



Archivos de Zootecnia

Journal website: <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/>

Caracterización de parámetros reproductivos y endocrinos en una población de conejas ibicencas

Formoso-Raferty, N.¹; García-García, R.M.¹; Rodríguez, M.²; Alonso, A.²; Masdeu, M.¹; Millán, P.¹; Arias-Álvarez, M.¹; Lorenzo, P.L.¹ y Rebollar, P.G.²

¹Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

²Escuela técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Agroambiental y de Biosistemas. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. España.

RESUMEN

El conejo ibicenco o *conill pagès d'Eivissa* es una población originaria de esta isla que actualmente presenta un escaso número de efectivos, ya que está siendo desplazada por otras razas con mayores rendimientos productivos. La conservación de este tipo de poblaciones precisa de la creación de bancos de germoplasma, con lo que es necesario establecer primeramente sus características reproductivas. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar algunos parámetros reproductivos de hembras ibicencas y compararlos con el cruce comercial de California x Neozelandés blanco, que es el habitualmente utilizado en cunicultura para producción. La fertilidad obtenida fue similar en ambos grupos, siendo de un 76,8% y de un 81,3% para las conejas híbridas e ibicencas, respectivamente. La prolificidad, el peso de la camada a 21 días de vida, la producción de leche, el número de gazapos destetados, el peso de la camada al destete y su ganancia media diaria fue superior en los cruces comerciales que en la población ibicenca, presentando ésta última una mayor duración de la gestación y un mayor peso individual al destete. Los ibicencos tardaron un par de días más en alcanzar el peso de sacrificio que los híbridos comerciales, puesto que su ganancia media diaria fue menor y el índice de conversión fue siempre superior, salvo en la última semana que disminuyó y se equiparó al de los híbridos. Respecto a los parámetros endocrinos, tanto las concentraciones de LH como las de progesterona post-ovulación fueron superiores para las hembras híbridas comerciales. Finalmente, los datos de caracterización de la respuesta ovárica muestran que las hembras de cruce comercial presentaron un mayor número de folículos preovulatorios y de oocitos por ovario, así como un mayor número de cuerpos lúteos y embriones recuperados, que presentaron además una mayor velocidad de desarrollo embrionario, que las ibicencas. Por tanto, se ha comprobado experimentalmente que el conejo ibicenco, al ser una especie rústica, no seleccionada, presenta características reproductivas menos mejoradas que las de los cruces comerciales, si bien sigue siendo importante su conservación desde el punto de vista del mantenimiento de la biodiversidad genética.

Reproductive and endocrine characterization of Ibicean rabbit breed

SUMMARY

The Ibicean rabbit, also known as *conill pagès d'Eivissa*, is a native breed with very few remaining individuals, because it has been replaced by other more productive breeds. The conservation of this population requires the creation of some germplasm banks, which is necessary to establish their reproductive characteristics. Therefore, the aim of this research was to define some reproductive parameters of female Ibicean rabbits. We also compare them to California x New Zealand commercial crossbred white rabbit does, which are more commonly used in rabbit production. Fertility was similar between groups, being 76.8% and 81.3% in crossbred and Ibicean rabbit does respectively, respectively ($p > 0.05$). Total newborn, born alive, stillborn, litter weight at 21 days of life, milk production, number of weaned rabbits, litter weight at weaning and average daily gain of the litter were higher in California x New Zealand crossbred rabbits than in the Ibicean rabbits. In contrast, gestation in Ibicean does was longer and their individual weaning weight was higher. It took a few days more for the Ibicean rabbits to achieve their slaughter weight than for the crossbred ones, since their average daily gain was lower and their conversion rate was always higher, except for the last week, when conversion rates decreased and were similar to that of the crossbred individuals. Regarding endocrine parameters, both LH and progesterone concentrations post-ovulation were higher in the crossbred females. Finally, the ovarian response data showed crossbred females have a greater number of preovulatory follicles and oocytes per ovary and also a greater number of recovered embryos and corpora lutea, with a greater embryonic development than in the case of the Ibicean females. Therefore, it has been experimentally shown that the rabbit from Ibiza, which is a non-selected rare breed, has less improved reproductive characteristics than commercial rabbits. However, it is very important to preserve this breed from the point of view of maintaining genetic biodiversity.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Conejo Ibicenco.
Producción.
Reproducción.
LH.
Progesterona.

ADDITIONAL KEYWORDS

Ibicean rabbit.
Production.
Reproduction.
LH.
Progesterone.

INFORMACIÓN

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 30.09.2015
Aceptado/Accepted: 16.03.2016
On-line: 15.10.2016
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
pilar.grebollar@upm.es

INTRODUCCIÓN

El conejo ibicenco (*conill pagès d'Eivissa*) es una población endémica de origen incierto, descrita desde hace siglos en la isla de Ibiza. Actualmente presenta un escaso número de efectivos, no más de 200-250 animales, debido a que ha sido desplazada por otras razas con mayores rendimientos productivos y por lo tanto, más interesantes comercialmente por su aptitud cárnica como es el caso de la raza Californiana, Neozelandesa blanca y sus cruces. El diseño del programa de conservación de la población de conejo ibicenco incluye: a) la caracterización reproductiva, b) el análisis de la estructura genética de la población mediante la creación y estudio de su libro genealógico, y c) el análisis de su productividad, así como de la calidad de la canal y de la carne en busca de un nicho comercial (Martín de la Rosa *et al.*, 2013). Debido a la ausencia de datos sobre la caracterización productiva y reproductiva de esta población, sólo se han realizado valoraciones y selecciones genéticas en función de sus caracteres morfológicos (Payeras, 2009) que son los de un animal con un aspecto general elegante, ligero, fuerte y muy equilibrado. Su talla es mediana, con un peso de 3,1 a 4,2 kg en los machos y de 3 a 3,7 kg en las hembras, siendo éstas algo menos pesadas (250 g menos que los machos de promedio). Su capa presenta la peculiaridad de tener fijado el gen Dutch que fenotípicamente da lugar a un collar, perfil de la cabeza, hocico y extremos de las patas anteriores de color blanco. El resto de la capa puede ser negro, gris o marrón con matices de intensidad. Este animal presenta un gran interés por su rusticidad, que es una de las mayores ventajas para su cría, puesto que durante todos estos años se ha ido adaptando a las condiciones ambientales de las Islas pudiendo ser más resistente a enfermedades (<http://www.caib.es/sacmicrofront/contenido.do?idsite=173&cont=4086>) y también por la calidad de su carne, que hace que sea muy apreciada como plato local en las Islas Baleares (López y Sierra, 1998).

Dado que el conocimiento de las características reproductivas es muy importante para el inicio de cualquier estrategia reproductora destinada a la conservación *ex situ* de material genético, el objetivo principal de este estudio ha sido: 1) caracterizar los parámetros productivos (fertilidad y prolificidad, crecimiento y supervivencia de la camada desde el nacimiento hasta el periodo de cebo) y 2) caracterizar los parámetros reproductivos (morfometría de los órganos reproductivos, perfiles endocrinos de LH y progesterona, respuesta ovulatoria y de producción de embriones) de una población de conejos ibicencos, comparándola con otra población de conejos de cruce Californiano x Neozelandés blanco alojadas ambas en condiciones comerciales similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el estudio se llevó a cabo en la granja experimental de la Escuela técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) conforme al Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la pro-

tección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia y de acuerdo con las Directivas de la Comunidad Europea sobre esta materia (BOE, 2013).

