

Recursos zoogenéticos. Banco de razas domésticas autóctonas en peligro de desaparición

CARLOS O. HIDALGO ORDÓÑEZ. Área de Selección y Reproducción Animal. cohidalgo@serida.org

CAROLINA TAMARGO MIGUEL. Área de Selección y Reproducción Animal. ctamargo@serida.org

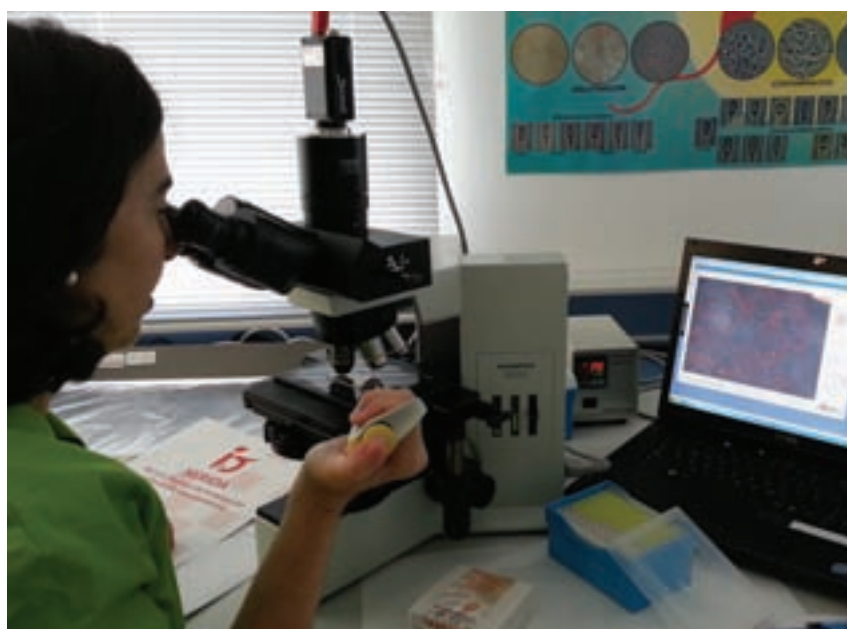
ÁNGEL FERNÁNDEZ GARCÍA. Área de Selección y Reproducción Animal. angelfg@serida.org

MARÍA JOSÉ MERINO HERNANTES. Área de Selección y Reproducción Animal

Precedentes y situación actual

En los últimos años se asiste en España a una rápida pérdida y desaparición de razas de ganado de menor especialización productiva, que se explotaban con buenos rendimientos hasta hace pocos años, y que están siendo desplazadas por razas más productivas. Estas razas, aunque poco competitivas en el plano productivo, constituyen una importante reserva de variabilidad genética, que sería totalmente irrecuperable en caso de desaparición. Además, las razas locales presentan con frecuencia un mayor grado de adaptación a condiciones desfavorables o extremas, por lo que son más indicadas para el aprovechamiento de los recursos naturales de esas zonas, siendo además capaces de proporcionar productos alimentarios diferenciables de alta calidad y por tanto susceptibles de lograr un valor añadido.

Por todo ello, existe la obligación de conservar el patrimonio genético con todas las herramientas disponibles, lo que ha venido constituyendo una preocupación constante de la FAO. Una vez identificados y caracterizados los recursos genéticos de un país, se pueden conservar *in situ* o *ex situ*. Los métodos *in situ* mantienen a los animales en el hábitat donde están adaptados, mientras que los métodos *ex situ* obtienen los recursos genéticos animales de su medio ambiente tradicional para conservarlos fuera del



mismo. La conservación *ex situ* incluye, por un lado, el mantenimiento de poblaciones de animales cerradas fuera del ambiente en que se han desarrollado y por otro lado, la recogida y congelación de semen, óvulos y/o embriones, con la intención de utilizarlos en programas de cruzamiento en el futuro (Holt y col., 1996), mediante la instauración de Bancos de Recursos Zoogenéticos (BRZ). La criopreservación de gametos y embriones tiene por finalidad mantener la viabilidad durante un ciclo de congelación, descongelación y almacenamiento en ni-

↑
Veterinaria del Área de
Selección y Reproducción
Animal.



trógeno líquido (Curry, 2000), siendo el método más económico de conservación, (Wildt y col., 1997), pero debe ser utilizado como complemento y seguro de la conservación *in situ*, parte asumida por los criadores (ERPF, 2003).

