heritage genetics for arid landscapes. Rangelands. 37: 62-67.

Arshad, M. A., F. U. Hassan, M. S. Rehman, S. A. Huws, Y. Cheng y A. U. Din. 2021. Gut microbiome colonization and development in neonatal ruminants: Strategies, prospects, and opportunities. Anim. Nutri. 7: 883-895.

Artegoitia, V. M., A. P. Foote, R. M. Lewis y H. C. Freetly. 2017. Rumen fluid metabolomics analysis associated with feed efficiency on crossbred steers. Sci. Reports. 7: 1-14.

Auffret, M. D., R. Stewart, R. J. Dewhurst, C. A. Duthie, J. A. Rooke y R. J. Wallace. 2018. Identification, comparison, and validation of robust rumen microbial biomarkers for methane emissions using diverse bos taurus breeds and basal diets. Front. Microbiol. 8, 2642.

Baca-González, V., P. Asensio-Calavia, S. González-Acosta, J. M. Pérez de la Lastra y A. Morales de la Nuez. 2020. Are vaccines the solution for methane emissions from ruminants? A systematic review. Vaccines. 8:460.

Bach, A., S. Calsamiglia y M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 88: 9-21.

Bannink, A., J. France, S. Lopez, W. J. J. Gerrits, E. Kebreab, S. Tamminga y J. Dijkstra. 2008. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. Anim. Feed Sci. Tech. 143: 3-26.

Belanche, A., A. H. Kingston-Smith, G. W. Griffith y C. J. Newbold. 2019. Amulti-kingdom study reveals the plasticity of the rumen microbiota in response to a shift from non-grazing to grazing diets in sheep. Front. Microbiol. 10: 122.

Belanche, A., M. Doreau, J. E. Edwards, J. M. Moorby, E. Pinloche and C. J. Newbold. 2012. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. J. Nutri. 142: 1684-1692.

Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.

Boettcher, P. J., M. Tixier-Boichard, M. A. Toro, H. Simianer, H. Eding y G. Gandini. 2010. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic

data in priority setting for conservation of animal genetic resources. Anim. Genet. 41.

Bolyen, E., J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith y J. G. Caporaso. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2. Nature Biotech. 37: 852-857.

Boonsaen, P., M. Kinjo, S. Sawanon, Y. Suzuki, S. Koike y. Kobayashi. 2018. Partial characterization of phylogeny, ecology and function of the fibrolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* OS 14, newly isolated from the rumen of swamp buffalo. Animal Science Journal. 89, 377-385.

Bowen, J. M., M. S. McCabe, S. J. Lister, P. Cormican y R. J. Dewhurst. 2018. Evaluation of microbial communities associated with the liquid and solid phases of the rumen of cattle offered a diet of perennial ryegrass or White clover. Front. Microbiol. 9:2389.

Bowles, D. y C. Flury. 2015. Recent advances in understanding the genetic resources of sheep breeds locally-adapted to the UK uplands: opportunities they offer for sustainable productivity. Frot. Genet. 6: 24.

Bowles, D., A. Carson y P. Isaac. 2014. Genetic distinctiveness of the Herdwick sheep breed and two other locally adapted hill breeds of the UK. PLoS One. 9.

Bratanis, E., T. Andersson, R. Lood y E. Bukowska-Faniband. 2020. Biotechnological potential of *Bdellovibrio* and like organisms and their secreted enzymes. Front. Microbiol. 11, 662.

Bray, J. R. y J. T Curtis. 1957. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. Ecol. Monogr. 27: 325-349.

Broueck, J. 2014. Production of methane emissions from ruminant husbandry: a review. J. Environ. Prot. 5: 1482-1493.

Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson y S. P. Holmes. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. Nature methods. 13: 581-583.

Carreño, D., P. G. Toral, E. Pinloche, A. Belenguer, D. R. Yáñez-Ruiz, G. Hervás. 2019. Rumen bacterial community responses to DPA, EPA and DHA in cattle and sheep: A comparative in vitro study. Scientific reports. 9, 1-9.

CEPAL. 2016. Agenda 2030 y los objetivos del desarrollo sostenible una oportunidad para América Latina y el Caribe. En: http://www.sela.org/media/2262361/agenda-2030-y-los-objetivos-de-desarrollo-sostenible.pdf Consultado 25 Agosto 2019.

Chaucheyras-Durand, F. y F. Ossa. 2014. Review: the rumen microbiome: composition, abundance, diversity and new investigative tools. The professional animal scientist. 30: 1-12.

Chaucheyras-Durand, F. y G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive Saccharomyces cerevisiae CNCM I-1077. Rep. Nut. Develop. 41, 57-68.

Chen, D., G. Zhong, H. Su, M. A. ur Rahman, K. Chen, J. Tang y F. Li. 2021. Physiological Variation in Ruminal Microbiota under Altered Energy Levels in Starter Ration of Suckling Angus Calves. Pak. Vet. J. 10.

Chiariotti, A., J. E. Edwards, G. D. A. Hermes, G. Catillo, D. Meo, S. Di Giovanni, H. Smidt y L. Buttazzoni. 2020. Increasing the sustainability of maize grain production by using arbuscular mycorrhizal fungi does not affect the rumen of dairy cattle (Bos taurus) and buffalo (Bubalus bubalis). Front. Vet. Sci. 7.

Church, D. C., W. G. Pond y K. R. Pond. 2002. Nutrición y alimentación de animales. 1a ed. Editorial Limusa. México.

Church, D. C., W. G. Pond y K. R. Pond. 2010. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. 2a ed. Limusa.

Clark, W. C., L. van Kerkhoff, L. Lebel y G. C. Gallopin. 2016. Crafting usable knowledge for sustainable development. PNAS. 113: 4570-4578.

