

ESTUDIOS CITOGENETICOS EN LOS CROMOSOMAS SOMATICOS DEL CONEJO (ORYCTOLAGUS CUNICULUS L.).

Arruga, M.V. e I. Zarazaga.

(Con la colaboración de F. Pons)

Departamento de Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

INTRODUCCION

El número diploide de los cromosomas del conejo ($2n = 44$) fué establecido por vez primera, en 1.926, por PAINTER, usando células amnióticas de embriones de 14 días, y más tarde confirmado por numerosos investigadores. No obstante, hasta que las técnicas de cultivos celulares y de observación de cromosomas no se perfeccionaron, no se realizó el primer análisis completo de los cromosomas de esta especie, llegándose a estudiar la longitud relativa de cada par así como la correcta posición -- del centrómero (MELANDER, 1.956). Aunque los cromosomas pudieran ser agrupados, era difícil la identificación individual de cada par cromosómico y especialmente del cromosoma X, el cual, era difícil de diferenciar de algunos pares de longitud media y morfología submetacéntrica.

El desarrollo actual de las técnicas de bandeo cromosómico ayuda a clarificar la situación. Mediante la aplicación de las técnicas de bandas G, Q, R y C se ha logrado la identificación de todos los pares, además de la diferenciación del cromosoma X (CHAN y cols., 1.977; SCHRODER y cols., 1.978 y HAGELTORN y GUSTAVSSON, 1.979). No obstante, quedan todavía algunos segmentos o cromosomas individuales sin reconocer en su totalidad, lo que obliga a seguir, mediante el perfeccionamiento de las -- técnicas de observación cromosómica.

En nuestro país, no se ha identificado el número cromosómico de esta especie animal, y queda mucho terreno por recorrer hasta la total identificación de cada segmento cromosómico, haciendo ello extensible a las diferentes líneas genéticas que se explotan en España. Especial interés reúnen estos estudios, concretamente en el conejo común español, cuyas características citogenéticas son todavía desconocidas.

Por ello, en el presente trabajo, se aplican técnicas -- standard de análisis cariológico complementadas con diferentes técnicas de bandeo (C, G y NOR).

MATERIAL Y METODOS

Los estudios citogenéticos se han realizado a partir de cultivos leucocitarios sanguíneos procedentes de 6 machos y 6 hembras.

Las muestras sanguíneas fueron extraídas directamente de -- corazón sobre los animales vivos y recogidas en tubos al vacío

conteniendo heparina (100 U.I./10 ml sangre).

Los leucocitos fueron separados y puestos en cultivo con medio RPMI al que se añadieron antibióticos (100 U.I. de penicilina y 0,2 mg de streptomina por ml de medio), 20% de suero fetal bovino y 0,05 ml de fitohemaglutinina como mitógeno. Los cultivos fueron incubados durante 48 a 50 horas a 37°C.

Una hora antes del final del período de incubación se añadió colchicina a una concentración del 0,01% (0,1 ml/10 ml de medio).

A continuación las células fueron sometidas al choque hipotónico (KCl 0,075 M) y posteriormente al fijador (metanol/ácido acético).

Finalmente, y una vez realizada la extensión sobre los portaobjetos, se procedió a la tinción standard con colorante Giemsa al 20% en buffer fosfato (pH = 6,8), durante 5 minutos.

Técnicas de bandas.

Las extensiones no teñidas fueron sometidas a diferentes técnicas de marcaje cromosómico. Así por ejemplo para bandas G, se utilizó el método proteolítico, utilizando tripsina al 0,25% (tripsina 1:250) en PBS, manteniendo los portaobjetos durante 10-15 segundos a temperatura ambiente. A continuación, lavados con PBS y teñidos con Giemsa.

La coloración de la heterocromatina constitutiva mediante las denominadas bandas C, se llevó a cabo colocando las extensiones en HCl 0,2 N durante 1 hora a temperatura ambiente, lavadas con H₂O destilada y tratadas durante 30 segundos con una solución de Ba(OH)₂ 0,3 N a 50°C. Lavadas con H₂O destilada y colocadas durante 1 hora en solución 2 x SSC a 60°C. Finalmente, teñidas con Giemsa.

La tinción de las regiones portadoras de los organizadores nucleolares (NOR), se realizó por precipitación argéntica mediante nitrato de plata. Los portas son recubiertos de una solución de AgNO₃ al 50% en H₂O destilada, colocados durante horas a 50°C, al cabo de este tiempo, se lavan y se observan. En ocasiones, también han sido teñidos adicionalmente, con Giemsa al 2% durante 15 segundos.