Los parámetros ambientales se controlaron mediante un sistema automático, asegurando en todo momento un bienestar animal óptimo y un cumplimiento estricto de las normas Europeas relativas a los estudios experimentales: ventilación (15 renovaciones/hora), temperatura (19-25°C), humedad (50±5%) y fotoperiodo constante con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La iluminación se consiguió mediante luminarias de fluorescentes de 40W colocadas en la parte superior de la nave longitudinalmente sobre las líneas de jaulas donde los animales estaban alojados individualmente. todos los animales se alimentaron con un pienso comercial *ad libitum* adecuado a su edad y estado fisiológico (2400 kcal energía digestible/kg, 36% fibra neutro detergente, 3% extracto etéreo y 16% proteína bruta); así mismo, también dispusieron de agua *ad libitum*.

CARACTERIZACIÓN PRODUCTIVA

El estudio productivo se realizó con una población seleccionada genéticamente, en función de sus caracteres morfológicos conociendo además su *pedigree*, compuesta por 24 conejos ibicencos (16 hembras y 8 machos) y 78 híbridos de California x Neozelandés blanco (72 hembras y 6 machos). Los conejos ibicencos procedían de una explotación alojada en la población de Santa Eularia des Riu, localizada en la isla de Ibiza. Los híbridos, de una granja multiplicadora de la provincia de Ávila que provee de reproductoras de dos líneas genéticas seleccionadas por la Universidad Politécnica de Valencia. En el momento de iniciar el trabajo, todas las conejas eran multíparas con un año de edad y con un mínimo de 2 partos, adaptadas a las condiciones ambientales durante al menos 6 meses en las instalaciones de la granja experimental de la UPM. Para realizar este estudio, se planificaron apareamientos dirigidos en las conejas ibicencas, evitando aquellos con alta consanguinidad y favoreciendo los que contribuían a cumplir con el estándar racial durante un periodo de 6 meses. Las conejas de ambos grupos se inseminaron con dosis seminales de machos de la raza correspondiente que nunca superaron los 20 millones de espermatozoides en 0,5 ml de un diluyente comercial (CUDIL, Magapor SA, España). Para inducir la ovulación, se les administraron 20 µg de gonadorelina (Inducel-GnRH; Lab. Ovejero, España). El diagnóstico de gestación se realizó el día 11 post-cubrición mediante la palpación abdominal de las hembras inseminadas. Antes del parto, se confirmó dicho diagnóstico y se les proporcionó nidos y viruta prensada como cama.

Se determinó la fertilidad media (porcentaje de hembras gestantes respecto a las hembras inseminadas) y la duración de la gestación. Al nacimiento, se valoró la prolificidad (número de gazapos nacidos vivos, muertos, totales y destetados de cada coneja), el peso individual y de la camada. En el caso de las conejas híbridas se realizó el ajuste de las camadas, de tal manera que éstas tuvieran entre 8 y 10 gazapos cada una, no siendo necesario este ajuste en las conejas ibicencas.

Durante las dos primeras semanas de lactación se estimó la producción de leche pesando a la madre antes y después de mamar a primera hora de la mañana el día 7 y 14 de lactación, cerrando el nido desde la tarde del día anterior. La 3ª semana se estimó la producción total de leche (PL) pesando las camadas a los 21 días de lactación (PC_{21}) después de mamar y se aplicó la ecuación de De Blas *et al.* (1995): $PL (g) = 0,75 (\pm 0,33) + 1,75 (0,11) PC_{21}$. Además se determinó el consumo de pienso semanal, así como el peso para el cálculo de su ganancia media diaria (GMD). La mortalidad en lactación se calculó dividiendo el número de gazapos muertos al destete (30 días de edad) entre el número de gazapos ajustados en híbridas, según lo descrito, o de vivos a parto en ibicencas, multiplicado por 100.

Durante el cebo, para evitar el efecto camada en los datos productivos de crecimiento, un total de 40 gazapos de cada población se distribuyeron al azar en 8 jaulas (5 gazapos de distinta camada/jaula). Durante este periodo, se realizaron controles semanales de consumo y del peso individual de cada conejo hasta los 58 días de edad. Se calculó la GMD y el índice de conversión (IC: kg de pienso consumido/kg de incremento de peso) semanal de cada jaula (**figura 1**).

CARACTERIZACIÓN REPRODUCTIVA

En este estudio se utilizaron, hembras nulíparas para establecer parámetros reproductivos básicos de la especie como son la longitud de los cuernos uterinos, el peso y dimensiones de ambos ovarios, el número de folículos hemorrágicos y de folículos $\geq 1mm$ de diámetro presentes en los ovarios. Para ello se emplearon 5 hembras ibicencas de 4 meses de edad que habían sido desechadas como hembras reproductoras debido a que fenotípicamente estaban alejadas del estándar racial morfológico, y 6 conejas del híbrido comercial de la misma edad para realizar la comparación entre ellas. Se sacrificaron con una sobredosis de barbitúricos vía endovenosa (30mg/kg de pentotal; Dolethal, Lab. Vetoquinol, España), y tras una laparotomía media ventral se recuperó el tracto reproductivo y se procedió

a realizar las medidas anteriormente mencionadas mediante una cinta medidora y un calíper. Los ovarios se recogieron en un tampón fosfato (PBS: phosphate buffered saline) atemperado para la recuperación de oocitos mediante la aspiración bajo microscopio estereoscópico de folículos $\geq 1mm$ de la superficie del ovario, tamaño folicular apto para ovular en la coneja, con una aguja de 21G. Se clasificaron un total de 99 y 149 oocitos obtenidos de los ovarios de las conejas ibicencas e híbridas respectivamente, de acuerdo a Lorenzo *et al.* (1996), considerándose oocitos viables para el proceso de maduración *in vitro* a aquellos que presentaban un citoplasma homogéneo y numerosas capas de células de la granulosa.

Por otro lado, se analizaron las concentraciones plasmáticas de hormona luteinizante (LH) y progesterona, la tasa de ovulación y la producción de embriones en 6 conejas ibicencas y 6 híbridas, después de ser inseminadas de manera similar a la descrita previamente. Se obtuvieron muestras seriadas de sangre de la arteria central de la oreja, a la misma hora de la mañana para evitar variaciones circadianas. Para las determinaciones hormonales de LH se tomaron un total de 6 muestras de sangre a: -30, 0, 30, 60, 90 y 120 minutos desde la inducción de ovulación con GnRH (momento 0). En el caso de la progesterona se tomaron muestras: a -30 minutos y 5 días post-inseminación de todos los animales (**figura 2**). Cada muestra de sangre se recogió en tubos no heparinizados, se centrifugaron a 700g durante 10 minutos a 4°C para obtener el suero, y se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis. La LH sérica se analizó utilizando un enzoinmunoanálisis (ELISA) de competición desarrollado específicamente para esta especie (Rebollar *et al.*, 2012). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron siempre inferiores a 5,9 y 9,1% respectivamente. Las concentraciones de progesterona en suero se analizaron utilizando un kit comercial (ELISA de progesterona, Demeditec Diagnostics GmbH, Alemania) basado en el principio de unión competitiva. Previamente, las muestras de plasma se extrajeron con éter de pe-