Clarke, G., R. M. Stilling, P. J. Kennedy, C. Stanton, J. F. Cryan y T. G. Dinan. 2014. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. Mol. Endocrinol. 28: 1221-1238.

Clauss M. y R. R. Hofmann. 2014. The digestive system of ruminants and peculiarities of (wild) cattle. En Ecology, evolution and behavior of wild cattle: implications for conservation. M. Melletti y J. Burton, eds. Cambridge University Press.

Clemmons, B. A., C. Martino, L. G. Schneider, J. Lefler, M. M. Embree y P. R. Myer. 2019. Temporal stability of the ruminal bacterial communities in beef steers. Scientific reports. 9, 1-8.

Coil, D. A., R. Y. Neches, J. M. Lang, G. Jospin, W. E. Brown y D. Cavalier. 2019. Bacterial communities associated with cell phones and shoes. PeerJ Preprints.

Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). 2016. Estudio Económico de América Latina y el Caribe. Santiago.

Creevey, J. C., J. W. Kelly, G. Henderson y C. S. Leahy. 2014. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. Microb. Biotech. 7: 467-479.

Crist, T. O., J. A. Veech, J. C. Gering y K. S. Summerville. 2003. Partitioning species diversity across landscapes and regions: a hierarchical analysis of α, β, and γ diversity. The American Nat. 162: 734-743.

Cui, Z., S. Wu, S. Liu, L. Sun, Y. Feng, Y. Cao y J. Yao. 2020. From maternal grazing to barn feeding during preweaning period: altered gastrointestinal microbiota contributes to change the development and function of the rumen and intestine of yak calves. Front. Microbiol. 11: 485.

Cunningham, H. C., K. J. Austin, S. R. Powell, K. T. Carpenter y K. M. Cammack. 2018. Potential response of the rumen microbiome to mode of delivery from birth through weaning. Translat. Anim. Sci. 2: 35-38.

Daghio, M., F. Cuicci, A. Buccioni, A. Cappucci, L. Casarosa, A. Serra, G. Conte, C. Viti, B. M. McAmmond, J. D. Van Hamme y M. Mele. 2021. Correlation of breed, growth performance and rumen microbiota in two rustic cattle breeds reared under different conditions. Front. Microbiol. 12.

Daha, S., R. N. Roy, S. K. Ken y K. A. Ray. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, Oreochromis mossambica (Peters) and grass carp, Ctenopharyngodon idella (Valenciennes). Aquacul. Resea. 37: 380-388.

Dahl, S. A., M. Hudler, W. Windsch, C. Bolduan, D. Brugger y A. Konig. 2020. High fiber selection by roe deer (Capreolus): evidence of ruminal microbiome adaption to seasonal and geographical differences in nutrient composition. Anim. Prod. Sci. 60:1303.

Das, P. y R. Ranjan. 2020. Role of gut microbiome in improving animal health and productivity. Indian J. Anim. Hlth. 59:146-155.

De Alba Martínez, J. 2011. El libro de los bovinos criollos en América. Colegio de postgraduados. México.

De Mulder, T., N. Peiren, L. Vandaele, T. Ruttink, S. De Campeneere, T. Van de Wiele y K. Goossens. 2018. Impacto f bree don the rumen microbial community composition and methane emission of Holstein Friesian and Belgian Blue heifers. Livestock Sci. 207:38-44.

Denman, S. E., D. P. Morgavi y C. S. McSweeney. 2018. Review: The application of omics to rumen microbiota function. Animal. 12: 233-245.

Derakhshani, H., H. M. Tun, F. C. Cardoso, J. C. Plaizier, E. Khafipour y J. J. Loor. 2017. Linking peripartal dynamics of ruminal microbiota to dietary changes and production parameters. Front. Microbiol. 7, 2143.

Diaz, T. 2014. Contribution of livestock production to food and nutritional security and to the reduction of poverty in Latin America and Caribbean. Cuban Journal of Agricultural Science. 48: 3-4.

Direkvandi, E., T. Mohammadabadi y A. Z. Salem. 2021. Influence of three microbial feed additives of Megasphaera elsdenii, Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus sp. on ruminal methane and carbon dioxide production, and biofermentation kinetics. J. Appl. Microbiol.

Edwards, J. E., N. R. Mcewan, A. J. Travis y R. J. Wallace. 2004. 6s rDNA library based analysis of ruminal bacterial diversity. 86: 263-281.

Elliott, C. L., J. E. Edwards, T. J. Wilkinson, G. G. Allison, K. McCaffrey, M. B. Scott, P. Rees-Stevens, A. H. Kingston-Smith y S. A. Huws. 2018. Using omic approaches to compare temporal bacterial colonization of Lolium perenne, Lotus corniculatus and Trifolium pratense in the rumen. Front. Microbiol. 9. 2184.

Eslamizad, M., D. Albrecht y B. Kuhla. 2020. The effect of chronic, mild heat stress on metabolic changes of nutrition and adaptations in rumen papillae of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 103: 8601-8614.

Evans, J. M., L. S. Morris y J. R. Marchesi. 2013. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. J Endocrinol. 218: 37-47.

FAO. 1996. World food summit. Declaration on world food security. En: http://www.fao.org/3/w3613e/w3613e00.htm Consultado 27 Agosto 2019.

FAO. 2018. Livestock and agroecology: How they can support the transition towards sustainable food and agriculture. FAO.

Felius, M. 1995. Cattle breeds, An Encyclopedia. Doetinchem: Misset Uitgeverij.

Félix-Portillo, M., J. G. Ríos-Ramírez, G. E. Erosa-de la Vega y F. Rodríguez-Almeida. 2006. Sequencing of new BoLA-DRB3.2 allels detected in Mexican Creole cattle. Tec. Pecu. Mex. 44:15-25.