Los BRZ tienen gran importancia en la recuperación de las razas y líneas abandonadas y garantiza su permanencia en caso de una epidemia, por el riesgo creciente de epizootias o enfermedades emergentes que obliguen a su sacrificio (FAO, 1998). Existen razones diversas (económicas, sociales, políticas, religiosas, etc...) por las que determinadas especies han de estar incluidas en un BRZ y estos motivos para su inclusión son, a menudo, interdependientes. Pero independientemente de las razones que llevan a la instauración de un banco de estas características, hay que tener claro que, mientras los motivos del almacenamiento pueden cambiar con el tiempo, los productos almacenados no se alteran, por lo que el BRZ tiene un enorme potencial para múltiples aplicaciones, incluso no previstas en el momento de su creación.

En la recuperación de las razas autóctonas han jugado un papel determinante diversos colectivos, como las asociaciones de criadores, que las fomentan, con el reconocimiento oficial oportuno, y gestionan los libros genealógicos, con el apoyo de distintas administraciones. Estas últi-

mas intervienen, tanto por medio de ayudas directas, como con la participación y promoción de proyectos de investigación y desarrollo y con la firma de convenios y acuerdos de colaboración. Desde el Área de Selección y Reproducción Animal del SERIDA hemos venido trabajando en las últimas décadas en la conservación de recursos genéticos de razas autóctonas; por un lado, mediante el desarrollo de programas de mejora genética y, hoy en día, con el BRZ de razas domésticas autóctonas en peligro de desaparición del Principado de Asturias. Se pretende, en definitiva, colaborar en la pervivencia de estas, así como en el desarrollo de biotecnologías reproductivas que propicien la conservación de la biodiversidad.

El origen del Banco en Asturias se inicia en el año 2004 con el desarrollo del **Proyecto INIA RZ2004-00031**, "Establecimiento de un banco de conservación de especies domésticas en peligro de extinción", que se desarrolló hasta 2007. Gracias a él se establecieron las bases del trabajo conjunto con los diferentes sectores de la región implicados: la Administración Autonómica, desde la Dirección General de Ganadería y Agroalimentación de la Consejería de Medio Rural y Pesca; las asociaciones de ganaderos (la Asociación Española de criadores de ganado vacuno selecto de la raza Asturiana de la Montaña - ASEA-MO, Asociación de criadores de ponis de raza Asturcón - ACPRA, Asociación de Criadores de Cabra Bermeya - ACRI-BER, Asociación de Criadores de Oveja Xalda de Asturias - ACOXA y, la Asociación de Criadores del Gochu Asturcelta - ACGA, tras su reconocimiento en 2007) y las Administraciones Locales. Dicho proyecto nos permitió comenzar a trabajar en los métodos de obtención de semen y en los protocolos para su congelación, tratándose, todas ellas de razas rústicas, no adiestradas al uso de vagina artificial y se determinaron, tanto las características de los eyaculados, como su capacidad de criopreservación. Hay que mencionar la ayuda facilitada en el **Proyecto INIA RZP 2009-00002-C02-01** "Mantenimiento y ampliación del banco de recursos zogenéticos de razas domésticas autóctonas en peligro de extinción en Asturias",

↓
Recogida de semen de
toro "Asturiana de la
Montaña".



que financió durante tres años los gastos generados en la conservación de las muestras ya obtenidas.

Hemos continuado con los trabajos de mantenimiento y ampliación del número de donantes y muestras que integran en la actualidad el BRZ, gracias a la concesión del **Proyecto INIA RZ2010-00010** "Conservación *ex situ* mediante la utilización de técnicas de reproducción animal asistida de las razas de ganado autóctono en peligro de desaparición del Principado de Asturias", con fin de aumentar la variabilidad genética.

En la actualidad, nos encontramos en el desarrollo del **Proyecto INIA RZP2013-0006-00-00**, que además de mantener las dosis seminales y los embriones hasta ahora conservados de las razas expuestas, pretende la realización de determinaciones de su viabilidad a lo largo del tiempo de almacenamiento, para garantizar su calidad, en caso de un eventual uso.

La Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos del Principado de Asturias, mediante Resolución de 6 de marzo de 2013, autorizó el banco de germoplasma de razas domésticas autóctonas como centro de recogida y almacenamiento de semen y embriones bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y de équidos, nombrando responsable del mismo a Carlos O. Hidalgo Ordóñez, Jefe de Área de Selección y Reproducción Animal del SERIDA, según el R.D. 841/2011, por el que se establecen las condiciones básicas de recogida, almacenamiento, distribución y comercialización de material genético de dichas especies.

Metodología de trabajo

Criopreservación de dosis seminales

La FAO en su "Segundo Documento de Líneas Directrices para elaboración de planes nacionales de gestión de los recursos genéticos de animales de granja. Gestión de pequeñas poblaciones en peligro de extinción" recomienda un número mínimo de machos (25 en todas las especies que componen el BRZ) y de dosis seminales por macho para cada una de



las especies para poder considerar que está mantenida: 538 dosis de cada toro, 14.280 dosis por caballo, 398 dosis de cada morueco, 270 dosis en el caso del macho cabrío y 1.235 dosis seminales de cada verraco. Así pues, cada año las asociaciones de ganaderos de las respectivas razas seleccionan por sus características genéticas y morfológicas los donantes que interesa que formen parte del BRZ. Tras obtener un diagnóstico negativo en las pruebas sanitarias que dicta la autoridad competente en sus explotaciones, son trasladados a las instalaciones del Centro de Biotecnología Animal (CBA) de Deva en Gijón, excepto los toros de Asturiana de Montaña que se alojan en el Centro de Recogida de Semen de Cenero (Gijón). Allí superan un período de adaptación, tras el cual comenzamos su adiestramiento para la recogida de semen (mediante vagina artificial, excepto en porcino que es con mano enguantada). Cuando esto último es posible, determinamos las características de los eyaculados en el laboratorio y, si superan los valores mínimos necesarios, los procesamos para su congelación.

De modo resumido, en el caso del semen bovino, se añade un diluyente comercial, pero en los eyaculados porcinos, equinos, ovinos y caprinos se precisa su centrifugación, para la eliminación del plasma seminal y hay que elaborar el di-

↑
Recogida de semen de Xalido.



↑
Recogida de semen de
Gochu Asturcelta.

luyente de congelación apropiado. De manera general, éste se compone de un azúcar, como fuente de energía, sales para conseguir una presión osmótica adecuada, un tampón para neutralizar los cambios de pH del catabolismo espermático, un crioprotector (glicerol), yema de huevo o leche para atenuar el choque por frío y antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano, entre otros compuestos. En todos los casos, se descien- de la temperatura hasta los 5° C y se congelan las dosis seminales según una rampa de descenso de temperatura propia para cada especie en un biocongelador programable.

Producción de embriones in vivo

El Centro de Biotecnología Animal de Deva (Gijón) dispone de instalaciones para hembras donantes de Asturiana de la Montaña y la recogida y procesado de embriones. En este caso, los objetivos recomendados por la FAO son la obtención de 206 embriones, a partir de 25 hembras donantes que serán inseminadas con el mayor número posible de padres (25).

Los embriones se obtienen por lavado uterino de las donantes, que han sido previamente superovuladas con un preparado comercial de gonadotropinas de extractos de pituitaria porcina, FSH-P. Los embriones obtenidos de cada colecta se clasifican y procesan siguiendo las nor-

mas de la International Embryo Transfer Society (IETS) y, posteriormente, se congelan para su inclusión en el banco. Al igual que en el caso de la producción seminal, las hembras que vayan a ser utilizadas como donantes son sometidas a todos los controles sanitarios exigidos por la legislación vigente. También se realizan análisis sanitarios individuales para garantizar que los animales donantes estén libres de agentes patógenos (especialmente de aquellos transmisibles por los embriones) tres meses antes de las colectas, cumpliendo las exigencias obligatorias recomendadas por la FAO (1998).

Caracterización y evaluación de los eyaculados

Como hemos dejado constancia, a cada eyaculado se le exige unos mínimos requisitos de calidad (volumen, concentración, motilidad subjetiva y objetiva, integridad del acrosoma y morfoanomalías), que varían en función de la especie de la que se trate, que establecimos con la referencia en los trabajos realizados con otras razas autóctonas de nuestro país, cuya enumeración bibliográfica sería muy extensa. Hay que destacar que tratándose de razas rústicas, el porcentaje de éxito en el procesamiento, que definimos como los eyaculados efectivamente procesados del total de eyaculados recogidos, ha sido muy alto en todas las razas asturianas.

