



Evaluación cariotípica de un grupo de búfalos en Fredonia, Antioquia (Colombia)

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Mónica M Alzate¹, Bact; Juan B López², Biol, MS; María E Márquez², Biol, MS.

¹Colegio Mayor de Antioquia, y ²Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 1779, Sede Medellín, Colombia.
memarque@unalmed.edu.co

(Recibido: 21 octubre, 2003 ; aceptado : 5 junio, 2006)

Resumen

*En el presente trabajo se realizó la caracterización citogenética de búfalos por bandas R-replicativas, con el fin de conocer su número cromosómico, para así realizar su clasificación ya sea como búfalo de río o de pantano. También se buscó la existencia de híbridos, los cuales podrían ser un obstáculo al implementar programas de reproducción de estos animales, dado que los búfalos son una excelente alternativa debido a la alta producción de leche y carne que ofrecen, además de ser muy eficientes en trabajos de tracción. Se muestrearon 25 ejemplares, 13 machos y 12 hembras de los cuales se realizaron cultivos celulares de linfocitos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina y tratados con un pulso terminal de 5-bromo2'-deoxiuridina (BrdUrd) para obtener extendidos cromosómicos y obtener bandas R-replicativas. El análisis citogenético de cada una de las muestras reveló un número diploide de $2n=50$, lo que los clasifica como búfalos de río (*Bubalus bubalis*). El ordenamiento del cariotipo de los cromosomas homólogos fue clasificado de acuerdo a la nomenclatura internacional de la siguiente manera: 1 par acrocéntrico, 3 pares submetacéntricos, 1 par metacéntrico y 19 subtelocéntricos, incluyendo los cromosomas sexuales X y Y. El número total de los cromosomas se distribuyó en 3 grupos: grupos A y B autosómicos y el par sexual, ordenados de mayor a menor. De los resultados analizados, no se obtuvieron individuos producto del cruce entre parentales con número cromosómico diferente.*

Palabras clave: análisis citogenético, *Bubalus bubalis*, búfalos, cromosomas.

Introducción

Los búfalos de río (*Bubalus bubalis*) y de pantano (*Bubalus carabanesis*) se consideran originarios de Asia, desde donde fueron llevados a Africa, Europa, Oceanía y por último fueron traídos a Estados Unidos, Venezuela, Argentina, Brasil y finalmente a Colombia (10).

El búfalo es un rumiante doméstico, semiacuático, de hábitos nocturnos, temperamento delicado, tranquilo y muy resistente a condiciones climáticas

extremas. Se encuentran adaptados a climas localizados en diferentes pisos térmicos, desde los 3000 metros de altura hasta zonas de pantanos (12). Además de adaptarse a condiciones climáticas extremas, el búfalo posee una gran potencialidad para aprovechar mejor los pastos naturales deficientes en nutrientes como son los encontrados frecuentemente en playones y pantanos.

De otra parte, el búfalo produce leche de gran calidad con altos niveles de sólidos totales y en estado juvenil su carne es jugosa, blanda, tierna, muy gustosa

y con mayor porcentaje de minerales si la comparamos con la carne de vacunos. Otro aspecto a tener en cuenta es la importancia que podría representar el búfalo en labores de tracción ya sea en el transporte de carga o en labranza (9). Por las razones antes expuestas, los búfalos cobran gran importancia como alternativa en la producción de alimentos y como opción en labores de tracción.

A nivel mundial, se ha reportado que el búfalo de río posee una dotación cromosómica de $2n=50$ y el búfalo de pantano $2n=48$ (3). También se ha reportado un híbrido subfétil producto de las dos especies con un número cromosómico $2n=49$ (3). En Colombia no existen registros que muestren con precisión el origen, la especie y la dotación cromosómica de los búfalos que se encuentran en el país a pesar de la existencia de cuatro grandes núcleos: el de la depresión Momposina, el de Ayapel (Córdoba), el del Valle del Cauca, el de Fredonia en Antioquia, el cual fue trasladado a finales del 2002 para Ayapel y el núcleo más grande ubicado en el Magdalena Medio, administrado por el Fondo Ganadero de Caldas.

Si se desea implementar un programa que tenga como propósito el aprovechamiento zootécnico y una producción sostenible, es imprescindible determinar las especies de búfalos introducidas en nuestro medio, en los diferentes centros de crianza. Estos estudios permitirán determinar la posible existencia de híbridos entre las especies, requisito indispensable para establecer un programa de cría y mejoramiento de esta especie foránea, con el fin de evitar obstáculos reproductivos que puedan causar erosión genética en las dos especies posiblemente introducidas en nuestro país.