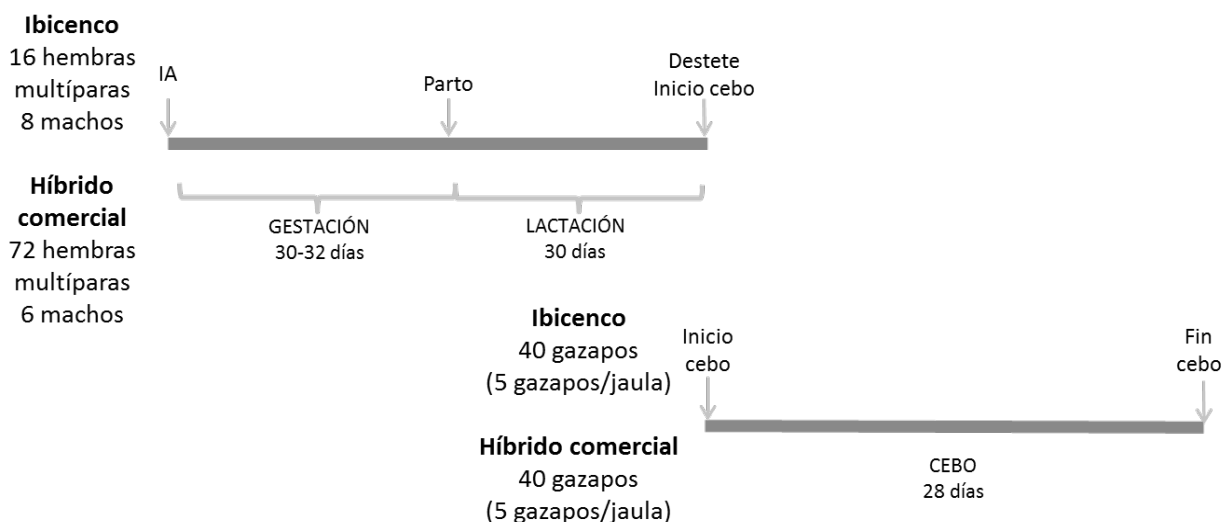


Figura 1. Esquema del diseño experimental para la caracterización de los parámetros productivos de conejas ibicencas e híbridas comerciales (California x Neozelánés) (Experimental design for the productive characterization of Ibicean and crossbred (Californian x New Zealand) females).

tróleo, con una eficiencia de extracción del 85%. La sensibilidad fue de 0,045 ng/ml y los coeficientes inter e intra-ensayo de variación fueron 5,5% y 6,9% respectivamente. Las absorbancias se midieron en un lector de placas automático (Epoch™ Espectrofotómetro de microplacas, Bio-Tek Instruments, USA) y se transformaron en concentraciones, utilizando un software desarrollado para estas técnicas (Gen5™ ELISA, Bio-Tek Instruments, USA), refiriendo dichos valores a la curva estándar ajustada.

Para estudiar la tasa de ovulación y producción de embriones, las conejas se sacrificaron el día 5 post-inseminación con una sobredosis de barbitúricos (30mg/kg de pentotal; Dolethal, Lab, Vetoquinol, España). Se les practicó una laparotomía media ventral, se recogieron los ovarios en PBS a 37°C y se determinó la tasa de ovulación, contando los cuerpos lúteos en la superficie ovárica y calculando el porcentaje de conejas ovuladas con respecto a las inseminadas. Posteriormente, se recuperó también el tracto reproductor y se realizó un lavado oviductal con una aguja de 21G conectada a una jeringa de 10 ml que contenía PBS suplementado con 0,1% de BSA a 37°C. El fluido de lavado se depositó en una placa Petri sobre una pletina térmica (Minitub, tiefenbach, Alemania) a 37°C para proceder a la valoración y recuento de los embriones con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-800, Tokio, Japón). La tasa de recuperación embrionaria se calculó como el porcentaje de embriones recuperados con respecto al número de cuerpos lúteos contados en la superficie del ovario. En el momento de la recogida, los embriones fueron clasificados en las siguientes categorías: viable (blastocisto o blastocisto expandido) o no viable (embriones cuyo estadio en el momento de la recuperación no era acorde con el tiempo transcurrido desde la ovulación, como cigotos, embriones de 2 a 16 células y mórulas, incluyendo también los oocitos no fecundados y degenerados). Los porcentajes de dichas categorías se dieron respecto al total de estructuras recuperadas tras el lavado del tracto reproductor. Los diferentes estadios embrionarios observados se definieron basándose en los criterios morfológicos convencionales establecidos por la Sociedad Internacional de transferencia de Embriones (IETS).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar estadísticamente los resultados se utilizó el software SAS (SAS Institute Inc., 1990). Los parámetros productivos prolificidad y producción de leche, las concentraciones plasmáticas de LH y progesterona, así como los pesos de las conejas y las camadas, la GMD y el IC se analizaron con un modelo de medidas repetidas con la coneja como efecto fijo considerando la raza, el tiempo y su interacción como efectos principales. La duración de la gestación y los parámetros de caracterización reproductiva (peso y longitud de ovarios/cuernos, número de folículos, cuerpos lúteos y hemorrágicos y producción de oocitos viables), se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía considerando la raza como efecto principal. Las medias obtenidas se compararon usando el test LSD con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$). La fertilidad, las tasas de ovulación y recuperación, y los porcentajes

de embriones viables de ambos grupos se compararon con un test χ^2 .

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN PRODUCTIVA

La fertilidad obtenida tras la inseminación fue adecuada para ambos grupos, ya que un 76,8% y un 81,3% de las híbridas e ibicencas inseminadas, respectivamente, quedaron preñadas. La duración de la gestación en las conejas ibicencas fue significativamente superior a la de las híbridas ($32,0 \pm 0,20$ vs. $30,7 \pm 0,13$ días; $p < 0,001$). En la **tabla I** se muestran los resultados obtenidos de prolificidad, mortalidad en lactación y producción de leche de los grupos experimentales. Las conejas ibicencas parieron menos gazapos de media que el híbrido comercial ($p < 0,001$). En ambos grupos de conejas se dieron casos de tamaños de camada a nacimiento de un solo gazapo, aunque el máximo en las ibicencas fue de 8 y en las híbridas fue de 14, no observándose diferencias en la mortalidad al nacimiento ($p > 0,05$) ni durante la lactación ($p > 0,05$). Las híbridas destetaron alrededor de 5 gazapos más de media ($p < 0,001$) y la estimación de su producción de leche también fue superior a la de las ibicencas ($p < 0,001$).

Tabla I. Prolificidad, número de destetados, mortalidad en lactación y producción de leche de conejas ibicencas e híbridas (Californiana x Neozelanesa). Los datos se muestran como medias \pm error estándar de la media (Prolificity, number of weaned rabbits, mortality during lactation and milk production of Ibicean and crossbred (Californian x New Zealand) crossbred females. Results are shown as means \pm standard error).