Así mismo, antes de considerar las dosis seminales congeladas como parte real del BRZ, hemos venido realizando pruebas de calidad seminal de cada lote tras su descongelación, evaluando hasta ahora el vigor y la calidad del movimiento espermático, la integridad funcional de la membrana plasmática (mediante el test de endósmosis) y la integridad del acrosoma.

Los productos almacenados en los BRZ tienen un valor incalculable, que se incrementa con el tiempo, siendo necesario asegurar su continua viabilidad (Segura-Correa y col., 2001) y debiendo posibilitarse controles periódicos de la misma. Por ello, en la actualidad nos planteamos la realización de pruebas de calidad seminal, con el uso de nuevas tecno-



logías, para lo que es necesario la descongelación de una muestra representativa de las muestras almacenadas.

Los nuevos sistemas computerizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con la citometría de flujo, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características estructurales y funcionales de los espermatozoides. Aunque no existe ningún método que por sí mismo sea capaz predecir la capacidad fecundante del semen (Rodríguez-Martínez, 2000), las modernas técnicas automatizadas son fiables, de fácil ejecución y elevada repetibilidad, por lo que permiten estandarizar y objetivar la contrastación espermática.

Los **sistemas CASA**, del inglés Computer Assisted Sperm Analysis, tratan de eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la motilidad espermática (Verstegen y col., 2002), constando de un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor de TV. Posteriormente, la imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de 1 segundo. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo. Al final del proceso, el CASA proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual, con lo que permite obtener información precisa, objetiva y repetible, sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento (Amann, 1989; Anzar y col., 1991).

La **citometría de flujo** es una técnica que permite identificar, cuantificar y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión, en función de los distintos patrones de tinción adquiridos tras el



marcaje con diferentes colorantes fluorescentes, que se unen a estructuras celulares específicas o se acumulan selectivamente en compartimentos intracelulares (Graham, 2001; Muño, 2007; Martínez-Pastor y col., 2010). A lo largo de las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la investigación de poblaciones espermáticas.

Material conservado

Existencias

Tal como se puede ver en la tabla 1, el Banco consta, a día de hoy, de un total de un total de 17.920 dosis seminales de 10 donantes de la raza equina Asturcón, recogidas mediante vagina artificial; así mismo, contamos con 23.491 dosis seminales procedentes de 15 verracos de raza Gochu Asturcelta recogidas mediante el método de mano enguantada. Respecto a los pequeños rumiantes, en la actualidad, se almacenan 4.589 dosis seminales de 14 machos cabríos de raza Bermeya, parte recogidas mediante electroeyaculación y parte mediante vagina artificial y 4.235 dosis seminales de 6 donantes de raza ovina Xalda recogidas con vagina artificial (hay que considerar que el año 2013 fue el primero en el que trabajamos con estos últimos, por diferentes limitantes previos). En el caso de la raza bovina Asturiana de

↑
Recogida de semen de
Asturcón.



Tabla 1.-Existencias en el BRZ del CBA de Deva.

Raza	N.º de donantes	N.º dosis seminales	Método de recogida
Asturcón	10	17.920	Vagina artificial
Gochu Asturcelta	15	23.491	Mano enguantada
Bermeya	14	4.589	Electroejaculación y vagina artificial
Xalda	6	4.235	Vagina artificial
Asturiana de la Montaña *	44	151.445	Vagina artificial

* También forman parte del BRZ 314 **embriones congelados** procedentes de cruzamientos realizados entre 23 hembras donantes y 22 machos.

la Montaña, la colección actual consta de un total de 314 embriones congelados, procedentes de distintos cruzamientos realizados entre 23 hembras donantes y 22 machos de la raza; además, contamos con un total de 151.445 dosis seminales obtenidas de 44 toros.

Conservación

El BRZ actual se encuentra ubicado en una sala de uso exclusivo, en los siguientes contenedores, correctamente identificados, ubicados en el CBA de Deva:

- 2 recipientes criogénicos con capacidad de 50 l., en uno de ellos se alojan las dosis seminales de raza ovina Xalda y en el otro las dosis seminales de raza caprina Bermeya.
- 2 recipientes criogénicos de 50 l. de capacidad, donde se ubican los embriones de raza bovina Asturiana de la Montaña.
- 1 recipiente criogénico de 500 l. de capacidad, en los que ubicamos las dosis seminales de la raza porcina Gochu Asturcelta.
- 1 tanque criogénico de 500 l. de capacidad, en el que actualmente se encuentran almacenadas las dosis seminales de la raza equina Asturcón.
- 1 contenedor criogénico de 1.000 l. de capacidad en el que se ubican las dosis seminales de la raza bovina Asturiana de la Montaña.