RESULTADOS

Más de 1.000 metafases han sido estudiadas (50 metafases/individuo) y en todas ellas ha podido comprobarse el número cromosómico $2n = 44$, tanto en los machos como en las hembras.

Del total de metafases analizadas han sido seleccionadas aquéllas que reunían mejores condiciones para la realización del cariotipo (cromosomas separados unos de otros, cromátidas paralelas, etc.). De esta forma se ha obtenido el cariotipo de todos los animales estudiados, comprobándose tanto el número como la morfología cromosómica.

La ordenación de cada par de cromosomas homólogos, ha sido realizada siguiendo las normas y recomendaciones de la Conferencia Internacional de Reading (1.976) y del Comité para Standardización del cariotipo de *Oryctolagus cuniculus* (1.981).

De esta forma y como puede observarse en la figura 1, los 44 cromosomas se dividen en dos grupos: el par sexual (gonosomas) y los pares autosómicos. Estos últimos, comprenden 4 grupos según la morfología (posición del centrómero). Dentro de cada grupo la disposición sigue un orden de tamaño decreciente.

El primer grupo comprende los pares 1 al 6 todos ellos metacéntricos (posición central del centrómero). El segundo, -- constituido por los pares 7 al 11 y submetacéntricos (el centrómero ligeramente desplazado hacia un extremo). El tercero, formado por los 6 pares siguientes, del 12 al 17, presentando una morfología subtelo-céntrica (un brazo muy corto, frente al otro bastante más largo) y finalmente, el cuarto grupo autosómico con todos los pares telocéntricos (el centrómero ocupa -- una posición terminal), comprende los pares 18 al 21, de menor tamaño.

Con respecto al par sexual, en los machos se comprueba la presencia de un cromosoma X submetacéntrico, con un tamaño intermedio entre los pares 8 y 9 y un cromosoma Y, subtelo-céntrico, de tamaño semejante al par 20. Por otra parte, las hembras presentan 2 cromosomas X, ámbos submetacéntricos.

Respecto a los resultados obtenidos a partir de las técnicas de bandeado aplicadas, se han identificado todos los pares - cromosómicos y confirmado la ordenación del cariotipo.

Mediante las bandas G, los cromosomas presentan una alternancia de bandas claras y oscuras a lo largo de los brazos cromosómicos, excepto la región centromérica que suele aparecer -- bastante clara.

En la figura 2, se observa un cariotipo obtenido con bandas C, donde se pone de manifiesto, únicamente la región centrométrica y las constricciones secundarias. Por el contrario, las cromátidas aparecen teñidas pálidamente.

En la figura 3, sobre el cariotipo correspondiente, se observan las regiones cromosómicas donde se identifican los organizadores nucleolares. Mediante esta técnica las cromátidas -- aparecen poco teñidas y sólo son coloreadas las regiones portadoras del DNA ribosómico, aunque en realidad parece que se tiñen más probablemente las proteínas cromosómicas que el DNA. Los granos de plata, se sitúan, de esta forma, sobre los brazos portadores de dicho DNA ribosómico.

Con estos resultados, se contribuye a un mejor y más completo conocimiento de los cromosomas del conejo en nuestro -- país y de las características de comportamiento y diferenciación, para posteriores aplicaciones en la selección y mejora -- de las razas explotadas.