	Ibicencas	Híbridas	p>f
Nº camadas	13	55	-
Nacimiento			
Totales (n)	3,6 \pm 0,56	9,4 \pm 0,25	0,001
Vivos (n)	3,5 \pm 0,55	9,0 \pm 0,25	0,001
Muertos (n)	0,2 \pm 0,16	0,4 \pm 0,07	0,185
Lactación			
Destetados (n)	3,4 \pm 0,55	8,7 \pm 0,27	0,001
Mortalidad ¹ (%)	4,5 \pm 3,02	9,4 \pm 1,01	0,132
Producción leche (g)			
Día 7 ²	91,3 \pm 26,3	259 \pm 11,9	0,001
Día 14 ²	120 \pm 26,3	311 \pm 14,9	0,001
Total ³	3185 \pm 383,8	8097 \pm 171,6	0,001

¹Número de gazapos muertos al destete (30 días de edad) entre el número de gazapos ajustados al nacimiento en híbridas o de vivos a parto en ibicencas, multiplicado por 100. ² Estimada pesando a la madre antes y después de mamar. ³ Estimada con el Peso de la camada a 21 días (PC₂₁), según De Blas *et al.* (1995): PL (g) = 0,75 (\pm 0,33) + 1,75 (0,11) PC₂₁

En la **figura 3** se muestran los parámetros productivos obtenidos desde el parto hasta el destete. Las camadas de las híbridas fueron más pesadas que las de las ibicencas ($p < 0,05$; **figura 3A**) pero el peso medio de los gazapos ibicencos (**figura 3B**) a la 3ª semana

tendió a ser mayor que el de los híbridos ($412 \pm 6,8$ vs. $384 \pm 6,8$ g, respectivamente; $p=0,10$) y a la 4ª semana la diferencia fue estadísticamente significativa ($822 \pm 15,2$ vs. $758 \pm 8,3$ g; $p<0,05$). Las madres lactantes híbridas y sus gazapos consumieron más pienso ($p<0,05$; figura 3C) y la GMD de sus camadas fue superior a la de las ibicencas ($p<0,05$; figura 3D).

El peso de los gazapos ibicencos al destete fue más alto que el de los híbridos ($p<0,05$; figura 4A), sin embargo, tras la primera semana de cebo el peso de ambas razas se equiparó y a partir de la segunda semana, el peso de los híbridos pasó a ser significativamente superior ($p<0,001$). Los ibicencos tardarían un par de días más en alcanzar el peso de sacrificio de los híbridos. El consumo de pienso fue aumentando de manera similar en ambos grupos salvo en la última semana, en la cual descende, sobre todo en los ibicencos ($p<0,001$; figura 4B). La GMD de los gazapos con la jaula como unidad experimental fue superior en los híbridos durante todo el cebo ($p<0,001$; figura 4C) y respecto al IC, éste fue siempre superior en ibicencos ($p<0,001$; figura 4D), salvo en la última semana que disminuyó y se equiparó al de los híbridos ($p>0,05$). La mortalidad durante el cebo fue nula en ambas poblaciones.

Tabla II. Parámetros ováricos y uterinos de conejas ibicencas e híbridas (California x Neozelandés) de 4 meses de edad. Los datos se muestran como medias \pm error estándar de la media (Ovarian and uterus parameters of Ibicean and hybrid (Californian x New Zealand) females 4 months old. Results are shown as means \pm standard error).

	Ibicencas	Híbridas	p>f
n	5	6	
Peso ovario (mg)	199 \pm 16,5	202 \pm 22,4	0,910
Longitud ovario (mm)	13,1 \pm 0,73	14,0 \pm 1,15	0,497
Ancho ovario (mm)	5,6 \pm 0,24	5,3 \pm 0,25	0,356
Longitud cuernos uterinos (mm)	59,7 \pm 3,44	76,0 \pm 8,20	0,087
Folículos \geq 1mm/ ovario	5,0 \pm 0,35	7,6 \pm 1,03	0,033
Folículos hemorrágicos	1,1 \pm 1,10	0,0 \pm 0,00	0,407
Oocitos seleccionados morfológicamente (%)	62,1 \pm 4,87	44,4 \pm 4,05	0,006

CARACTERIZACIÓN REPRODUCTIVA

Las características ováricas y uterinas de las conejas se muestran en la **tabla II**. El peso y dimensiones de los ovarios fueron similares en ambos grupos ($p>0,05$), pero la longitud de los cuernos uterinos tendió a ser menor en las conejas ibicencas ($p=0,087$). Los ovarios de las conejas híbridas presentaron un número superior de folículos \geq 1mm ($p<0,033$) y un número similar de folículos hemorrágicos ($p>0,05$). tras la aspiración folicular se obtuvieron un mayor número de oocitos por ovario en las conejas híbridas (12,3 vs. 10,3 oocitos) aunque la viabilidad de éstos fue significativamente mayor en las ibicencas ($p=0,006$).

RESPUESTA ENDOCRINA, OVULATORIA Y DE PRODUCCIÓN EMBRIONARIA

A los 5 días post-inseminación, el 100% de las conejas presentaban cuerpos lúteos en los dos grupos. tal y como muestra la **figura 5A**, las concentraciones plasmáticas de LH obtenidas fueron muy parecidas en ambos grupos, salvo a los 30 minutos de la inducción de la ovulación, en los que se observó una tendencia a que las híbridas presentasen un pico de LH ligeramente superior ($p=0,08$). Este aumento se estabilizó a los 60 y 90 minutos, reduciéndose paulatinamente a los 120 minutos. En la **figura 5B** se muestra el perfil de las concentraciones de progesterona determinadas en las conejas antes (día 0) y 5 días después de la ovulación. Los niveles de progesterona fueron similares en los dos grupos antes de la inducción de la ovulación. Después se incrementaron en la fase post-ovulatoria, si bien las híbridas presentaron concentraciones significativamente mayores que las ibicencas a día 5 post-inseminación ($p<0,05$).

Las conejas híbridas presentaron una media superior de cuerpos lúteos que las ibicencas ($p<0,001$, **tabla III**). Se recuperó un porcentaje cercano al 80% del total de embriones en los dos grupos ($p>0,05$), por lo que el total de embriones recuperados por coneja en las híbridas siguió siendo mayor que en las ibicencas ($p=0,005$). tras la clasificación de los embriones, el porcentaje de blastocistos ($p=0,08$) y blastocistos expandidos ($p<0,001$) fue mayor en híbridas que en ibicencas, encontrándose sin embargo un porcentaje muy superior de embriones no viables (retrasados y degenerados) en las conejas ibicencas ($p<0,001$).

Ibicenco

6 hembras nulíparas

Híbrido comercial

6 hembras nulíparas



Figura 2. Esquema del diseño experimental para la caracterización de los parámetros reproductivos de conejas ibicencas e híbridas comerciales (California x Neozelandés) (Experimental design for the reproductive characterization of Ibicean and crossbred (Californian x New Zealand) females).