Además, la instalación consta básicamente de un depósito criogénico o silo, que se encuentra en el exterior, y la correspondiente red de distribución del gas. En la sala donde están los contenedores se colocaron analizadores de aire am-

bientales, con sensores que hacen saltar la alarma cuando el nivel de oxígeno es inferior al 19%, momento en el que se accionaría el sistema de extracción de gases. Para garantizar la **seguridad de las muestras** que se encuentran almacenadas es fundamental el suministro regular de nitrógeno líquido, tras una inspección periódica de los mismos, **restringiendo el acceso del personal** a la sala donde se encuentra el BRZ, siendo el sistema de llenado, en la actualidad, totalmente manual. Lo ideal sería la instalación de equipos de alarma de detección del nivel de nitrógeno líquido en los contenedores de depósito, con los que actualmente no contamos.

El **personal responsable del mantenimiento de las muestras del BRZ** tiene una formación adecuada en el manejo del nitrógeno líquido, habiendo sido informado de las normas de trabajo que garantizan su seguridad y la de dichas muestras. Además, se utilizan todos los elementos de seguridad necesarios para evitar percances (gafas de protección, mandiles, guantes, pinzas, calzado de seguridad...).

Las muestras que componen el banco han sido **identificadas de modo seguro** según normativa (R.D. 841/2011, en su artículo 5, siendo un centro con restricciones al comercio, marcándose las muestras con una "N" previa).

En la actualidad, existe un **doble sistema de control de la ubicación de las muestras almacenadas**: soporte papel y soporte informático, mediante el uso del programa GERMBANK[®]. Este último es una aplicación informática patentada por el INIA para el control del germoplasma animal, que permite el control exacto de



las muestras del banco, definiendo aquellas por especie y por tipo de material biológico. Consta de diferentes niveles de accesibilidad o perfiles de trabajo. Existen unos datos comunes para todos los tipos de muestras que son: identificación de la muestra, especie, raza, identificación del donante, investigador responsable, fecha de entrada y datos de control sanitario. Además, por ejemplo, en nuestro caso hemos de completar las siguientes “pestañas”: obtención, congelación, ubicación, descongelación, control sanitario, otros datos y archivos asociados (fotos, vídeos); cada una de ellas con los datos obligatorios que incluye. De manera periódica, se realizan copias de seguridad de dichos archivos. Además, se dispone de un sistema de registro del rellenado de los tanques, que incluye contenedores rellenos, fecha y firma del responsable.

Por último, es importante destacar que, en un programa de criopreservación, es necesario reducir el riesgo de pérdida de la colección almacenada, debido a eventuales desastres, tales como incendios, terremotos, o simplemente mal manejo o funcionamiento del banco de germoplasma (Valdecillo y col., 2011). Por lo tanto, se debe disponer de duplicados en un lugar distante al menos 400 km. del banco actual, según recomienda la FAO; en este caso, en el Banco de Germoplasma Nacional, sito en Colmenar Viejo (Madrid). Este trabajo, supondría el cambio de la ubicación actual de las muestras que se consideren de cada raza, tanto físicamente, como en el GERM-BANK[®], ya que, en la actualidad, no hay duplicados de la colección.

Hay que destacar que los BRZ no son estáticos, pudiendo considerarse la salida de material almacenado, pero se ha de estudiar los motivos para la misma, dejando constancia de ella.

Cooperación con otros bancos de recursos

En nuestro país, hay numerosos estudios previos que implican la obtención, mediante el adiestramiento previo y el posterior procesamiento y congelación

de semen obtenido de diferentes razas autóctonas por diversos equipos que llevan años trabajando con ellas, en colaboración con los diversos núcleos de conservación en las comunidades autónomas. Cabe citar, sólo a modo de ejemplo, el grupo del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, el Grupo de Biología de la Reproducción de la Universidad de Castilla-La Mancha, los investigadores del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), la Unidad de Veterinaria del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, el Departamento de Reproducción Animal y Recursos Zoogenéticos de INIA, el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón, los Grupos de Reproducción Animal de las Facultades de Veterinaria de la Universidad de León y de la Universidad de Murcia, la Diputación de Huelva, el Centro de OVIGEN en Zamora, de la Escuela Superior de Ingeniería en Huelva, entre otros. También tiene gran importancia el trabajo realizado en los antiguos Centros de Selección y Reproducción Animal (CENSYRAS), que tienen experiencia desarrollada durante años en las metodologías apropiadas en la recogida y procesamiento de germoplasma.

