

COMUNICACIÓN

PRIMEROS RESULTADOS EN EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN DE GALLO EN TRES RAZAS CATALANAS¹

FIRST RESULTS ABOUT THE STUDY OF THREE CATALAN POULTRY BREEDS SEMEN CRYOPRESERVATION EFFECTS¹

Fontgibell, A. y A. Francesch²

¹IRTA. Centre de Mas Bové. Unitat de Genètica Avícola. Apartat 415. 43280 Reus. España. amadeu@masbove.irta.es.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Razas de gallinas autóctonas. Semen congelado en nitrógeno líquido. Crioprotectores. Fertilidad. Incubabilidad.

ADDITIONAL KEYWORDS

Local poultry breeds. Semen cryopreservation in liquid nitrogen. Fertility. Hatchability.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la congelación de semen de gallo en tres razas catalanas: Penedesenca, Empordanesa y Prat. Se emplearon tres crioprotectores separadamente: glicerol (GLY), dimetilacetamida (DMA) y dimetilsulfóxido (DMSO). Obtenido el semen se diluía en una proporción 1:3 iniciándose el proceso de congelación en nitrógeno líquido. Una muestra sin crioprotector fue inseminada recién obtenida. Practicada la descongelación, se inseminaban inmediatamente las muestras que contenían DMA y DMSO; en las que contenían GLY, éste se separaba de la muestra mediante diluciones sucesivas, centrifugándose luego a 2000 r.p.m. a 5°C, durante 15 min.

Se inseminaron un total de 152 gallinas de cada raza en 19 repeticiones del proceso de congelación. Se obtuvieron datos de fertilidad e

incubabilidad procedentes de huevos puestos en los diez días posteriores a la inseminación. Para el estudio de la fertilidad se realizó un análisis de la varianza considerando los factores: raza, crioprotector y día posterior a la inseminación. Para la incubabilidad se consideró raza y crioprotector.

De forma general e independientemente de la raza, la fertilidad fue más alta en el segundo día posterior a la inseminación cuando se congelaba, no diferenciándose significativamente la obtenida utilizando DMSO (21,88 p.100) de la obtenida utilizando GLY (14,59 p.100), pero ambas lo hicieron de la obtenida utilizando DMA que no presentó ningún pico y se mantuvo aproximadamente entre el 1 p.100 y el 5 p.100 como los otros dos a partir del 4º día. La fertilidad de los controles ha sido mayor en el tercer día (93,25 p.100). En cuanto a la incubabilidad de los huevos fértiles no se pudieron mostrar diferencias significativas utilizando semen fresco (71,79 p.100) respecto al semen congelado, pero en

¹Estudio financiado por el INIA mediante el proyecto SC95-051.

²Autor destinatario de la correspondencia.

este caso con los tres crioprotectores se obtuvieron incubabilidades mas bajas: 37,49 p.100 con DMA, 54,22 p.100 con DMSO y 56,58 p.100 con GLY.

was lower with the three cryoprotectants: 37.49 percent with DMA, 54.22 percent with DMSO and 56.58 percent with GLY.

SUMMARY

Effects of to freeze semen in three catalan poultry breeds: Penedesenca, Empordanesa y Prat were studied using three cryoprotectants separately: Glycerol (GLY), Dimethylacetamide (DMA) and Dimethylsulfoxide (DMSO). Semen was diluted in 1:3 proportion and frozen in liquid nitrogen. A sample without cryoprotectant was inseminated immediately. After thawing, the samples with DMA and DMSO were immediately inseminated and the samples with GLY before insemination were gradually diluted, and centrifuged at 2000 r.p.m. and 5°C during 15 min to reduce GLY concentration.

They were inseminated a total of 152 hens of each breed in 19 repetitions of the freezing process. Fertility and fertile hatchability of eggs laid from the second day to tenth day inclusive following the insemination were calculated. For the fertility study an analisis of variance was carried out with the factors: breed, cryoprotectant and day posterior of the insemination. For the hatchability the factors were breed and cryoprotectant.

Results showed in the three breeds that the high fertility was obtained in the second day posterior to the insemination with frozen semen, the fertility obtained with DMSO (21.88 percent) was not significantly different to that obtained with GLY (14.59 percent) but both were significantly diferent to the fertility obtained with DMA which did not show any pick and stayed approximately between the 1 percent and the 5 percent like the other two from the fourth day. The fertility obtained in the controls were higher in the third day (93.25 percent). The hatchability of the fertile eggs did not show significantly differences in the use of fresh semen (71.79 percent) respect frozen semen, but in this case the hatchability

INTRODUCCIÓN

Desde hace quince años el IRTA ha venido desarrollando un programa de conservación y mejora genética de razas de gallinas autóctonas catalanas (véase Francesch, 1997 a y b, para una revisión).