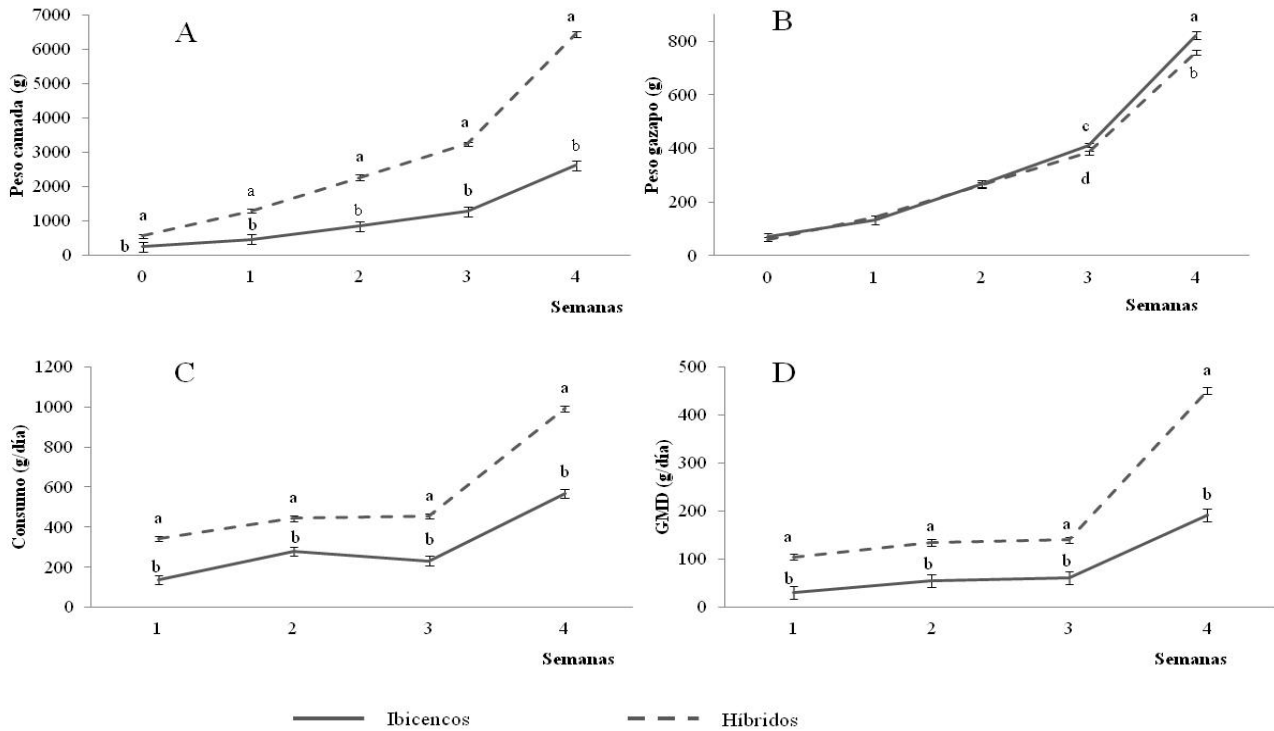


Figura 3. Parámetros productivos durante la lactación de conejas ibicencas e híbridas (California x Neozelandés): (A) Peso camada, (B) Peso medio del gazapo, (C) Consumo de madres y gazapos y (D) Ganancia Media Diaria (GMD) de gazapos. (a,b): $p < 0,05$ y (c,d): $p = 0,10$ entre grupos (Productive parameters during lactation of Ibicean and crossbred (Californian x New Zealand) female: (A) Litter weight, (B) newborn middle weight, (C) feed intake of the female and litter and (D) average daily gain of the litter (GMD).

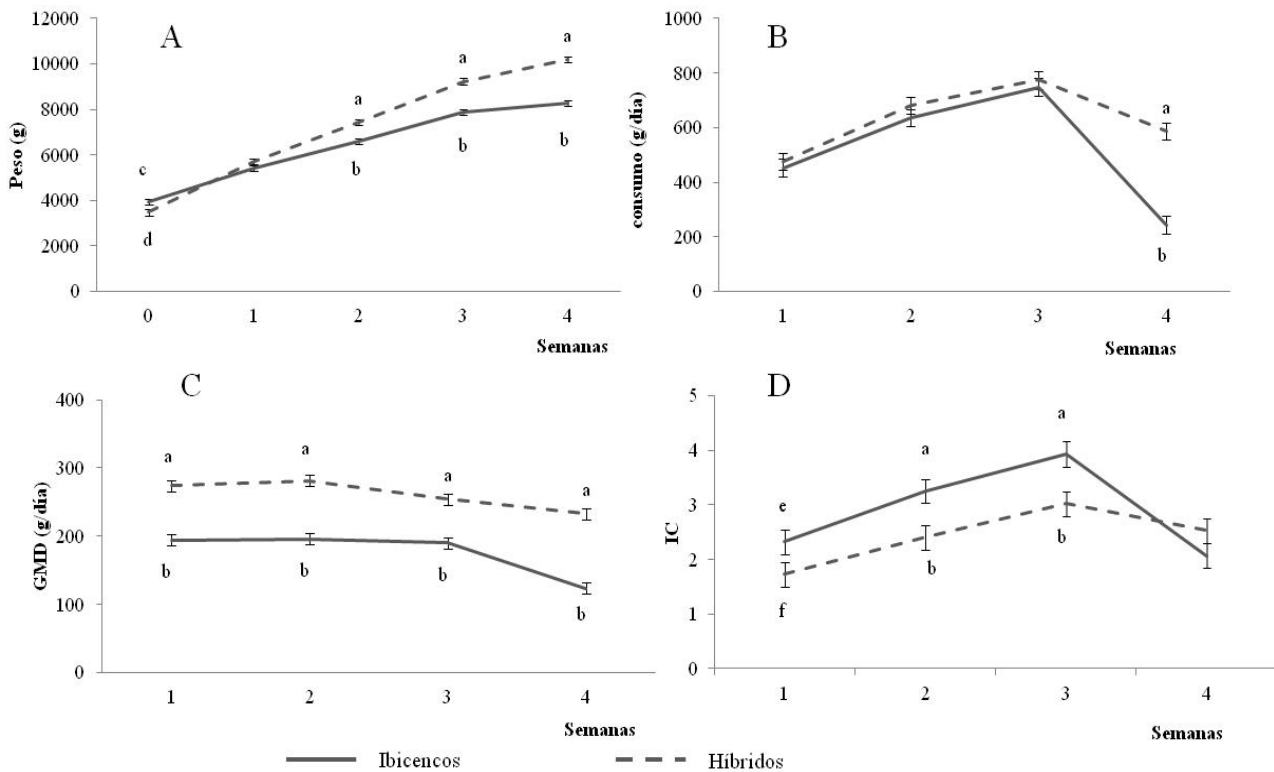


Figura 4. Parámetros productivos durante el periodo de cebo: (A) Peso, (B) Consumo, (C) Ganancia media diaria (GMD) y (D) Índice de conversión (IC) por jaula de gazapos (5 gazapos/jaula) de conejas ibicencas e híbridas (California x Neozelandés). (a,b): $p < 0,001$, (c,d): $p < 0,05$ y (e,f): $p = 0,0679$ entre grupos (Productive parameters during the fattening period: (A) Weight, (B) feed intake, (C) Average daily gain (GMD) and (D) Conversion rate (IC) per cage (5 rabbits/cage) of Ibicean and crossbred (Californian x New Zealand) females. (a,b): $p < 0,001$, (c,d): $p < 0,05$ y (e,f): $p = 0,0679$ between groups).

Tabla III. Parámetros ováricos y embrionarios de conejas de 4 meses de edad ibicencas e híbridas (Californian x Neozelandés) a los 5 días tras la inducción de la ovulación (20µg gonadorelina) e inseminación. Los datos se muestran como medias ± error estándar de la media (Ovarian and embryo parameters of Ibicean and hybrid (California x New Zealand) females 4 months old at 5 days after ovulation induction (20µg gonadorelin) and insemination. Results are shown as means ± standard error).