Fisher, C. K. y P. Mehta. 2014. Identifying keystone species in the human gut microbiome from metagenomic timeseries using sparse linear regression. PloS one. 9: e102451.

Fletcher, S. E. M. y H. Schaefer. 2019. Rising methane: A new climate challenge. Science. 364:932-933.

Flores, E. L. A. 2019. Búsqueda de polimorfismos en la región flanqueante 5’ del gen IGF-1 y su asociación con los niveles de ARNm, proteína y ganancia de peso en corderos. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Fomenky, B. E., D. N. Do, G. Talbot, J. Chiquette, N. Bissonnette, Y. P. Chouinard, M. Lessard y E. M. Ibeagha-Awemu. 2018. Direct-fed microbial supplementation influences the bacteria community composition of the gastrointestinal tract of pre-and post-weaned calves. Sci. Reports. 8: 1-21.

Freetly, H. C., A. Dickey, A. K. Lindholm-Perry, R. M. Thallman, J. W. Keele, A. P. Foote y J. E. Wells. 2020. Digestive tract microbiota of beef cattle that differed in feed efficiency. J. Anim. Sci. 98.

Gagen, E. J., S. E. Denman, J. Padmanabha, S. Zadbuke, R. Al Jassim, M. Morrison y C. S. McSweeney. 2010. Functional gene analysis suggests

different acetogen populations in the bovine rumen and tammar wallaby forestomach. App. Environ. Microbiol. 76: 7785-7795.

Gajdusek, D. C. 1953. The sierra tarahumara. Geographical Review. 43:15-38.

Gala, S. y J. Boyazoglu. 2001. El boletín de información sobre recursos genéticos animales. *FAO. Roma, Italia*.

Gandini, G. C., y E. Villa. 2003. Analysis of the cultural value of local livestock breeds: a methodology. J. Anim. Bred. Gen. 120.

Geishauser, T. y A. Gitzel. 1996. A comparison of rumen fluid sampled by ororuminal probe versus rumen fistula. Small Rumin. Resea. 21: 63-69.

Gibbons, S. M. 2020. Keystone taxa indispensable for microbiome recovery. Nature Microbiol. 5: 1067-1068.

Gijzen, H. J., K. B. Zwart, P. T. van Gelder y G. D. Vogels. 1986. Continuous cultivation of rumen microorganisms, a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste materials. App. Microbiol. Biotechnol. 25: 155-162.

Ginane, C., M. Bonnet, R. Baumont y D. K. Revell. 2015. Feeding behaviour in ruminants: a consequence of interactions between a reward system and the regulation of metabolic homeostasis. Anim. Produc. Sci. 55: 247-260.

Golder, H. M., J. M. Thomson, S. E. Denman, C. S. McSweeney e I. J. Lean. 2018. Genetic markers are associated with the ruminal microbiome and metabolome in grain and sugar challenged dairy heifers. Front. Genet. 9: 62.

Gorelick, R. 2006. Combining richness and abundance into a single diversity index using matrix analogues of Shannon's and Simpson's indices. Ecography. 29: 525-530.

Gotoh, A., M. N. Ojima y T. Katayama. 2019. Minority species influences microbiota formation: the role of Bifidobacterium with extracellular glycosidases in bifidus flora formation in breastfed infant guts. Microb. Biotechnol. 12: 259-264.

Granja-Salcedo, Y. T., R. M. Fernandes, R. C. Araujo, L. T. Kishi, T. T. Berchielli y F. D. D. Resende. 2019. Long term encapsulated nitrate supplementation modulates rumen microbial diversity and rumen fermentation to reduce methane emission in grazing steers. Front. Microbiol. 10: 614.

Gressley, T. F., M. B. Hall y L. E. Armentano. 2011. Ruminant nutrition symposium: productivity digestion and health responses to hindgut acidosis in ruminants. J. Anim. Sci. 89: 1120-1130.

Guan, L., F. Li, A. Bulumulla y M. Zhou. 2017. The role of rumen microbiome on feed efficiency of grazing cattle. En 28th anual Florida ruminant nutrition symposium. 770: 137.

Guo, W., M. Zhou, T. Ma, S. Bi, W. Wang, Y. Zhang, X. Huang, L. L. Guan y Long. 2020. Survey of rumen microbiota of domestic grazing yak during different growth stages revealed novel maturation patterns of four key microbial groups and their dynamic interactions. Anim. Microbiome. 2: 1-20.

Haegeman, B., J. Hamelin, J. Moriarty, P. Neal, J. Dushoff y J. S. Weitz. 2013. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. ISME J. 7, 1092–1101.

Han, X., Y. Yang, H. Yan, X. Wang, L. Qu y. Chen. 2015. Rumen bacterial diversity of 80 to 110-day-old goats using 16S rRNA sequencing. PloS one. 10: e0117811.

Harmon, D. L., R. M. Yamka y N. A. Elam. 2014. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: a review. Can. J. Anim. Sci. 84: 309-318.

Hartinger, T., J. E. Edwards, R. Gómez-Expósito, H. Smidt, C. J. ter Braak, N. Gresner y K. H. Südekum. 2019. Differently pre-treated alfalfa silages affect the in vitro ruminal microbiota composition. Front. Microbiol. 10, 2761.

Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young y P. Janssen. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. Scientific reports. 5: 14567-14581.

Henderson, G., F. Cox, S. Kittelmann, V. H. Miri, M. Zethof y S. J. Noel. 2013. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. PloS one. 8.

Hoffmann, I. 2011. Livestock biodiversity and sustainability. Livest. Sci. 139.

Hoffmann, I. 2013. Adaptation to climate change – exploring the potential of locally adapted breeds. Animal. 7.

Hoffmann, I., T. From y D. Boerma. 2014. Ecosystem services provided by livestock species and breeds, with special consideration to the contributions of small-scale livestock keepers and pastoralists. Back. Study Paper. 66.