Para caracterizar una especie animal existen diferentes metodologías que van desde el uso de rasgos morfológicos, genéticos y bioquímicos, hasta la evaluación cariológica o cromosómica y molecular, las cuales pueden dar luces sobre una clasificación taxonómica apropiada. Tradicionalmente, la citogenética se ha utilizado para caracterizar especies de mamíferos debido a la facilidad en la toma de la muestra, el conocimiento acumulado en la técnica de cultivos de linfocitos de sangre periférica y la obtención de extendidos cromosómicos, el manejo

de las técnicas de bandeado que hacen más precisa la organización del cariotipo y además porque permite la diferenciación inequívoca entre machos y hembras. De otro lado, el análisis cromosómico, permite establecer polimorfismos intra e ínterespecíficos en el caso de organismos de la misma especie que tengan distintos orígenes poblacionales.

De otra parte, mediante el uso del 5-Bromo^{2'}-deoxiuridina (BrdUrd), nucleótido análogo de la timina, es posible determinar la cronología en la duplicación de cada cromosoma a través de la fase S del ciclo celular. Este principio permite dividir la fase S en V estadios donde el número III corresponde a las bandas R-Replicativas (1).

En este trabajo se realizó la evaluación cromosómica de un grupo de búfalos localizados en Fredonia para determinar el número cromosómico del núcleo y la calidad de la cromatina de las especies, con el fin de establecer marcadores cromosómicos potenciales asociados con aberraciones cromosómicas, lo cual es de suma importancia en programas de reproducción asistida.

Materiales y métodos

Se estudiaron 24 ejemplares jóvenes, dentro de los cuales se encontraban 12 hembras y 12 machos, además de 1 reproductor adulto, padre de 12 de los ejemplares incluidos en el estudio. De cada muestra obtenida, se analizaron 50 mitosis en cada una de las cuales se determinó el número y la morfología cromosómica.

Los cariotipos se obtuvieron por medio de cultivo de linfocitos de sangre periférica heparinizada a una concentración de 2000U/mL. Cada cultivo se realizó en condiciones asépticas con 1 mL de sangre en 9 mL de medio RPMI 1640 (GIBCO) completo (Suero Bovino Fetal (10%), penicilina (100U) y estreptomycin (100µg/mL) y 0.1 mL de fitohemaglutinina (20X). Luego de sembrada la muestra los cultivos se incubaron a 37°C por 72 horas. Cinco horas antes de la cosecha se le adiciona a cada cultivo 0.1mL de BrdUrd (SIGMA) (2µg/mL). Una

vez finalizado el tiempo de cultivo se le adicionó 0.1 ml de Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos.

Se llevó a cabo el procedimiento para la obtención de los extendidos cromosómicos, la coloración diferencial y la fotografía al microscopio (7). Las fotografías de los extendidos se imprimieron en papel *Forte* FPS1, y se procedió al ordenamiento los cromosomas (cariotipo) con base en las recomendaciones de la ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (5); ISCNA (International Conference for the Standardization of Banded Karyotype of Domestic Animals) (6).

Resultados

En la figura 1 y en la tabla 1 se muestra el número diploide de cromosomas observados en la población de búfalos, lo cual corresponde a $2n=50$ tanto para las hembras XX como para los machos XY. Estos resultados están de acuerdo con los reportes publicados (11).

Una vez determinado el número cromosómico, se calculó el número fundamental ($NF=60$) según el parámetro de George y Weir (4) con el fin de establecer parámetros de comparación cariológica con otras especies relacionadas. De otro lado, teniendo en cuenta la morfología, ubicación del centrómero y longitud relativa de los cromosomas de *Bubalus bubalis*, lo mismo que el patrón de bandeado replicativo obtenido, los cromosomas se clasificaron así: el cromosoma 1 acrocéntrico, los cromosomas 2, 3 y 4 submetacéntricos, el cromosoma 5 metacéntrico y los cromosomas del 6 al 24 incluyendo X y Y subtelocéntricos.

Con base en los datos anteriores, más el patrón de bandas, se identificaron los pares homólogos por su patrón de bandas y posición del centrómero (véase Figura 2a y 2b) de modo que el cariotipo de búfalo se distribuyó en tres grupos: el Grupo A constituido por los cromosomas 1 al 5, el Grupo B por los cromosomas 6 al 24 y el grupo de los cromosomas sexuales constituidos por XXoXY según si se evalúa una hembra o un macho (véase Figura 3).

Tabla 1. Número cromosómico obtenido para cada organismo, XX para hembra y XY para macho.

