

# RECONSTITUCIÓN DE UNA LÍNEA DE CONEJOS A PARTIR DE EMBRIONES CRIOCONSERVADOS

## RABBIT LINE RECONSTITUTION BY CRYOPRESERVATION EMBRYOS

García, M.L.<sup>1</sup>, M. Baselga<sup>1</sup>, M.P. Viudes-de-Castro<sup>2</sup> y J.S. Vicente<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. 46071 Valencia. España.  
e-mail: mlgarcia@dca.upv.es

<sup>2</sup>División de Producción Animal. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández.  
03320 Orihuela. Murcia. España.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Crioconservación.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Criopreservation.

### RESUMEN

Se pretende reconstituir la generación 15 de una línea seleccionada por aptitud maternal, cuyos embriones fueron vitrificados en 1993. Un total de 404 embriones pertenecientes a 44 dotaciones de hembras distintas y de 17 machos, fueron desvitrificadas y transferidas para la reconstitución de la población. La eficacia global del programa de conservación al nacimiento fue del 34 p.100 (136/404) y con respecto al número de gazapos a los 63 días del 26 p.100. Se obtuvo descendencia del 88 p.100 de los machos y del 68 p.100 de las hembras. Este número de individuos fue suficiente para reconstituir la población.

### SUMMARY

The aim of this work was the reconstitution of 15<sup>th</sup> generation from a maternal line, vitrified in 1993. Four hundred four embryos belonging to a 44 different females and 17 males were thawed and transferred. Total efficiency of cryopreservation program at birth was 34 p.100 (136/

404) and at 63 days after birth was 26 p.100. The offspring of the males and females were 88 p.100 and 68 p.100, respectively. The number of rabbits was enough in order to re-establish the population.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diferentes proyectos sobre la conservación de los recursos genéticos en conejo (Bolet *et al.*, 1996). El primero de ellos, pretende la conservación de líneas locales de conejo de distintos países Mediterráneos, en el segundo, varios países europeos se encuentran trabajando en el programa denominado *Inventory, characterization, evaluation, conservation and utilization of european rabbit genetic resources*. Estos proyectos pretenden tanto conservar variabilidad genética y mantener flexibi-

*Arch. Zootec. 49: 81-86. 2000.*

lidad para poder adaptar la producción a futuras exigencias de mercado o condiciones de explotación como la conservación por razones culturales o sociales. La elección de la metodología de conservación *in situ* o *ex situ* estará determinada por la población y por la presión y condiciones ambientales que generan las actuales necesidades de producción.

La conservación *ex situ* en conejo es posible ya que se disponen de métodos de crioconservación para óvulos, semen y embriones. No obstante, todos ellos presentan determinadas limitaciones y la metodología a utilizar dependerá de la población a conservar. La recuperación de óvulos o embriones *in vivo* en conejo implica necesariamente la asistencia laparoscópica y la realización de una laparotomía, o el sacrificio de la hembra. La crioconservación de los óvulos y su fecundación posterior implica la conservación de semen y en conjunto ofrece unos bajos porcentajes de supervivencia (6 p.100, Diedrich *et al.*, 1986). La reconstitución de una población es posible a partir de semen congelado mediante sucesivos cruces por absorción. De un lado, la facilidad con la que pueda ser recogido del semen (razas domesticadas o no) y de otro la elevada variabilidad observada en el éxito a la congelación determinarán la elección de esta metodología. La crioconservación de embriones es el método más directo de conservar una población genotipo, sin embargo, todos los procedimientos de crioconservación (congelación o vitrificación) se han desarrollado sobre líneas comerciales y, en todos ellos, los mejores resultados se obtienen en el estadio embrio-

nario de mórula (42-60 p.100, Kasai *et al.*, 1992, Vicente y García-Ximénez, 1996, Joly *et al.*, 1996).

En los últimos siete años, el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia ha constituido un banco de embriones y semen de conejo para sus líneas seleccionadas. Actualmente se están descongelando algunas de las generaciones de selección guardadas con el fin de obtener una población control que permita evaluar la ganancia genética obtenida en estos años. La propuesta de este trabajo es mostrar la eficacia en la reconstitución de una de las líneas, línea V, expresada como porcentaje de animales de la población original de los que se ha recuperado descendencia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES

Los embriones crioconservados pertenecen a la generación 15 de la línea V. Esta línea de aptitud maternal está siendo seleccionada desde 1984 en la granja experimental de la Universidad Politécnica de Valencia por el tamaño de camada al destete, empleando la metodología BLUP para la evaluación genética de los apareamientos (Estany *et al.*, 1989). El origen de esta línea es sintético y en la actualidad se encuentra en la generación número 22.

### RECUPERACIÓN DE EMBRIONES

Las hembras de la línea V al final del proceso de selección genética (más de tres partos) fueron montadas por machos de la misma línea y genera-

## CRIOCONSERVACIÓN DE UNA LÍNEA DE CONEJOS

ción. Las hembras fueron sacrificadas 70-72 horas *post-coitum* y perfundidos los oviductos y cuernos uterinos con 10 ml de tampón fosfato de Dubelcco (DPBS). Los embriones recuperados fueron catalogados en base a criterios morfológicos, considerándose embriones normales aquellos embriones en estadio de mórula compactada o blastocisto temprano que presentaban una masa de células homogénea y ninguna anomalía en la cubierta de mucina y zona pelúcida. Los embriones normales fueron lavados en DPBS antes de iniciar el proceso de vitrificación.