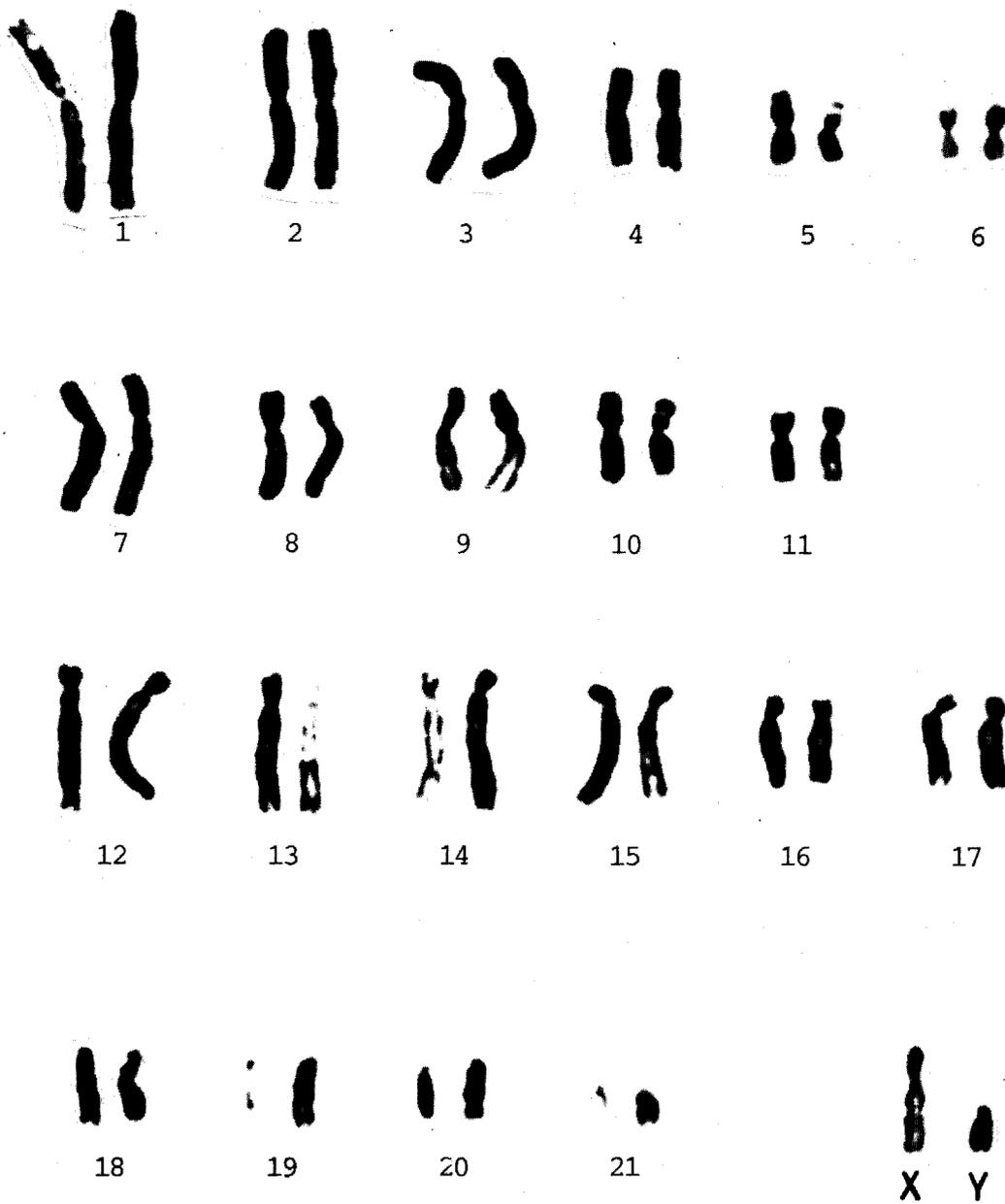
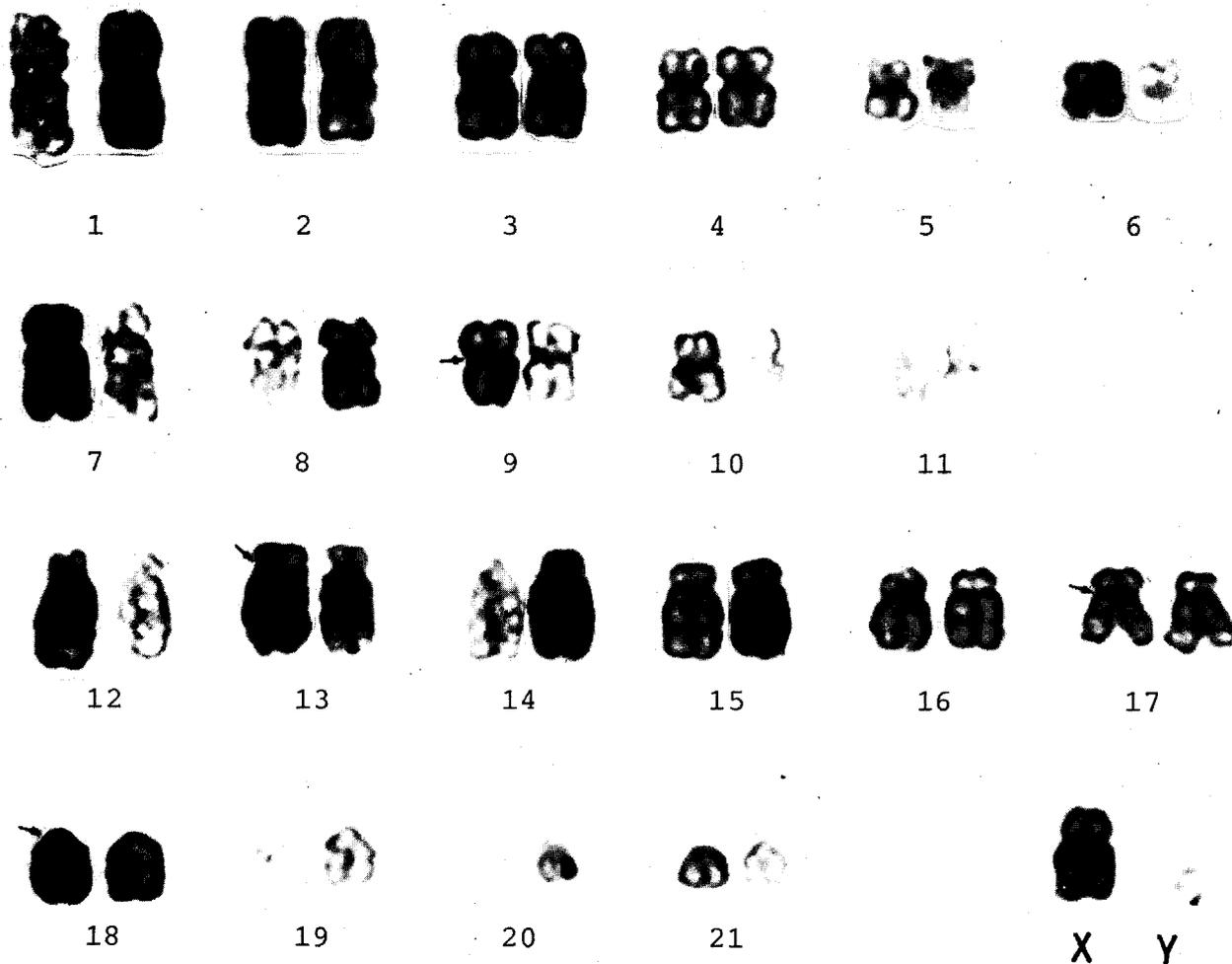