Sexo	Número Ejemplares	Número cromosómico	Cromosomas Sexuales
Macho	13	50	XY
Hembra	12	50	XX



a.



b.

Figura 1. Mitosis $2n=50$ de linfocitos de sangre periférica de una hembra (a) y un macho (b) de *Bubalus bubalis* con tinción convencional Giemsa.

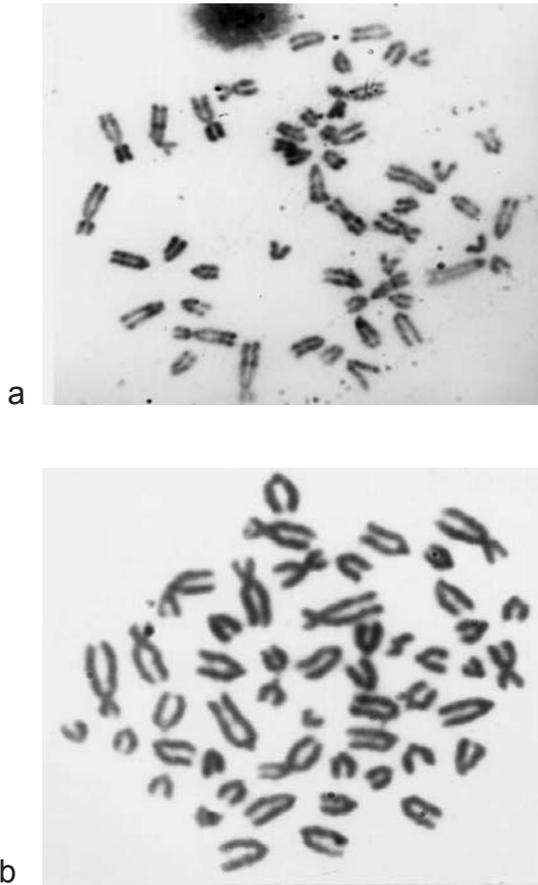


Figura 2. Metafase $2n=50$ de una hembra (a) y un macho (b) de *Bubalus bubalis* con bandas R-replicativas donde se visualizan los cromosomas X.

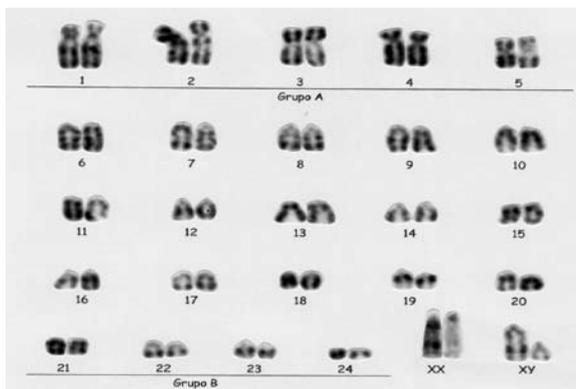


Figura 3. Cariotipo de *Bubalus bubalis* con bandas R-replicativas en el que se muestran los 24 pares homólogos de cromosomas autosómicos y los pares sexuales XX y XY.

El cromosoma Y del macho de *Bubalus bubalis* es uno de los más pequeños del genoma y se muestra totalmente pálido. Uno de los cromosoma X de la hembra al igual que la mayoría de los mamíferos es de duplicación tardía por lo cual se considera inactivo.

Discusión

Los ejemplares evaluados muestran un número diploide $2n=50$, El cromosoma X es particularmente interesante por su carácter subtlocéntrico, lo cual es poco común en mamíferos donde por lo general se presenta como submetacéntrico. Comprende el 5,93% del genoma y cumple la hipótesis de Lyon, (8) la cual se refiere al proceso de inactivación, observado en uno de los cromosomas X de hembras de mamíferos.

El cromosoma Y por su parte constituye el 2.69%, es uno de los más pequeños del genoma y se replica tardíamente, lo cual se evidencia en su carácter pálido obtenido por la técnica de bandas R-replicativas.

Basado en el número obtenido, se puede deducir que los bufalinos poseen un número fundamental semejante a los bovinos, lo que permite sugerir que ambos grupos tienen un ancestro común. Sin embargo, el hecho de poseer 5 pares de cromosomas, entre acrocéntricos, metacéntrico y submetacéntricos, refleja los reordenamientos cromosómicos sufridos entre las dos especies, lo que mostraría una divergencia a nivel cromosómico entre éstas. De otro lado, el hecho de poseer un cromosoma X subtlocéntrico, permitirá plantear que para un ancestro común de bufalinos y bovinos ha podido existir un X como el del búfalo que sufrió una fusión robertsoniana para formar el cromosoma X actualmente encontrado en bovinos o uno, como el de bovinos, que sufrió fisión robertsoniana para originar al bufalino.