	Ibicencas	Híbridas	p>f
n	6	6	
Cuerpos lúteos (n)	9,5 ± 0,87	15,5 ± 0,87	0,001
Tasa de recuperación embrionaria (%)	80,2 ± 5,77	78,1 ± 5,77	0,799
Embriones recuperados (n)	7,7 ± 0,85	12,0 ± 0,85	0,005
Blastocistos (%)	8,7 ± 5,4	20,8 ± 4,3	0,08
Blastocistos expandidos (%)	36,9 ± 6,5	79,2 ± 6,5	0,001
Embriones retrasados (%)	30,5 ± 4,3	0,0 ± 3,4	0,001
Embriones degenerados (%)	23,9 ± 4,0	0,0 ± 3,2	0,001

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha pretendido caracterizar los parámetros reproductivos y endocrinos de la coneja ibicenca de la cual no se tenían datos previos. Se ha comparado con el híbrido que se emplea actualmente para la producción de carne.

PARÁMETROS PRODUCTIVOS

Los parámetros productivos en la coneja ibicenca fueron por lo general menores que en la raza comercial. Así por ejemplo, la duración de la gestación fue mayor aunque todas las conejas parieron dentro del intervalo de tiempo normal. La duración media anual de la gestación de las conejas es de 30,9 días, aumentando en los meses de verano a 31,2 (Manchisi *et al.*, 1991). No obstante, se ha demostrado que estos intervalos de

tiempo son más cortos cuanto mayor es el número de fetos debido a la incapacidad por parte del útero de retenerlos en su interior (Manchisi *et al.*, 1991). En este trabajo se demuestra que la menor prolificidad de las conejas ibicencas pudo favorecer que la gestación en ellas durara más.

Respecto a los parámetros al nacimiento de la camada, el peso al nacimiento en la especie cunícola presenta mucha variabilidad dentro de una misma camada, siendo inversamente proporcional al tamaño de la misma (Brever y Claussen, 1977) y de unos 50 g de media (Rebollar *et al.*, 2009). En nuestro estudio, los pesos medios por gazapo fueron similares en ambos grupos y alcanzaron los 60 g de media, lo que supera el peso mínimo de supervivencia estimado en un rango de 40,4 a 44,6 g (García-Ximénez y Vicente, 1991), y corrobora que no se hayan observado diferencias en la tasa de mortalidad al nacimiento. Las hembras híbridas parieron casi 6 gazapos más que las ibicencas haciendo que el peso de la camada fuera superior, pero los gazapos ibicencos nacieron con más peso que los híbridos. La reducción en el peso de los fetos gestados por las conejas híbridas y de sus placentas ocurre porque las implantaciones llegan al límite de capacidad uterina, pudiendo incluso conducir a un nivel incompatible con la supervivencia pre y postnatal. No obstante, en nuestro caso, las conejas híbridas, a pesar de parir camadas más numerosas, presentaron una mortalidad a nacimiento similar a la de las ibicencas.

En relación a los resultados correspondientes al destete, las conejas híbridas presentaron mejores índices en cuanto al número de gazapos destetados y de producción de leche. Sin embargo, la mortalidad en lactación fue similar para ambos grupos, probablemente porque los gazapos lactantes ibicencos, que presentan más peso, son más resistentes a enfermedades y, por tanto, presentan más probabilidad de supervivencia (Poignier *et al.*, 2000). Además, según fortun-Lamothe y

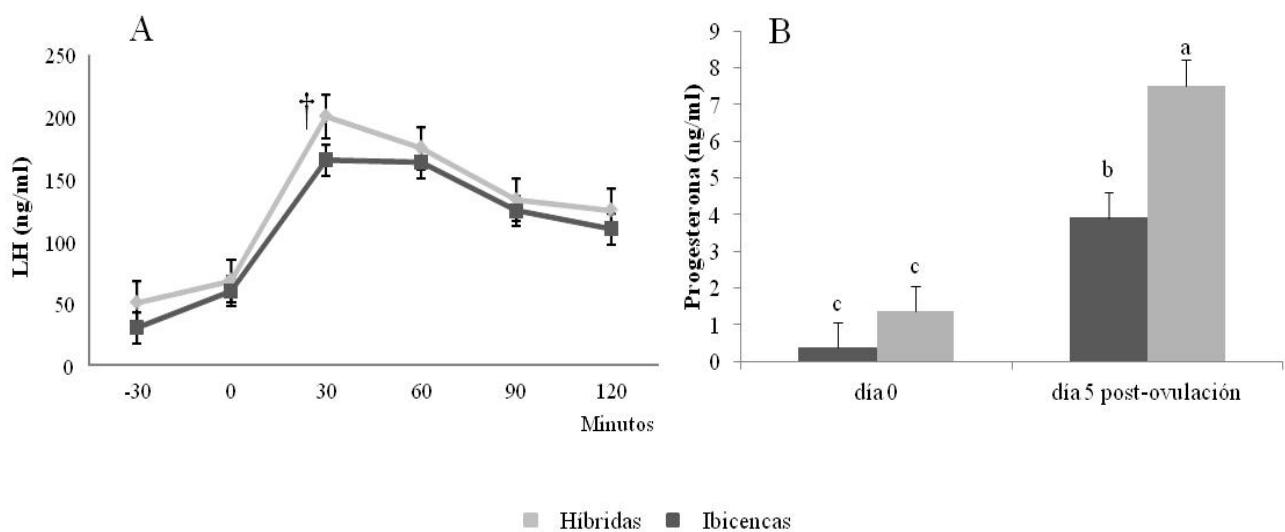


Figura 5. Concentraciones plasmáticas de: (A) LH (ng/ml) y (B) progesterona (ng/ml) tras la inducción de la ovulación (tiempo 0) con 20µg de GnRH i.m. en conejas ibicencas (n=6) e híbridas (California x Neozelandés) (n=6). (†: p=0,08). (a,b,c: p<0,05) entre grupos (Plasma concentrations of: (A) LH (ng/ml) and (B) progesterone (ng/ml) after ovulation induction (time 0) with 20µg of GnRH i.m. in ibicean (n=6) and crossbred (Californian x New Zealand) females (n=6). (†: p=0,08). (a,b,c: p<0,05) between groups.)

Gidenne (2006), el incremento de peso de estos gazapos se debe principalmente a la relativa cantidad de leche que consumen individualmente (alrededor de 360-450 g) y que es extremadamente variable. En las conejas híbridas se ha descrito una producción media de 5913 g de leche por coneja en una lactación para un tamaño de camada de 8 gazapos (De Blas *et al.*, 1995). En nuestro caso, la producción total de leche de las ibicencas fue menor puesto que se estimó con el peso de la camada a 21 días, la cual era de menor tamaño. Además, la cantidad de leche disponible para cada gazapo depende del tamaño de la camada (Lebas, 1975; Poigner *et al.* 2000), por lo que cuanto mayor es el número de gazapos, más elevada es la producción de leche, lo que concuerda con nuestros resultados y con los de McNitt y Lukefahr (1990).

Finalmente, los datos de lactación muestran que las conejas ibicencas y sus camadas, al ser menos numerosas, pesaron menos, siguiendo una evolución paralela tanto en su consumo de pienso como en su GMD a lo largo de la lactación. Esta diferencia se hace aún más marcada a la 4ª semana ya que las híbridas tendrían una capacidad de ingestión mayor y además, cada uno de sus 5 gazapos de más estaría consumiendo una media de 25-30 g/día de pienso (fortun-Lamothe y Gidenne, 2006). La mortalidad de gazapos en el periodo de lactación en las ibicencas fue similar y su peso medio al destete llegó a ser mayor que en las conejas seleccionadas a pesar de que la estimación de la leche que estaban produciendo era inferior. Este incremento de peso medio, se podría deber a que las camadas eran menos numerosas que en las híbridas, disponiendo proporcionalmente de más alimento en un momento en el que el gazapo comienza a salir del nido e ingiere pequeñas cantidades de pienso, que son tanto más elevadas cuanto menos leche produzca la madre (fortun-Lamothe y Gidenne, 2006). Además, en las líneas maternas de aptitud cárnica seleccionadas por tamaño de camada, Rochambeau *et al.* (1994) describen una disminución del peso al destete de los gazapos como resultado de dicha selección.