Hohler-Rollefson, I., H. S. Rathore y E. Mathias. 2008. Local breeds, livelihoods and livestock keepers' rights in South Asia. Trop. Anim. Healt Prod. 41.

Holmes, E., J. Kinross, G. R. Gibson, R. Burcelin, W. Jia, S. Pettersson y J. K. Nicholson. 2012. Therapeutic modulation of microbiota-host metabolic interactions. 4:137.

Hu, Y., Y. He, S. Gao, Z. Liao, T. Lai, H. Zhou y W. Lu. 2020. The effect of a diet based on rice straw co-fermented with probiotics and enzymes versus a fresh corn Stover-based diet on the rumen bacterial community and metabolites of beef cattle. Scientific Reports, 10:1, 1-16.

Huang, S., S. Ji, H. Yan, Y. Hao, J. Zhang y. Wang. 2020. The day-to-day stability of the ruminal and fecal microbiota in lacting dairy cows. Microbiol. Open.

Huws, S. A., C. J. Creevey, L. B. Oyama, I. Mizrahi, S. E. Denman, M. Popova y D. P. Morgavi. 2018. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. Front. Microbiol. 9: 2161.

Huws, S. A., E. J. Kim, M. R. Lee, M. B. Scott, J. K. Tweed, E. Pinloche y N. D. Scollan. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. Environ. microbiol. 13:6, 1500-1512.

INEGI. 2017. Anuario estadístico y geográfico del estado de Chihuahua.

Jami, E., B. A. White y I. Mizrahi. 2014. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. PloS one. *9*: e85423.

Janda, J. M. y S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. J. clin. microbiol. 45: 2761-2764.

Jenkins, T. C. 1992. Lipid metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 76: 3851-3863.

Johnke, J., S. Fraune, T. C. Bosch, U. Hentschel y H. Schulenburg. 2020. Bdellovibrio and like organisms are predictors of microbiome diversity in distinct host groups. Microbial ecology. 79:1, 252-257.

Johnson, J. R., G. E. Carstens, W. K. Krueger, P. A. Lancaster, E. G. Brown, L. O. Tedeschi y A. Brosh. 2019. Associations between residual feed intake and apparent nutrient digestibility, in vitro methane producing activity and volatile fatty acid concentrations in growing beef cattle. J. Anim. Sci. 97: 3550-3561.

Kantanen, J., P. Lovendhal, E. Strandberg, E. Eythorsdottir, M. Li y A. Kettunen-Praebel. 2015. Utilization of farm animal genetic resources in a changing agro-ecological environment in the Nordic countries. Front. Genet. 6.

Kim, D. H., K. H. Kim, S. B. Kim, J. K. Son, J. H. Lee, S. S. Joo, B. H. Wu, T. Park, B. Y. Park y E. T. Kim. 2020. Differential dynamics of the ruminal microbiome of Jersey Cows in a heat stress environment. Animals. 10: 1127.

Kim, M., M. Morrison y Z. Yu. 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. J. Microbiol. Meth. 84: 81-87.

Kim, W., S. Hwang, N. Lee, Y. Lee, S. Cho, B. Palsson y B. K. Cho. 2020. Transcriptome and translatome profiles of Streptomyces species in different growth phases. Scientific data. 7: 1-12.

Kim, Y. H., R. Nagata, A. Ohkubo, N. Ohtani, S. Kushibiki, T. Ichijo y S. Sato. 2018. Changes in ruminal and reticular pH and bacterial communities in Holstein cattle fed a high-grain diet. BMC veterinary research. 14, 310.

Köhler-Rollefson, I. 2008. Endogenous versus globalized. An alternative vision of livestock development for the poor, League for Pastoral Peoples and Endogenous Livestock Development. FAO.

Koringa, P. G., J. R. Thakkar, R. J. Pandit, A. T. Hinsu, M. J. Parekh, R. K. Shah, S. J. Jakhesara y C. G. Joshi. 2019. Metagenomic characterisation of ruminal bacterial diversity in buffaloes from birth to adulthood using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Funct. Integ. Genom. 19: 237-247.

Krause, D. O., T. G. Nagaraja, A. D. G. Wright y T. R. Callaway. 2013. Board invented review: rumen microbiology leading the way in microbial ecology. J. Anim. Sci. 91: 331-341.

Kung Jr, L., A. O. Hession y J. P. Bracht. 1998. Inhibition of sulfate reduction to sulfide by 9, 10-anthraquinone in in vitro ruminal fermentations. J. dairy sci. 81: 2251-2256.

Latham, E. A., K. K. Weldon, T. A. Wickersham, J. A. Coverdale y W. E. Pinchak. 2018. Responses in the rumen microbiome of Bos taurus and indicus steers fed a low-quality rice straw diet and supplemented protein. J. anim. Sci. 96: 1032-1044.

Leahy, S. C., W. J. Kelly, E. Altermann, R. S. Ronimus, C. J. Yeoman, D. M. Pacheco. 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. PloS one. 5.

Lee, K. C., X. C. Morgan, P. F. Dunfield, I. Tamas, I. R. McDonald y M. B. Stott. 2014. Genomic analysis of *Chthonomonas calidirosea*, the first sequenced isolate of the phylum *Armatimonadetes*. The ISME journal. 8, 1522-1533.

Leek, F. B. 2004. Digestión en el estómago de rumiantes. En Dukes Fisiología de los animales domésticos. O. W. Reece, ed. Acribia, España.

Li, F., C. Li y Chen. 2019. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. Microbiome. 7, 92.

Li, F., T. C. Hitch, Y. Chen y C. J. Creevey. 2019. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. Microbiome. 7: 1-21.

Li, M., M. Zhou, E. Adamowicz y J. A. Basarab. 2012. Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis. Vet. Microbiol. 155: 72-80.