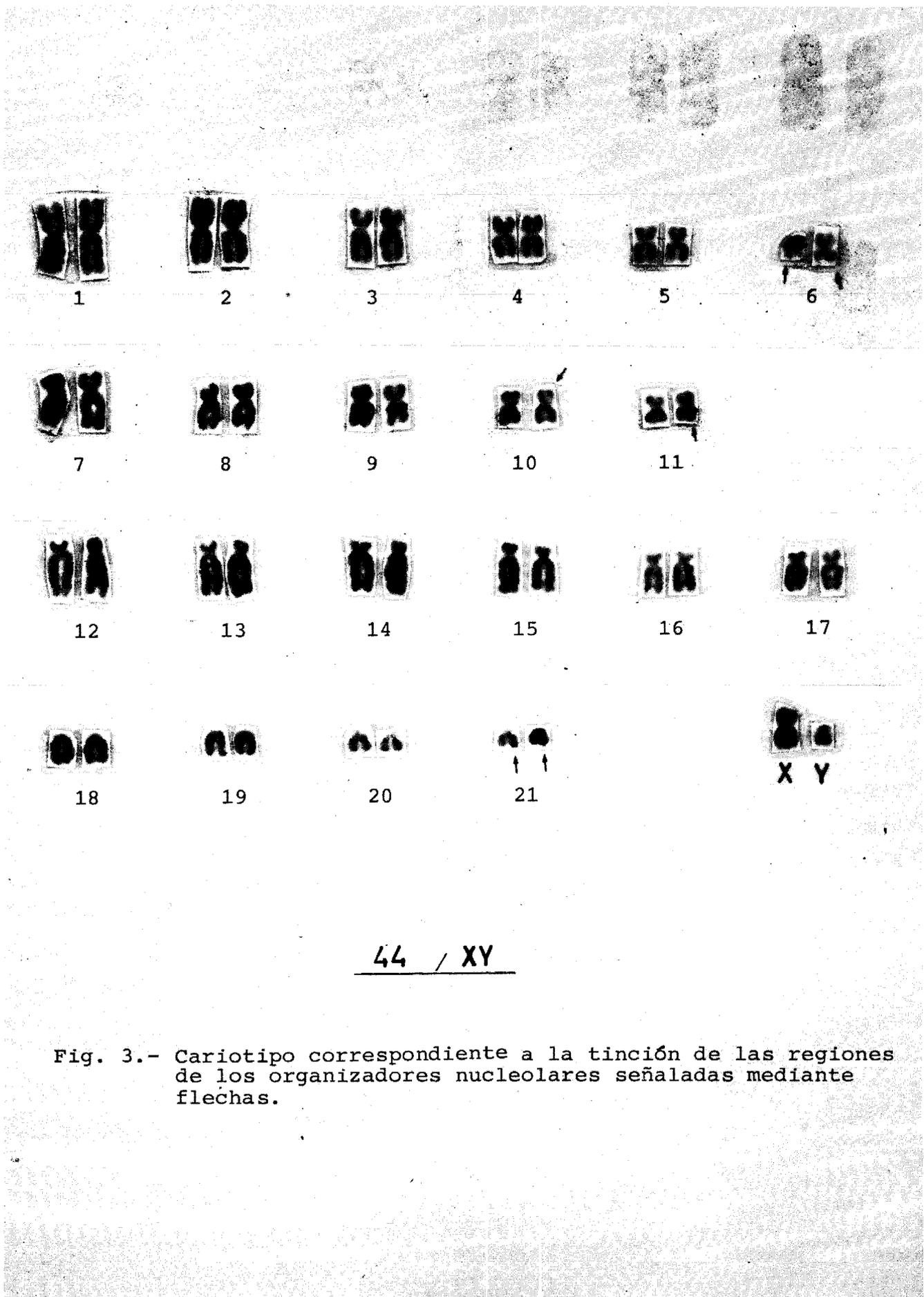