Los mejores resultados obtenidos a lo largo del periodo de engorde en los conejos híbridos se debieron a que en estas líneas mejoradas la selección se viene realizando por ganancia diaria de peso post-destete (Rochambeau *et al.*, 1989). La capacidad para transformar el pienso en músculo y optimizar el crecimiento de los gazapos, demuestra la eficacia de la selección llevada a cabo en estas líneas sintéticas (Baselga, 2015). La última semana del cebo, se observó un estancamiento del consumo y una reducción del crecimiento que se podría atribuir a una elevada densidad de gazapos en la jaula. Según Muguera *et al.* (2008), densidades de 9 y 10 conejos por jaula (0,4 m² de superficie de suelo), podrían ser las más adecuadas en lo concerniente a peso final alcanzado (2000-2100 g) y edad de sacrificio (56-60 días, en España). Sin embargo, en nuestro caso, alojamos sólo 5 conejos en 0,3 m² por lo que los animales tenían suficiente espacio y acceso al comedero fácil y no competitivo, que no explicaría que no aumentara el consumo a niveles descritos por otros autores (168 g/d; Corrent *et al.*, 2007). No obstante, la morbilidad y la mortalidad de animales en esta prueba fue nula

y este estancamiento del consumo no comprometió la vida de los animales.

PARÁMETROS REPRODUCTIVOS Y RESPUESTA ENDOCRINA

La caracterización de los parámetros ováricos mostró que no hubo diferencias significativas en las dimensiones y peso de los ovarios entre ambas razas. Sin embargo, la longitud del útero fue significativamente menor en las conejas ibicencas, lo que concuerda con el menor tamaño de camada al nacimiento observado en este estudio y descrito anteriormente. Es esperable que el útero presente menor longitud en este caso puesto que tiene que albergar un menor número de fetos, lo que podría atribuirse a que son hembras núlparas de primer parto. Mocé *et al.* (2003) observaron que la capacidad uterina estaba relacionada con la supervivencia embrionaria temprana. No obstante, se ha descrito una menor fertilidad y prolificidad en razas rústicas (como la gris de Bourbonnais; Pilandom *et al.*, 1983) cuando se crían en condiciones de explotación en vez de en su medio natural; de hecho la coneja ibicenca puede alcanzar un número de gazapos de 8-12 en condiciones de crianza en campo (Payeras, 2009).

La raza comercial presentó significativamente mayor número de folículos ≥ 1 mm de diámetro observados en la superficie del ovario y de oocitos recuperados tras aspiración folicular. Estos serían los folículos capaces de ovular en la coneja (Arias-Álvarez *et al.*, 2007), lo que correspondería también con el mayor número de cuerpos lúteos y de embriones recuperados en las conejas híbridas. Además en estas conejas del cruce comercial los embriones son de mejor calidad, ya que presentan una mayor velocidad de desarrollo y menor porcentaje de degeneración (torrès *et al.*, 1987). Esto se acompaña de un perfil endocrino más adecuado para la implantación, ya que la progesterona favorece que se produzca la implantación de los blastocistos (Yoshinaga, 1988). Las concentraciones plasmáticas de esta hormona se elevan significativamente en el periodo preimplantacional inmediatamente posterior a la monta, siendo los cuerpos lúteos, en la coneja, la principal fuente de progesterona durante toda la gestación (Browning *et al.*, 1980; Gadsby *et al.*, 1983). En este estudio, las diferencias encontradas en las concentraciones de progesterona el día 5 post-IA, pueden estar asociadas al mayor número de cuerpos lúteos presentes a nivel ovárico de las conejas híbridas y que por tanto, pudo conducir a una mejor desarrollo embrionario e implantación y a un mayor número de gazapos nacidos tal y como se ha demostrado.

Por otro lado, las conejas ibicencas mostraron un número menor de folículos preovulatorios lo que podría estar relacionado con una menor selección genética que en las razas híbridas. Sin embargo, los oocitos aspirados *in vitro* presentaron mejor calidad según criterios morfológicos, si bien posteriormente *in vivo*, no se observó una mejor calidad embrionaria. Las concentraciones plasmáticas de LH obtenidas en este estudio siguieron una evolución normal y similar a otros trabajos con conejo de carne (Rebollar *et al.*, 2012) pero en el pico preovulatorio, estos niveles de LH tendieron a ser ligeramente menores en las ibicencas. A pesar de esto, la ovulación se llevó a cabo de forma adecuada porque

el número de cuerpos lúteos observados alcanzaron valores normales y similares a los descritos para conejas nulíparas (Arias-Álvarez *et al.*, 2009). Aunque las hembras de esta parte del estudio fueran nulíparas, en todos los casos, se trataba de animales con un tamaño y peso adecuados para su edad y estado fisiológico. Es de destacar el gran número de embriones degenerados y asincrónicos recuperados en la población rústica, lo que podríamos atribuir a la menor selección genética o a la edad de las hembras.

En las razas seleccionadas de conejos se pretende obtener un elevado número de gazapos por camada (Santacreu, 2006) por lo que los caracteres han sido seleccionados en este sentido (Antonini y Cordiviola, 2010) a diferencia de las razas rústicas, que aunque suelen presentar buenas aptitudes reproductivas en general (Sierra y Sánchez, 1991), en condiciones como las del estudio actual (ritmo semiintensivo y primer parto) podrían disminuir.

CONCLUSIONES

En este estudio se presentan por primera vez, de forma integral, parámetros productivos hasta el período de cebo y parámetros reproductivos del conejo ibicenco no descritos anteriormente en la literatura, lo que es de gran importancia para la conservación de esta población autóctona española muy valorada por su diversidad genética y por su papel sociocultural. Como era de esperar estos parámetros son, en general, inferiores a los conseguidos por la raza híbrida: 1) Aunque la fertilidad fue similar, las ibicencas presentaron una prolificidad inferior que permitió a los gazapos llegar con un peso alto a destete, sin embargo durante el cebo los gazapos híbridos comerciales presentaron una mayor GMD y menor IC. 2) Las concentraciones de LH y progesterona fueron más altas en los cruces comerciales; además este grupo de conejas presentó un mayor número de folículos preovulatorios y oocitos, así como más cuerpos luteos y embriones recuperados con mayor velocidad de desarrollo embrionario que las hembras ibicencas.

Por lo tanto, las actuaciones en esta raza son necesarias para conservar genes únicos que permitan mantener la variabilidad de esta especie, amenazada por la implantación de otras razas comerciales de aptitud cárnica, como la Californiana, Neozelandesa y sus cruces, y que permitan también su utilidad futura.

AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

Este trabajo fue parcialmente financiado por los proyectos RZ2010-00012-00-00 y AGL-2011 23822. Agradecemos a Elena Aguado, Lena Ausín y Beatriz Velasco por su inestimable colaboración en la realización de este trabajo y al Dr. Juan Pablo Gutiérrez por la planificación del esquema de selección de las conejas ibicencas.