Con muchos de ellos y algunos más, hemos contactado, tanto en nuestro período de formación, como en la actualidad para intercambiar los resultados obtenidos en nuestras investigaciones.

Previsiones de futuro

En nuestra opinión, el futuro debería encaminarse a tratar de completar las dosis seminales en las razas en las que se está trabajando actualmente, comenzar a conservar embriones de todas las que no se haya iniciado esta actividad, todo ello siguiendo las directrices de la FAO, y continuar con las pruebas que garanticen la viabilidad del material almacenado.

Cabe destacar, por último, que hay numerosos estudios en varias especies que han determinado el efecto de diversos factores, como la edad y la raza del donante, el método de recogida y el personal encargado de la misma, la estación del





año en la que fue recogido, o el intervalo entre colectas sobre las características seminales (en bovino, por ejemplo, Koivisto y col., 2009; Fiaz y col., 2010; Mandal y col., 2010, entre otros). Considerando lo anterior y dada la variabilidad de dichos factores en el trabajo que hemos venido realizando, los estudios de la calidad seminal postdecongelación propuestos, podrán determinar la posible influencia de dichas variables en la capacidad de criopreservación seminal. Con ello, en la medida de lo posible, podremos orientar para el trabajo futuro qué edades, métodos de recogida, estación del año o intervalo entre colectas son de elección prioritaria para los donantes que se propongan para ampliar la variabilidad del BRZ actual.

Referencias bibliográficas

AMANN, R. P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology* 2 (10), 89-98.

ANZAR, M.; HASSAN, M. M.; GRAHAM, E. F.; DEYO, R. C. M.; SINGH, G. 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*. 2 (36), 307-317.

CURRY, M. R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reproduction* 5: 46-52.

ERPF. 2003. Guidelines for the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals, Hiemstra S.J. (Ed.), Publication n.º 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources.

FAO. 1998. Una llamada a la acción. La estrategia mundial para la gestión de los recursos genéticos de los animales de granja.

FAO. 2002. Segundo documento de líneas directrices para la elaboración de planes generales de gestión de los recursos genéticos de animales de granja, gestión de pequeñas poblaciones en peligro. Roma, Italia.

FAZ, M.; USMANI, R. H.; ABDULLAH, M.; AHMAD, T. 2010. Evaluation of semen quality of Holstein Friesian and Jersey bulls maintained under subtropical environment. *Pakistan Veterinary Journal* 30, 75-78.

GRAHAM, J. K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 68, 3-4: 239-247.

HOLT, W. V.; BENETT, P. M.; VOLOBOUEV, V.; WATSON, P. F. 1996. Genetic resources banks in wildlife conservation. *Journal of Zoology* 238, 3, 531-544.

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T. A.; PERRI, S. H. V.; VICENTE, W. R. R. 2009. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the South Eastern region of Brazil. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 587-592.

MANDAL, D. K.; KUMAR, M.; TYAGI, S. 2010. Effect of age on spermiogram of Holstein Friesian Sahiwal crossbred bulls. *Animal* 4, 595-603.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; PAZ, P. 2010. Probe and technique for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* 45(2) 67-78.

MUÑO OTERO, R. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Octubre de 2007.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. 2007. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 91-101.

SEGURA-CORREA, J.C.; MONTES-PÉREZ, R. C. 2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Revista Biomédica* 12:196-206.

VALDECILLO, A.; MIRÓ-ARIAS, A.; NAVAS, F.; DE LA FUENTE, A.; CAMACHO, M. E.; DELGADO, J. V. 2011. Situación actual del banco de gemo-plasma andaluz. Libro de Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, AICA, volumen 1, páginas 128-132.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57, 149-179.

WILDT, D. E.; RALL, W. F.; CRISTSER, J. K.; MONFORT, S. L.; SEAL, U. S. Genome resource banks. Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* Vol. 47, n.º 10, Nov. 1997. ■



BRZ de razas domésticas autóctonas del Principado de Asturias.