### VITRIFICACIÓN

Los embriones recuperados de cada hembra donante fueron vitrificados según el procedimiento descrito por Vicente y García-Jiménez (1996). El procedimiento consta de dos etapas. En la primera, los embriones permanecieron durante 2 minutos a 20°C en una solución que contenía un 10 p.100 (v/v) de suero de coneja + 12,5 p.100 de dimetilsulfóxido +12,5 p.100 de etilenglicol en DPBS. En la segunda etapa, los embriones fueron expuestos a la solución de vitrificación durante un minuto a 20°C (10 p.100 de suero de coneja + 20 p.100 de dimetilsulfóxido +20 p.100 de etilenglicol en DPBS). Los embriones de una hembra donante en la solución de vitrificación (4 a 16 embriones) fueron cargados en la fracción central (0,1 ml) de una pajuela de inseminación de 0,25 ml (IMV), a ambos lados de esta fracción y separados por aire se situaron dos fracciones de DPBS. Las pajuelas fueron cerradas con un junquillo de plástico y sumergidas en nitrógeno líquido.

### DESVITRIFICACIÓN

Los embriones fueron desvitrificados en un baño de agua a 20°C. Posteriormente, la fracción central fue vertida en 0,8 ml de una solución 0,33 M de sacarosa en DPBS, tras 5 minutos, los embriones fueron lavados dos veces en DPBS.

### TRANSFERENCIA

Las hembras receptoras pertenecían a la línea V (generación 22), éstas fueron inducidas a ovular con 0,8 mg de acetato de buserilina (Hoescht) 60 horas antes de la transferencia. La transferencia de los embriones desvitrificados de una hembra donante se realizó por laparotomía a nivel oviductal.

### CONTROLES REALIZADOS

Tras el parto de las hembras transferidas se contabilizaba el número de gazapos vivos y muertos. A los 28 días de edad los gazapos eran destetados y se trasladaban a la nave de engorde. El engorde tenía lugar en jaulas colectivas de 9 animales durante 5 semanas. A la edad de 63 se contabilizaba el tamaño de camada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media de embriones vitrificados por hembra fue de 9,2 sin haber realizado ningún tratamiento de superovulación sobre ellas. Dichos tratamientos podrían ejercer un efecto negativo sobre la calidad de los embriones recuperados y también podría aumentar el número de hembras de las que no se recuperan embriones (García-Ximénez y Vicente, 1990; Schmidt *et al.*, 1992).

**Tabla I.** Eficacia del proceso de crioconservación y transferencia de embriones de la generación 15 de la línea V. (Efficiency of the cryopreservation and embryo transfer in the 15<sup>th</sup> generation of the V line).

	Número	Media	Máximo-Mínimo
EV	404	9,2	16-4
ED	378	8,6	13-4
ET	357	8,1	13-4
NT	151	4,6	10-2
NV	136	4,3	8-1
N28	119	3,8	8-1
N63	106	3,5	8-1

EV.- Número de embriones vitrificados. ED.- Número de embriones desvitrificados. ET.- Número de embriones transferidos. NT.- Número de gazapos nacido totales. NV.- Número de gazapos nacidos vivos. N28.- Número de gazapos destetados a los 28 días de edad. N63.- Número de gazapos a los 63 días de edad.

Así, García-Ximénez y Vicente (1990) y Joly *et al.* (1996) tras la aplicación de un tratamiento de superovulación no obtuvieron embriones de un 37 p.100 (eCG) y un 30 p.100 (FSH) de las hembras, respectivamente. El número máximo y mínimo de embriones por dotación fue de 16 a 4, respectivamente (**tabla I**).

La eficacia del programa de conservación al nacimiento fue del 34 p.100 (136/404) y en relación con el número de individuos que alcanzan los 63 días de vida es de tan sólo el 26 p.100 (106/404). Esta baja eficacia fue condicionada, en primer lugar por el propio proceso de vitrificación-desvitrificación (357/404, 88 p.100), en el que un 12 p.100 de los embriones resultan

dañados perdiendo incluso su integridad morfológica. En segundo lugar, como consecuencia del propio devenir de la gestación y parto, en el que determinados embriones implantados o fetos no se desarrollaron a término y por último problemas al parto que determinaron la pérdida de fetos desarrollados. En transferencias con embriones no crioconservados el porcentaje de nacidos vivos se sitúa entre el 50 y 60 p.100 (Vicente y García-Ximénez, 1991), en esta experiencia el porcentaje en relación con los transferidos fue del 38 p.100 (**tabla I**). La elevada mortalidad al parto (10 p.100) y la elevada mortalidad durante la etapa de lactación y engorde (22 p.100, 30/136, **tabla I**) han reducido notablemente el número de efectivos para la reconstitución de la población. No obstante, la confluencia de factores sanitarios negativos sobre las hembras receptoras y sobre el engorde de los gazapos pueden y deben ser evitados en posteriores experiencias. Así por ejemplo Cifre (1997) utilizando esta misma metodología obtuvo una eficacia del 47 p.100 al nacimiento y de un 43 p.100 a 63 días y en el transcurso de su experiencia, las hembras y el engorde de la granja no tuvieron que ser tratadas para paliar trastornos digestivos.