Fig. 1.- Cariotipo de *Oryctolagus cuniculus* L. Tinción standard.



44 / XY

Fig. 2.- Cariotipo teñido con bandas C donde se pone de manifiesto la región centromérica y las constricciones secundarias.



44 / XY

Fig. 3.- Cariotipo correspondiente a la tinción de las regiones de los organizadores nucleolares señaladas mediante flechas.

DISCUSION

La aplicación de la técnica convencional para la obtención de cariotipos en una especie animal tan poco estudiada, desde este punto de vista, como la que nos ocupa en este trabajo, -- constituye una técnica perfectamente válida y es ya un primer -- paso para su conocimiento citogenético. Pero en muchas ocasio-- nes, no va a dar la suficiente resolución y es posible que no -- permita la completa identificación de cada par cromosómico, de-- bido al tamaño o morfología similar entre algunos de ellos.

Es por esto, que se hace imprescindible la aplicación de -- otras técnicas más resolutivas, como son las de bandeo, en cual-- quiera de sus manifestaciones (G, C, R, T, etc.).

Por otra parte, representan una eficaz metodología para la identificación de posibles anomalías numéricas o estructurales (translocaciones, fusiones céntricas, inversiones, etc.) que -- pueden presentarse en los animales, destacando, en este aspec-- to, la técnica de bandas C (fig. 2).

En cuanto a las bandas NOR, corresponden a las regiones de los organizadores nucleolares (NOR) (fig. 3) y se definen como aquellas áreas cromosómicas portadoras del código en el DNA que codifica para la producción del RNA ribosómico.

El número de regiones que se ha observado a lo largo del -- presente trabajo, varía en cada individuo. Se han encontrado un máximo de 6 y un mínimo de 3 por cada metafase. Estas variacio-- nes pueden ser explicadas en base a que el material teñido no -- sea ácido nucleico sino probablemente de naturaleza protéica, -- que esté presente en los lugares activos de la transcripción -- del RNA ribosómico, como ya señalaran GOODPASTURE y BLOOM -- (1.975), HOWELL (1.975) y MARTIN DE LEON y cols. (1.978).

La importancia de la localización de las NOR, no reside só-- lo en el hecho de que contribuyen a un mejor conocimiento del -- comportamiento cromosómico dentro de la célula, sino que además dada la existencia de variación entre los individuos de una mis-- ma especie, constituyen un inapreciable marcador genético, pues-- to que no sólo se heredan los cromosomas sino también sus cara-- ctísticas y comportamiento.

No obstante y a pesar del gran avance que supone la aplica-- ción de las bandas, se han hecho diferentes tipos de ordenacio-- nes dentro de los pares cromosómicos a la hora de la confección del cariotipo, destacando la del Comité para Standarización del cariotipo de *O. cuniculus* que podemos considerar como definitiva, y la que se ha seguido en la realización de los cariotipos en el presente trabajo.