El número efectivo de reproductores constituye un factor limitante en todo programa de conservación genética y más en aquellas especies, como las gallinas, en las que en apareamiento el número de machos es menor que el de hembras. Aumentarlo significa mantener muchos machos hasta el momento de la reposición, en nuestro caso bianual. Por otra parte, en un programa de mejora genética de gallinas también se tienen que mantener muchos machos en espera de su evaluación genética. De todo ello se deriva el interés en la congelación de semen cara a disponer de un banco de material genético en conservación y reducir la población de gallos, a la vez que prevenimos la pérdida accidental de excelentes reproductores. En definitiva puede suponer un ahorro económico (comida, espacio, mano de obra) y una garantía en el mantenimiento de variabilidad genética.

El objetivo de este trabajo, por tanto, se centró en poner a punto técnicas de congelación de semen de gallo (Lake y Ravie 1984, Sexton, 1975) y probar los resultados en tres razas autóctonas catalanas al estudiar la fertilidad y la incubabilidad de los huevos fértiles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 machos y 125 hembras de 60 semanas de edad de cada una de las razas Penedesenca Negra, Empordanesa Roja y Prat Leonada. Los animales estaban ubicados en una nave de ambiente controlado, con un programa de iluminación de 14 horas de luz diarias. La dieta suministrada *ad libitum* era de 2850 kcal ME/kg y un 17 p.100 de proteína bruta tanto para los machos como para las hembras.

El semen se obtenía por masaje dorso-abdominal (Francesch, 1995) y se trasladaba a una cámara a 5°C. Se preparaban 18 muestras; dos muestras para cada raza con cada uno de cuatro disolventes diferenciados según el crioprotector: Dimetil-acetamida (DMA), Dimetil-sulfóxido (DMSO), Glicerol (GLY) y CONTROL (sin crioprotector) (Composición según Lake *et al.*, 1984). La proporción semen/disolvente fue 1:3, quedando la concentración de las muestras en 1,11M (8,07 p.100 (v/v)) de GLY, 1,128M (9,27 p.100 (v/v)) de DMA y 0,569M (4,0 p.100 (v/v)) de DMSO. Las muestras control se inseminaron inmediatamente y el resto pasó por el procedimiento de congelación hasta la introducción a Nitrógeno líquido (método descrito por Lake *et al.*, 1981). Después de 24 horas, se realizaba la descongelación de las muestras en un baño de alcohol a 5°C (Lake *et al.*, 1978) agitando los *racks* durante 5 minutos (Lake y Stewart, 1978). Según un estudio previo (Fontgibell, 1995), las muestras con DMA o con DMSO se administraban después de la descongelación y en las muestras con

GLY se reducía la concentración de éste mediante diluciones sucesivas y centrifugación a 2000 r.p.m. y 5°C durante 15 minutos de acuerdo con la metodología de Lake *et al.* (1981). Las muestras se trasladaban a la nave de inseminación manteniendo la temperatura en 5°C.

Se inseminaron un total de 152 gallinas de cada raza en las 19 repeticiones del proceso. La recogida de huevos fértiles se iniciaba el segundo día después de la inseminación y seguía durante los siete días consecutivos. Los huevos se almacenaban a 15°C y 70 p.100 de humedad relativa.

Se realizó un análisis de varianza para el estudio de la fertilidad y la incubabilidad de los huevos fértiles. Para la fertilidad se consideró el modelo $Y_{ijk} = \mu + R_i + T_j + D_k + (R*T)_{ij} + (R*D)_{ik} + (T*D)_{jk} + (R*T*D)_{ijk} + e_{ijk}$ y para la incubabilidad el modelo fue $Y_{ijk} = \mu + R_i + T_j + (R*T)_{ij} + e_{ij}$; donde R_i era la raza, T_j el tratamiento y D_k el día de puesta del huevo, con siete niveles (2° a 8° día posterior a la inseminación). Para analizarlos se utilizó el Modelo Lineal General del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1988). La separación de medias (LS-MEANS) se realizó con un test de la t-Student. Para analizar los porcentajes se les aplicó una transformación a arcoseno. La hipótesis alternativa era aceptada para un nivel de significación a $\alpha \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de fertilidad en función del crioprotector se muestran en la **tabla I**. La inseminación con semen fresco (CONTROL) presentó el me-

Tabla I. LS-means globales de los porcentajes de Fertilidad \pm Std Err desde el 2° al 8° días posteriores a la inseminación (Día d.p.I.) utilizando semen de gallo de las razas Penedesenca Negra, Prat Leonada y Empordanesa Roja congelado usando dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol (GLY) como crioprotectores frente a semen fresco (CONTROL). (Global LS-means of Fertility \pm Std Err percentages from 2th to 8th days after insemination (Day d.p.I.) using semen of Penedesenca Negra, Prat Leonada, and Empordanesa Roja poultry breeds frozen using dimethylacetamide (DMA), dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol (GLY) as cryoprotectants opposite to fresh semen (CONTROL).