Liao, P., G. A. Satten y. J. Hu. 2017. PhredEM: a phred-score-informed genotype-calling approach for next-generation sequencing studies. Gen. Epidemiol. 41: 375-387.

Lima, F. S., G. Oikonomou, S. F. Lima, M. L. Bicalho, E. K. Ganda y J. C. de Oliveira Filho. 2015. Prepartum and postpartum rumen fluid microbiomes: characterization and correlation with production traits in dairy cows. Appl. Environ. Microbiol. 81, 1327-1337.

Liu, C., H. Wu, S. Liu, S. Chai, Q. Meng y Z. Zhou. 2019. Dynamic alterations in yak rumen bacteria community and metabolome characteristics in response to feed type. Front. Microbiol. 10, 1116.

Liu, C., X. H. Li, Y. X. Chen, Z. H. Cheng, Q. H. Duan, Q. H. Meng. 2017. Age-related response of rumen microbiota to mineral salt and effects of their interactions on enteric methane emissions in cattle. Microb. Ecol. 73, 590-601.

López-García, A., C. Pineda-Quiroga, R. Atxaerandio, A. Pérez, I. Hernández, A. García-Rodríguez y O. González-Recio. 2018. Comparison of Mothur and QIIME for the analysis of rumen microbiota composition based on 16S rRNA amplicon sequences. Fron. Microbiol. 9: 3010.

Lourenco, J. M., T. R. Callaway, T. Kieran, T. C. Glenn, J. C McCann y R. L. Stewart Jr. 2019. Analysis of the Rumen Microbiota of Beef Calves Supplemented During the Suckling Phase. Front. Microbiol. 10, 1131.

Lozupone, C. y R. Knight. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 71: 8228-8235.

Lu, Z., Z. Xu, Z. Shen, Y. Tian y H. Shen. 2019. Dietary energy level promotes rumen microbial protein synthesis by improving the energy productivity of the ruminal microbiome. Front. Microbiol. 10.

Lyte, M. 2010. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. Medical hypotheses. 74: 634-638.

Ma, J., A. M. Shah, Z. S. Wang, R. Hu, H. W. Zou, X. Y. Wang, S. N. Shao y X. Y. Kong. 2021. Dietary supplementation with glutamine improves gastrointestinal barrier function and promotes compensatory growth of growth-retarded yaks. Animal. 15: 100108.

Malmuthuge, N. 2017. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. J. Anim. Sci. Biotech. 8: 1-7.

Mani, S., O. A, Aiyegoro y M. A. Adeleke. 2021. Characterization of Rumen Microbiota of Two Sheep Breeds Supplemented With Direct-Fed Lactic Acid Bacteria. Fron. Vet. Sci. 7: 1199.

Marchesi, J. R. y J. Ravel. 2015. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome. 3.

Marizzoni, M., T. Gurry, S. Provasi, G. Greub, N. Lopizzo, F. Ribaldi, C. Festari, M. Mazzelli, E. Mombelli, M. Salvatore, P. Mirabelli, M. Franzese, A. Soricelli, G. B. Frisoni y A. Cattaneo. 2020. Comparison of bioinformatics pipelines and operating systems for the analyses of 16S rRNA gene amplicon sequences in human fecal samples. Fron. Microbiol. 11: 1262.

Marsoner, T., L. E. Vigl, F. Manck, G. Jaritz, U. Tappeiner y E. Tasser. 2018. Indigenous livestock breeds as indicators for cultural ecosystem services: a spatial análisis within the Alpine Space. Ecol. Indic. 94.

Matthews, C., F. Crispie, E. Lewis, M. Reid, P. W. O'Toole y P. D. Cotter. 2019. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. Gut microbes. 10: 115-132.

McCann, C. J., S. Luan, C. F. Cardoso, H. Derakhshani, E. Khafipour y J. J. Loor. 2016. Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. Front. Microbiol. 7: 701-719.

McCann, J. C., A. T. Wickersham y J. J. Loor. 2014. High throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. Bioinf. Biol. Ins. 8: 109-125.

McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh y C. A. Morgan. 2002. Animal nutrition. 6a ed. Pearson.

McGovern, E., M. McGee, C. J. Byrne, D. A. Kenny, A. K. Kelly y S. M. Waters. 2020. Investigation into the effect of divergent feed efficiency phenotype on the bovine rumen microbiota across diet and breed. Sci. Rep. 10: 1-11.

McLoughlin, S., C. Spillane, N. Claffey, P. E. Smith, T. O'Rourke, M. G. Diskin, y S. M. Waters. 2020. Rumen microbiome composition is altered in sheep divergent in feed efficiency. Front. Microbiol. 11, 1981.

McSweeney, C. y R. Mackie. 2012. Microorganism and ruminant digestion: state of knowledge trends and future prospects. Background study papers. 61: 1-62.

McTavish, E. J., J. E. Decker, R. D. Schnabel, J. F. Taylor y D. M. Hillis. 2013. New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. PNAS. 110:1398-1406.

Meale, S. J., S. Li, P. Azevedo, H. Derakhshani, J. C. Plaizier y E. Khafipour. 2016. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. Front. Microbiol. 7: 582.

Morgavi, D. P., W. J. Kelly, p. H. Janssen y G. T. Attwood. 2012. Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. Animal. 7: 184-201.

Myer, P. R., T. P. Smith, J. E. Wells, L. A. Kuehn y H. C. Freetly. 2015. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. PloS one. 10: e0129174.

Nagendra, H. 2002. Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. Appl. Geo. 22: 175-186.

Newbold, C. J. y E. Ramos-Morales. 2020. Ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. Animal. 14: 78-86.

Nicholson, J. K., E. Holmes y I. D. Wilson. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nature Reviews Microbiol. 3:431-438.