Los estudios citogenéticos en conejo reúnen un gran interés por las numerosas aplicaciones a que pueden destinarse. Dentro de la mejora genética, son fundamentales los efectos que los -- factores cromosómicos están produciendo en los individuos, ya -- que la causa de numerosas muertes de embriones tempranos es la presencia de dotaciones cromosómicas anómalas. Por otra parte, las alteraciones de los cromosomas, tanto estructurales como --

numéricas son causa de baja fertilidad en los portadores. Cabe señalar el interés que representa el conocimiento del cariotipo del conejo, con vistas a trabajos de experimentación como el mapeo genético mediante la técnica de hibridación celular interespecífica, por ejemplo.

La aplicación de los estudios citogenéticos en conejos y -- concretamente en razas y líneas genéticas propias del país, -- constituye un primer paso en el mejor conocimiento genético de las líneas utilizadas en las explotaciones cunícolas, con vistas a la selección y mejora de dicha especie.

BIBLIOGRAFIA

- CHAN, F.P.H.; F.R. SERGOVICH y E.L. SHAVER. (1.977): Banding patterns in mitotic chromosomes of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Can. J. Genet. Cytol.*, 19: 625-632.
- COMMITTEE FOR STANDARDIZED KARYOTYPE OF *Oryctolagus cuniculus*. (1.981): Standard Karyotype of the laboratory rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31: 240-248.
- ECHARD, G. (1.973): Bandes chromosomiques de type G chez le lapin domestique (*Oryctolagus cuniculus*). *Annls. Génét.*, 5: 425-434.
- GOODPASTURE, C. y S.E. BLOOM. (1.975): Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37-50.
- HAGELTORN, M. e I. GUSTAVSSON. (1.979): Identification by banding techniques of the chromosomes of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.). *Hereditas*, 90: 269-279.
- HOWELL, W.M.; T.E. DENTON y T.R. DIAMOND. (1.975): Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia*, 31: 260-262.
- MARTIN DE LEON, P.A.; D.L. PETROSKY y M.E. FLEMING. (1.978): Nucleolar organizer regions in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as shown by silver staining. *Can. J. Genet. Cytol.*, 20: 377-382.
- MELANDER, Y. (1.956): The chromosome complement of the rabbit. *Hereditas*, 42: 432-435.
- PAINTER, T.S. (1.926): Studies in mammalian spermatogenesis. VI. The chromosomes of the rabbit. *J. Morphol.*, 43: 1-43.
- PROCEEDINGS OF THE FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE FOR THE STANDARDISATION OF BANDED KARYOTYPES OF DOMESTIC ANIMALS. (1.980): *Hereditas*, 92: 145-162.
- SCHRODER, J.; SUOMALAINEN, H.; W. VAN DER LOO y E. SCHRODER. (1.978): Karyotypes in lymphocytes of two strains of rabbit, and two species of hare. *Hereditas*, 88: 183-188.

RESUMEN

El conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus* L.) presenta, -- desde hace largo tiempo, un gran interés desde el punto de vista citogenético. A pesar de ello, en España son tan escasos dichos estudios que en el conejo común español, no se ha determinado todavía, su cariotipo.

En el presente trabajo se estudia el número y morfología -- cromosómica en esta línea genética, identificado cada par cromosómico mediante técnicas convencionales y aplicando técnicas de bandas G, C y NOR, siguiendo las normas y recomendaciones de la Conferencia Internacional de Reading celebrada en 1.976 y del Comité para Standarización del cariotipo de *Oryctolagus cuniculus* (1.981) se observan los organizadores nucleolares en metafase usando tinción de AgNO₃. El número de organizadores observados, varía de 3 a 6 por metafase en los individuos estudiados.

SUMMARY

The domestic rabbit has for a long time been of great interest from several cytogenetical points of view.

The Karyotype of Spanish common rabbit aren't determined. In Spain, these studies are actually few.

In the present work, the standard and G-, C- and NOR's banding patterns of the domestic rabbit chromosomes are described and verified by representative karyotypes. The chromosomes, arranged according to the system recommended by an international study group at Reading in 1976 and Committee for Standardized Karyotype of *Oryctolagus cuniculus* in 1981, are individually identifiable with each of the banding techniques used. Nucleolar organizer regions (NOR's) were demonstrated in metaphase chromosomes using silver staining. The number of Ag-NOR's seen in the rabbit varied among individuals. There was a maximum of six Ag-NOR's, with an average of three to four per metaphase.