El índice mitótico promedio obtenido fue de 1.7, similar a lo encontrado en otras especies de mamíferos como el género *Agouti* (13). De otro lado, el patrón de bandas R-replicativo observado muestra que la mayoría de los cromosomas tienen regiones oscuras y claras en proporciones similares, lo que refleja la gran cantidad de cromatina genéticamente activa.

En conclusión, se encontró la dotación cromosómica única de $2n=50$ reportada para búfalo de río (*Bubalus bubalis*) en el núcleo de búfalos de Fredonia, lo cual evidencia la ausencia de híbridos de dos especies de búfalos presumiblemente traídas a nuestro país.

Uno de los cromosomas X de las hembras de búfalo muestra inactivación similar a los X de otras hembras de mamífero, un número fundamental

semejante al de bovinos, pero muestra divergencia cromosómica con ellos cuando se evalúan a través de bandas R-replicas.

Sería muy interesante realizar estudios filogenéticos en búfalos usando el cariotipo conocido, pero con otras bandas tales como C, NOR, G_{11} , las cuales permiten estudiar los posibles reordenamientos cromosómicos ocurridos en este genoma.

Summary

Cariotypic evaluation of buffalos in a farm in Fredonia, Antioquia, Colombia

*Buffalos are an excellent alternative for milk and meat production as well as for efficient traction. The cytogenetic characterization of buffalos was made by the R-replicative bands system, to determine the chromosomal number and classify the animals as river buffalo or mud buffalo. We were also interested in the possible presence of hybrids since this could be an obstacle to improve breeding and reproduction programs. Twentyfive animals (13 males and 12 females) were sampled. Peripheral blood lymphocytes were cultured out of each one of the individuals and were stimulated with phytohemagglutinin, with a terminal pulse of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd) to obtain extended chromosomal and R-replicative bands. The cytogenetic analysis of each sample revealed a diploid number of $2n=50$, which classifies the animals as river buffalos (*Bubalus bubalis*). The ordering of the homologue chromosomes allowed the classification according to the international nomenclature as follows: 1 acrocentric pair, 3 submetacentric pairs, 1 metacentric pair and 19 subtelocentric pairs including sexual chromosomes X and Y. The total number of chromosomes, ordered from the largest to the smallest, were distributed in 3 groups: group A and B, autosomic and the sexual pair. No hybrids were observed in this study.*

Key words: *Bubalus bubalis, Buffaloes, chromosomes, cytogenetic analysis.*

Referencias

1. Camargo M, Cervenka J. Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes: I. Evaluation and application of methotrexate block. *Human Genetics* 1980;54:47-53.
2. Di Berardino D, Iannuzzi L. Detailed description of RBA-banded chromosomes of river buffalo (*Bubalus bubalis* L). *Génét Sél Evol* 1984;16:249-260.
3. Fischer H, Ulbrich F. Chromosomes of the Murrah buffalo and its crossbreeds with Asiatic Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Z Tierz Zuchtgs Biol* 1968;84:110-114.
4. George W, Weir B. The biology of hystricomorph rodents: hystricomorph chromosomes. In: *Symposium of the Zoological Society of London* 1974; 34:79-108.
5. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. *Cytogenet Cell Genet* 1978;21:309-404.
6. Di Berardino D, Hayes H, Fries R, Long S. International system for cytogenetic nomenclature of domestic animals. 2nd. International Conference on Standardization of Domestic Animal Karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:65-70.
7. López JB, Márquez ME, Hoyos D. Cariotipo citogenético de la guagua (*Agouti paca*). *Rev Fac Nal Agr Med* 1997; 50:5-18.
8. Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet* 1962;14:135-140.

9. Galindo WF, Nguyen VT. Estudio del comportamiento de vacas y búfalas gestantes en la extracción de jugo de caña. *Livest Res Rural Develop* 1996;8:20-25.
10. Gurung K, Singh R. Field guide to the mammals of the Indian subcontinent. London: Academic Press; 1996.
11. Gray A. Mammalian hybrids. London: Commonwealth Agriculture Bureaux; 1971, 126 p.
12. Mac Donald D. Wild cattle and spiral-horned antelope. En: Bateman G, Allan T, Salad M, eds. *The new encyclopedia of mammals*. New York: Oxford University Press; 2001.
13. Ramírez LA. Caracterización citogenética en linfocitos de sangre periférica de *Agouti taczanowskii*. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín; 2000; 70p