Nikkhah, A. 2011. Bioscience of ruminant intake evolution: feeding time models. Adv Biosci Biotech. 2: 271-274.

Noel, S. J., D. W. Olijhoek, F. Mclean, P. Løvendahl, P. Lund y O. Højberg. 2019. Rumen and Fecal Microbial Community Structure of Holstein and Jersey Dairy Cows as Affected by Breed, Diet, and Residual Feed Intake. Animals, 9, 498.

Noel, S. J., G. T. Attwood, J. Rakonjac, C. D. Moon, G. C. Waghorn y P. H. Janssen. 2017. Seasonal changes in the digesta-adherent rumen bacterial communities of dairy cattle grazing pasture. PLoS One. 12.

Núñez-Domínguez, R., R. Ramírez-Valverde, L. A. Saavedra-Jiménez y J. G. García-Muñiz. 2016. La adaptabilidad de los recursos zoogenéticos Criollos, base para enfrentar los desafíos de la producción animal. Archivos de zootecnia. 65:461-468.

Nyamuryekung'e, S., A. F. Cibilis, R. E. Estell, A. L. González, D. E. Cano y S. Spiegal. 2017. Behavior of Raramuri Criollo vs Angus crossbred cows in relation to desert summer ambient head conditions. En 70th Annual meeting of the society for range managment. St. George, UT, USA.

Nyamuryekung'e, S., A. F. Cibilis, R. E. Estell, D. Van Leeuwen, C. Steele y R. O. Estrada. 2020. Do Young calves influence movement patterns of nursing raramuri criollo cows on rangeland? Rangel. Ecol. Manag. 73: 84-91.

Nyamuryekung'e, S., A. F. Cibilis, R. E. Estell, M. McIntosh, D. VanLeeuwen, C. Steele, A. L. González, S. Spiegal, L. Avendaño-Reyes, F. Rodríguez-Almeida y M. Anderson. 2021a. Foraging behavior and body temeprature of heritage vs. commercial beef cows in relation to desert ambient heat. J. Arid Environ. 193.

Nyamuryekung'e, S., A. F. Cibils, R. E. Estell, M. McIntosh, D. VanLeeuwen, C. Steele, A. L. González, S. Spiegal y F. G. Continanza. 2021b. Foraging behavior of heritage versus desert-adapted commercial rangeland beef cows in relation to dam-offspring contact patterns. Range. Ecol. Manag. 74: 43-49.

O'Callaghan, T. F., R. P. Ross, C. Stanton y G. Clarke. 2016. The gut microbiome as a virtual endocrine organ with implications for farm and domestic animal endocrinology. Dom. Anim. Endocrinol. 56: 44-55.

ONU. 2015. La asamblea general adopta la agenda 2030 para el desarrollo sostenible. En: https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/ Consultado 25 Agosto 2019.

Ortega-Ochoa, C., C. Villalobos, J. Martínez-Nevárez, C. M. Britton y R. E. Sosebee. 2008. Chihuahua's cattle industry and a decade of drought: economical and ecological implications. Rangelands. 30: 2-7.

Ozbayram, E. G., O. Ince, B. Ince, H. Harms y S. Kleinsteuber. 2018. Comparison of rumen and manure microbiomes and implications for the inoculation of anaerobic digesters. Microorganisms. *6*:1. 15.

Ozbayram, E. G., S. Kleinsteuber, M. Nikolausz, B. Ince, and O. Ince. 2017. Effect of bioaugmentation by cellulolytic bacteria enriched from sheep rumen on methane production from wheat straw. Anaerobe. 46, 122-130.

Palma-Hidalgo, J. M., E. Jiménez, M. Popova, D. P. Morgavi, A. I. Martín-García, D. R. Yáñez-Ruiz y A. Belanche. 2021. Inoculation with rumen fluid in early life accelerates the rumen microbial development and favours the weaning process in goats. Animal microbiome. 3:1, 1-21.

Pauler, C. M., J. Isselstein, M. Suter, J. Berard, T. Braunbeck y M. K. Schneider. 2020. Choosy grazers: influence of plant traits on forage selection by three cattle breeds. Funct. Ecol. 34.

Pauler, C. M., J. Isselstein, T. Braunbeck y M. K. Schneider. 2019. Influence of Highland and production-oriented cattle breeds on pasture vegetation: A pairwise assessment across broad environmental gradients. Agric. Ecosyst. Environ. 284.

Paz, A. H., L. C. Anderson, J. M. Muller, J. P. Kononoff y C. S. Fernando. 2016. Rumen bacterial community composition in Holstein and Jersey cows is different under same dietary condition and is not affected by sampling method. Fron. Microbiol. 7: 1-9.

Pereira, F. C. y D. Berry. 2017. Microbial nutrient niches in the gut. Environ. Microbiol. 19: 1366-1378.

Petri, R. M., M. T. Kleefisch, B. U. Metzler-Zebeli, Q. Zebeli y F. Klevenhusen. 2018. Changes in the ruminal epithelial microbiota of cattle and host gene expression in response to alterations in dietary carbohydrate composition. Appl, Environ, Microbiol. 84.

Pitta, D. W., W. E. Pinchak, S. Dowd, K. Dorton, I. Yoon, B. R. Min, J. D. Fulford, T. A. Wickersham y D. P. Malinowski. 2014. Longitudinal shifts in bacterial diversity and fermentation pattern in the rumen of steers grazing wheat pasture. Anaerobe. 30: 11-17.

Polat, H., G. Dellal, I. Baritci y E. Pehlivan. 2014. Changes of thyroid hormones in different physiological periods in white goats. J. Anim and Plant Sci. 24: 445-449.

Powley, T. L., X. Y. Wang, E. A. Fox, R, J. Phillips, L. W. C. Liu y J. D. Huizinga. 2008. Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus. Neurogastroenterol. Moti. 20: 69-79.