A pesar de lo expuesto, el número de animales y la representación de orígenes fue suficiente para reconstituir la población. Al final del periodo de engorde, que se corresponde con los 63 días de edad, se obtuvieron un total de 52 machos y 54 hembras.

Se recuperaron 17 orígenes de macho con una media de 2,6 dotaciones/macho siendo el máximo 6 dota-

## CRIOCONSERVACIÓN DE UNA LÍNEA DE CONEJOS

**Tabla II.** Representación por sexos de la generación 15 de la línea V en el banco de embriones y después del proceso de vitrificación. (Sex representation of the 15<sup>th</sup> generation of the V line in the embryos bank and after the vitrification process).

	TR	TNT	TNV	TND	TNS
Machos	17	15	15	15	15
Hembras	44	33	32	31	30

TR= Total de reproductores con representación en el banco de embriones. TNT= Total de reproductores con representación en nacidos totales. TNV= Total de reproductores con representación en nacidos vivos. TND= Total de reproductores con representación en número de destetados. TNS= Total de reproductores con representación en número de gazapos a los 63 días.

ciones por macho y el mínimo 1 dotación por macho (**tabla II**). Por tanto, dichas dotaciones se correspondían con 44 hembras distintas apareadas con

machos con coeficiente de parentesco mínimo entre ambos (Villanueva y Simm, 1994). El 68 p.100 (30/44) de las hembras recuperadas llegaron a tener descendencia a las 9 semanas de vida en la generación siguiente mientras que en los machos el porcentaje fue del 88 p.100 (15/17).

En estos momentos, 46 hembras y 15 machos procedentes de embriones vitrificados se encuentran en producción. Para evitar el posible efecto de las técnicas reproductivas empleadas, en la vida productiva de las hembras y aumentar el tamaño de la población, es conveniente trabajar también con los descendientes de los individuos criopreservados (Smith, 1977; Cifre *et al.*, 1999)

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CICYT AGF97-0803 y RESGEN CT95-0060.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bolet, G., M. Baselga, M. Monnerot, A. Rouvier and J.M. Brun. 1996. Evaluation, conservation and utilization of rabbit genetic resources: situation and prospects in the mediterranean region in Europe. 6<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Toulouse. Vol 2: 249-253.
- Cifre, J. 1997. Constitución de una línea de aptitud maternal en conejo aplicando criterios de selección por hiperprolificidad. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Cifre, J., M. Baselga, E. Gómez and M.L. García. 1999. Effect of embryo cryopreservation techniques on reproductive and growth traits in rabbits. *Annales de Zootechnie*, Vol. 48 (En prensa).
- Diedrich, K., S. Al-Hasani, H. and D. Van der Venkrehs. 1986. Successful *in vitro* fertilization on frozen-thawed rabbit and human oocytes. *J. in vitro Fert. Embryo Transfer.*, 3: 65.
- Estany, J., M. Baselga, A. Blasco and J. Camacho. 1989. Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. *Livestock Production Science*, 21: 67-75.
- García-Ximénez, F. and J.S. Vicente. 1990. Effect of PMSG treatment to mating interval on the

GARCÍA, BASELGA, VIUDES-DE-CASTRO Y VICENTE

- superovulatory response of primiparous rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 13: 71-73.
- Joly, T., J. Vicente, M. Theau-Clément, F. García-Ximénez, U. Besenfelder and J.P. Renard. 1996. Cryopreservation of genetic resources in rabbit species: practical application. 6<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Toulouse. Vol 2: 293-298.
- Kassai, H., Y. Hamaguchi, S.E. Zhu, T. Miyake, T. Sakurai and T. Machida. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an Ethylene Glycol-Based solution by a simple method. *J. Reproduction and Fertility*, 89: 91-97.
- Smith, C. 1977. Use of store frozen semen and embryos to measure genetic trends in farm livestock. *Z. Tierzüchtung Züchtgsbiol*, 94. 119-127.
- Schmidt, P.M., V.M. Hollifield, X. Lin and D.E. Wildt. 1992. Induced ovulation and adequate embryo recoveries in New Zealand White rabbits treated with a low PMSG/hCG dose or single, daily injection of FSH-P. *Theriogenology*, 37: 293.
- Vicente, J. and F. García-Ximénez. 1991. Effects of hCG treatment on morula recovery in the rabbit and their survival after synchronous transfer. *Anim. Reprod Sci.*, 24: 347-353.
- Vicente, J. and F. García-Ximénez. 1996. Direct transfer of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 45: 811-815.
- Villanueva, B. and G. Simm. 1994. The use and value of embryo manipulation techniques in animal breeding. 5<sup>th</sup> World congress on genetics applied to livestock production., Vol 20: 200-207.