BIBLIOGRAFÍA

Antonini, A.G. y Cordiviola, C. 2010. Mejoramiento genético en conejos para carne (*Oryctolagus cuniculus*). *BAG, J Basic Appl Genet*, 21: 1-7.

- Arias-Álvarez, M.; García-García, R.M.; Rebollar, P.G.; Nicodemus, N.; Revuelta, L.; Millán, P. y Lorenzo, P.L. 2009. Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does. *Livest Sci*, 12: 107-115.
- Arias-Álvarez, M.; García-García, R.M.; Rebollar, P.G. y Lorenzo, P.L. 2007. Desarrollo folicular en la coneja. *Investigación técnica Económica Agraria*, 103: 173-185.
- Baselga, M. 2015. Mejora genética del conejo de carne. fundación de nuevas líneas. 40 Symposium de Cunicultura ASESCU. Editorial Agrícola Española. Santiago de Compostela, 22-29.
- Breuer, H.W. y Claussen, V. 1977. Correlation of birth weight and crown-rump to the number of implantations and litter size in rabbits. *Anat Embryol*, 151: 91-95.
- Browning, J.Y.; Keyes, P.L. y Wolf, R.C. 1980. Comparison of serum progesterone, 20 alpha-dihydroprogesterone, and estradiol-17 beta in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. *Biol Reprod*, 23: 1014-1019.
- Ministerio de la Presidencia. 2013. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. BOE. 8 de febrero de 2013, Num. 34, sección I, 11370-11421. <https://www.boe.es/boe/dias/2013/02/08/pdfs/BOE-A-2013-1337.pdf>. consultado (12/08/2016).
- Corrent, E.; Launay, C.; troislouches, G.; Viard, f.; Davoust, C. y Leroux, C. 2007. Impact d'une substitution d'amidon par des lipides sur l'indice de consommation du lapin en fin d'engraissement. Proc. 12èmes Journées Recherche Cunicole, 27-28 novembre. Le Mans, France, 97-100.
- De Blas, J.C.; taboada, E.; Mateos, G.G.; Nicodemus, N. y Méndez, J. 1995. Effect of substitution of starch for fiber and fat in isoenergetic diets on nutrient digestibility and reproductive performance of rabbits. *J Anim Sci*, 73: 1131-1137.
- Fortun-Lamothe, L. y Gidenne, t. 2006. Recent advances in the digestive physiology of the growing rabbit. In: Maertens, L., Coudert, P. (Eds.), Recent advances in rabbit sciences. In the framework of COST 848: *Multifaceted research in rabbits: a model to develop a healthy and safe production in respect with animal welfare*. Institute for Agricultural and fisheries Research, Animal Science Unit, (ILVO). Melle-Belgium, 201-211.
- Gadsby, J.E.; Keyes, P.L. y Bill, C.H. 1983. Control of corpus luteum function in the pregnant rabbit: role of estrogen and lack of a direct luteotropic role of the placenta. *Endocrinology*, 113: 2255-2262.
- García-Ximénez, f. y Vicente, J.S. 1991. Propuesta de un criterio de valoración de la capacidad uterina numérica en coneja. *Investigación técnica económica agraria (ITEA)*, 87A: 65-71.
- Lebas, f. 1975. the meat rabbit: Nutritional requirements and pellets. *Ann Zootech*, 22: 249-251.
- López, M. y Sierra l. 1998. Razas y poblaciones autóctonas de conejos domésticos. *Arc. Zootec*, 47: 467-471.
- Lorenzo, P.L.; Rebollar, P.G.; Illera, M.J.; Illera, J.C.; Illera, M. y Alvariano, J.M. 1996. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *J Reprod ferti*, 107: 109-107.
- McNiitt, J.I. y Lukefahr, S.D. 1990. Effects of breed, parity, day of lactation and number of kits on milk production of rabbits. *J Anim Sci*, 68: 1505-1512.
- Manchisi, A.; Gambacorta, M. y D'alesandro, A. 1991. Studio sulla durata di gestazione e sul ritmo nictemerale dei parti in coniglie Bianche di Nuova Zelanda. *Riv Coniglicol*, 4: 33-35.
- Martín de la Rosa, A.; Cervantes, I.; García-García, R.M.; Rebollar, P.G.; Arias Álvarez, M.; Lorenzo, P.L. y Gutiérrez, J.P. 2013. Estudio inicial de la estructura genética del conejo ibicenco a partir de información genealógica. AIDA (2013), XV Jornadas sobre Producción Animal, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, España, 2: 514-516.
- Moce, E.; Vicente, J.S. y Lavara, R. 2003. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *theriogenology*, 60: 115-123.

- Mittermeier, R.A.; Meyers, N.; Robles, G.P. y Mittermeier, C.G. 1999. Hotspots. Garza García N.L. CEMEX. México.
- Muguerza, M.A.; García, I. y Eguinoa, P. 2008. Efecto de la densidad de conejos sobre los resultados técnicoeconómicos. *Navarra Agraria*, 33-38.
- Pilandom, M.T. y Henaf, R. 1983. Potentialités zootechniques d'une populations de lapins Gris du Bourbonnais. *Cuniculture*, 10: 132-136.
- Payeras, Ll. 2009. Conejos. 1. Conill Eivissenc. En: Guía de campo de las razas autóctonas españolas. Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 602-603.
- Poignier, J.; Szendrő, Z.S.; Levai, A.; Radnai, I. y Biro-Nemeth, E. 2000. Effect of birth weight and litter size on growth and mortality in rabbit. *World Rabbit Sci*, 8: 103-109.
- Rebollar, P.G.; Pérez-Cabal, M.A.; Pereda, N.; Lorenzo, P.L.; Arias-Álvarez, M. y García-Rebollar, P. 2009. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livest Sci*, 121: 227-233.
- Rebollar, P.G.; Dal Bosco, A.; Millán, P.; Cardinali, R.; Brecchia, G.; Sylla, L.; Lorenzo, P.L. y Castellini, C. 2012. Ovulating induction methods in rabbit does: the pituitary and ovarian responses. *theriogenology*, 77: 292-298.
- Rochambeau, H.; fuente, L.F. de la y Rouvier, R. 1989. Sélection sur la vitesse de croissance post-sevrage chez le lapin. *Génét Sél Evol*, 21: 527-546.
- Rochambeau, H.; Bolet, G. y tudela, f. 1994. Long term selection. Comparison of two rabbit strains. 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Canada, 19: 257-260.
- Santacreu, M.A.; Mocé, M.L.; Climent, A. y Blasco, A. 2005. Divergent selection for uterine capacity in rabbits. II. Correlated response in litter size and its components estimated with a cryopreserved control population. *J Anim Sci*, 83: 2303-2307.
- Sierra, I. y Sánchez, M. 1991. Importancia de las razas autóctonas en cunicultura. Árbol académico. XVI Symposium Nacional de Cunicultura, III Muestra Provincial de Cunicultura, Diputación Provincial de Castellón, Castellón de la Plana. España, 29-40.
- Torrès, S.; Hulot, f. y Sevellec. C. 1987. Early stages of embryonic development in two rabbit genotypes. *Reprod Nutr Dev*, 27: 715-719.
- SAS Institute, 1990. SAS/STAT® User's Guide (Release 8.2). SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Yoshinaga, K. 1988. Uterine receptivity for blastocyst implantation (Review). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541: 424-431.