Qian, W., W. Ao, C. Jia y Z. Li. 2019. Bacterial colonisation of reeds and cottonseed hulls in the rumen of Tarim red deer (Cervus elaphus yarkandensis). Antonie van Leeuwenhoek. 112. 1283-1296.

Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza y F. O. Glockner. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database Project improved data processing and web-based tolos. Nucleic acids research. 41: 590-596.

Quezada-Casasola, A., L. Avendaño-Reyes, J. A. Ramírez-Godínez, U. Macías-Cruz y A. Correa-Calderón. 2013. Behavioural, follicular and hormonal characteristics of the oestrous cycle of Mexican Criollo cattle. Anim. Prod. Sci. 54:277-284.

Ren, Q., H. Si, X. Yan, C. Liu, L. Ding, R. Long y Q. Qiu. 2020. Bacterial communities in the solid, liquid, dorsal, and ventral epithelium fractions of yak (Bos grunniens) rumen. Microbiologyopen, 9:2, 963.

Ríos, R. J. G. 1997. El ganado Criollo, un autentico producto chihuahuense de exportación. Síntesis agropecuaria. 3-5.

Russell, N. D., J. Rios, G. Erosa, M. D. Remmenga y D. E. Hawkins. 2000. Genetic differentiation among geographically isolated populations of Criollo cattle and their divergence from other Bos taurus breeds. J. Anim. Sci. 78:2314-2322.

Rysiak, A., W. Chabuz, W. Sawicka-Zugaj, J. Zdulski, G. Grzywaczewski y M. Kulik. 2021. Comparative impacts of grazing and mowing on the floristics of grasslands in the buffer zone of Polesie National Park, eastern Poland. Glob. Ecol. Conserv. 27.

Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta e Y. V. Wu. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process biochem. 40:3693-3700.

Sasson, G., S. K. Ben-Shabat, E. Seroussi, A. Doron-Faigenboim, N. Shterzer, S. Yaacoby, M. E. Miller, B. A. White, E. Halperin y I. Mizrahi. 2017. Heritable bovine rumen bacteria are phylogenetically related and correlated with the cow's capacity to harvest energy from its feed. MBio, 8.

Sbardellati, D. L., A. Fischer, M. S. Cox, W. Li, K. F. Kalscheur y G. Suen. 2020. The bovine epimural microbiota displays compositional and structural heterogeneity across different ruminal locations. J. Dairy Sci. 103:4, 3636-3647.

Schwarze, K., J. Buchanan, J. C. Taylor y S. Wordsworth. 2018. Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. Genet. Med. 20:1122-1130.

Segata, N., J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L. Miroplosky y W. S. Garret. 2011. Metagenomic biomarker Discovery and explanation. Genome biol. 12: 60.

Seshadri, R., S. C. Leahy, G. T. Attwood, K. H. Teh, S. C. Lambie, A. L. Cookson y W. J. Kelly. 2018. Cultivation and sequencing of rumen micriobome members from the Hungate1000 collection. Nature biotechnology. 36: 359-367.

Shaani, Y., T. Zehavi, S. Eyal, J. Miron e I. Mizrahi. 2018. Microbiome niche modification drives diurnal rumen community assembly, overpowering individual variability and diet effects. ISME J. 12: 2446-2457.

Shade, A. y J. Handelsman. 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. Environ. Microbiol. 14, 4–12.

Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. The Bell Sys Techn. J. 27: 379-423.

Shen, H., Z. Lu, Z. Xu, Z. Chen y Z. Shen. 2017. Associations among dietary non-fiber carbohydrate, ruminal microbiota and epithelium G-protein-coupled receptor, and histone deacetylase regulations in goats. Microbiome. 5: 1-12.

Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. Nature. 163: 688.

Snelling, T. J., M. D. Auffret y C. Duthie. 2019. Temporal stability of the rumen microbiota in beef cattle and response to diet and supplements. Anim. Microbiome. 1:16.

Solden, L. M., D. W. Hoyt, W. B. Collins, J. E. Plank, R. A. Daly, E. Hildebrand y K. C. Wrighton. 2017. New roles in hemicellulosic sugar fermentation for the uncultivated Bacteroidetes family BS11. The ISME journal. 11:3, 691-703.

Song, X., L. Zhong, N. Lyu, F. Liu, B. Li, Y. Hao, Y. Xue, J. Li, Y. Feng, Y. Ma, Y. Hu y B. Zhu. 2019. Inulin can alleviate metabolism disorders in ob/ob mice by partially restoring leptin-related pathways mediated by gut microbiota. Genom. Proteom. Bioinformat. 17: 64-75.

Spellerberg, I. F. y P. J. Fedor. 2003. A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon–Wiener'Index. Glo. Ecol. Biogeogra. 12: 177-179.

Spiegal, S., R. E. Estell, A. F. Cibilis, D. K. James, H. R. Peinetti y D. M. Browing. 2019. Seasonal divergence of landscape use by heritage and conventional cattle on desert rangeland. Rangel. Ecol. Mang. 72: 590-601.

Stergiadis, S., I. Cabeza-Luna, M. Mora-Ortiz, R. D. Stewart, R. J. Dewhurst, D. J. Humphries, M. Watson, R. Roehe y M. D. Auffret. 2021. Unravelling the Role of Rumen Microbial Communities, Genes, and Activities on Milk Fatty Acid Profile Using a Combination of Omics Approaches. Front. in microbiol. 11: 3540.

Stewart, R. D., M. D. Auffret, A. Warr, A. W. Walker, R. Roehe y M. Watson. 2019. Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. Nature biotechnology, 37:8, 953-961.

Sun, Z., Z. Yu y B. Wang. 2019. Perilla frutescens Leaf Alters the Rumen Microbial Community of Lactating Dairy Cows. Microorganisms. 7, 562.

Swaminathan, M. S. 2014. Zero hunger. Science. 345: 491.

Tapio, I., T. J. Snelling, F. Strozzi y R. J. Wallace. 2017. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. J. Anim. Sci. Biotech. 8: 1-11.

Tasser, E., J. Walde, U. Tappeiner, A. Teutsch y W. Noggler. 2007. Land-use changes and natural reforestation in the eastern central Alps. Ecosyst. Environ. 118.

Thoetkiattikul, H., W. Mhuantong, T. Laothanachareon, S. Tangphatsornruang, V. Pattarajinda, L. Eurwilaichitr y V. Champreda. 2013. Comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. Current microbiol. 67: 130-137.

Thomas, M., M. Webb, S. Ghimire, A. Blair, K. Olson, G. J. Fenske, A. Thmas, J. Christopher-Hennings, D. Brake y J. Scaria. 2017. Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. Sci reports. 7: 1-13.

Tong, J. J., H. Zhang, W. Jia, L. Yun, S. Mao, B. Xiong y L. Jiang. 2020. Effects of different molecular weights of chitosan on methane production and bacterial community structure in vitro. J. Integ. Agri. 19:6, 1644-1655.

UACH. 2015. Código de bioética y bienestar animal. En: http://fz.uach.mx/investigacion/2015/02/25/COMITE%20DE%20BIO%C3%89TICA%20Y%20BIENESTAR%20ANIMAL%202015_b.pdf Consultado 18 Mayo 2021.

van der Ark, K. C. H., R. G. A. van Heck, V. A. P. Martins, C. Belzer y W. M. de Vos. 2017. More than just a gut feeling: constraint-based genome-scale metabolic models for predicting functions of human intestinal microbes. Microbiome. 5: 78-91.

Van Dijk, E. L., H. Auger, Y. Jaszczyszyn y C. Thermes. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet. 30:418-426.

Vyssotski, M., K. Y. Lee, K. Lagutin, J. Ryan, X. C. Morgan y M. B. Stott. 2011. Fatty acids of Chthonomonas calidirosea, of a novel class Chthonomonadetes from a recently described phylum Armatimonadetes. Lipids. 46, 1155-1161.

Wallace, R. J., G. Sasson, P. C. Garnsworthy, I. Tapio, E. Gregson, P. Bani y I. Mizrahi. 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. Sci. Adv. 5.

Wang, K., X. Peng, F. Lv, M. Zheng, D. Long, H. Mao, H. Si y P. Zhang. 2021. Microbiome-Metabolites Analysis Reveals Unhealthy Alterations in the Gut Microbiota but Improved Meat Quality with a High-Rice Diet Challenge in a Small Ruminant Model. Animals. 11: 2306.

Wang, S., K. Giller, M. Kreuzer, S. E. Ulbrich, U. Braun y A. Schwarm. 2017. Contribution of ruminal fungi, archaea, protozoa and bacteria to the methane suppression caused by oilseed supplemented diets. Frot. Microbiol. 8:1864.

Weldenegodduad, M., R. Popov, K. Pokharel, I. Ammosov, Y. Ming, Z. Ivanova y J. Kantanen. 2019. Whole-genome sequencing of three native cattle breeds originating from the northernmost cattle farming regions. Front. Genet. 9:728.

Westcott, S. L. y P. D. Schloss. 2015. De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. PeerJ. 3: 1487.

Williams, A. G. y G. S. Coleman. 1992. The rumen protozoa. 1a ed. Springer science and media.

Wright, E. S., L. S. Yilmaz y D. R. Noguera. 2012. DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. App. Environ. Microbiol. *78*: 717-725.

Xue, F., X. Nan, Y. Li, X. Pan, Y. Guo, L. Jiang y B. Xiong. 2019. Metagenomic insights into effects of thiamine supplementation on ruminal non-

methanogen archaea in high-concentrate diets feeding dairy cows. BMC veterinary research. 15:1, 1-11.

Yang, B., J. Le, P. Wu, J. Liu, L. L. Guan y J. Wang. 2018. Alfalfa intervention alters rumen microbial community development in Hu lambs during early life. Front. Microbiol. 9, 574.

Yang, C. T., B. W. Si, Q. Y. Diao, H. Jin, S. Q. Zeng y. Tu. 2016. Rumen fermentation and bacterial communities in weaned Chahaer lambs on diets with different protein levels. J. Integr. Agric. 15, 1564-1574.

Ze, X., F. Le Mougen, S. H. Duncan, P. Louis y H. J. Flint. 2013. Some are more equal than others: the role of “keystone” species in the degradation of recalcitrant substrates. Gut microb. 4: 236-240.

Zeng, H., C. Guo, D. Sun, H. E. Seddik y S. Mao. 2019. The Ruminal Microbiome and Metabolome Alterations Associated with Diet-Induced Milk Fat Depression in Dairy Cows. Metabolites, 9, 154.

Zeng, Y., D. Zeng, Y. Zhang, X. Ni, Y. Tang, H. Zhu, H. Wang, Z. Yin, K. Pan y B. Jing. 2015. Characterization of the cellulolytic bacteria communities along the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep by using PCR-DGGE and real-time PCR analysis. W. J. Microbiol. Biotechnol. 31: 1103-1113.

Zhan, J., M. Liu, C. Wu, X. Su, K. Zhan y G. qi Zhao. 2017. Effects of alfalfa flavonoids extract on the microbial flora of dairy cow rumen. Asian-Australasian journal of animal sciences. 30:9, 1261.

Zhang, Z., D. Xu, L. Wang, J. Hao, J. Wang y X. Zhou. 2016. Convergent evolution of rumen microbiomes in high altitude mammals. Curr. Biol. 26:1873-1879.