| Día d.p.I. | CONTROL | DMSO | GLY | DMA |
|------------|---|---|--|---|
| 2º | 68,22 \pm 3,46 ^a ₁ | 21,88 \pm 3,58 ^c ₁ | 14,59 \pm 3,59 ^c ₁ | 3,07 \pm 3,61 ^b ₁ |
| 3º | 93,25 \pm 3,84 ^a ₂ | 12,92 \pm 3,67 ^c ₁₂ | 4,85 \pm 3,78 ^{bc} ₂ | 1,03 \pm 3,64 ^b ₁ |
| 4º | 90,45 \pm 3,84 ^a ₂ | 1,97 \pm 3,55 ^b ₃ | 8,72 \pm 3,93 ^b ₁₂ | 4,51 \pm 3,76 ^b ₁ |
| 5º | 89,34 \pm 3,82 ^a ₂₄ | 3,12 \pm 3,67 ^b ₂₃ | 4,65 \pm 3,90 ^b ₂ | 5,35 \pm 3,75 ^b ₁ |
| 6º | 86,00 \pm 3,76 ^a ₂₃ | 3,44 \pm 3,52 ^b ₂₃ | 3,51 \pm 3,56 ^b ₂ | 3,36 \pm 3,68 ^b ₁ |
| 7º | 79,49 \pm 3,65 ^a ₃₄ | 2,89 \pm 3,56 ^b ₂₃ | 5,75 \pm 3,80 ^b ₁₂ | 1,12 \pm 3,83 ^b ₁ |
| 8º | 78,79 \pm 3,70 ^a ₃ | 3,12 \pm 3,72 ^b ₂₃ | 4,06 \pm 4,23 ^b ₂ | 3,02 \pm 3,98 ^b ₁ |
| Media | 83,64 \pm 1,41 | 7,05 \pm 1,37 | 6,58 \pm 1,44 | 3,06 \pm 1,41 |

Los valores con la misma letra dentro de una fila y los valores con un mismo número dentro de una columna no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

nor porcentaje de fertilidad (68,22 p.100) en el 2º día después de la inseminación, diferenciándose significativamente del resto de días en los que

presento un pico del 93,25 p.100 en el 3º. Ocurrió lo contrario con semen congelado, que presentó su máximo de fertilidad en el 2º día con un 21,88

Tabla II. LS-means de los porcentajes de Fertilidad \pm Std Err utilizando semen de gallo de las razas Penedesenca Negra, Prat Leonada y Empordanesa Roja congelado usando dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol (GLY) como crioprotectores frente a semen fresco (CONTROL). (LS-means of Fertility \pm Std Err percentages using semen of Penedesenca Negra, Prat Leonada, and Empordanesa Roja poultry breeds frozen using dimethylacetamide (DMA), dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol (GLY) as cryoprotectants opposite to fresh semen (CONTROL).

| | CONTROL | DMA | DMSO | GLY | Media |
|-------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Penedesenca | 85,87 \pm 2,27 | 3,28 \pm 2,38 | 8,06 \pm 2,28 | 9,23 \pm 2,37 | 26,53 \pm 1,17a |
| Prat | 86,67 \pm 2,60 | 5,02 \pm 2,46 | 9,51 \pm 2,34 | 8,54 \pm 2,59 | 27,43 \pm 1,24a |
| Empordanesa | 78,68 \pm 2,41 | 0,88 \pm 2,51 | 3,55 \pm 2,44 | 2,02 \pm 2,55 | 21,29 \pm 1,23b |

Los valores con la misma letra dentro de una columna no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

CONGELACIÓN DE SEMEN DE GALLO EN RAZAS CATALANAS

p.100 para el DMSO y un 14,59 p.100 para el GLY, no pudiéndose mostrar diferencias significativas entre ambos. El DMA no presentó ningún pico de fertilidad destacable situándose entre el 1 p.100 y 5 p.100 a lo largo de los días considerados posteriores a la inseminación y similar al que presentaron los otros dos crioprotectores a partir del 4º día. Ello explica la interacción entre tratamiento y el día considerado (posterior a la inseminación) que resultó significativa ($p \leq 0,0001$). Con el DMSO y el GLY la fertilidad global fue muy parecida, algo superior aunque no significativamente con el DMSO. Esto hace decidir considerando además el trabajo suplementario de centrifugación absolutamente necesario para el GLY (Lake *et al.*, 1980 y Fontgibell, 1995) que, por lo menos en estas razas, el DMSO resultó el mejor crioprotector *in vivo*.

La fertilidad al congelar disminuyó en el tramo que va del segundo al tercer día posterior a la inseminación,

lo que coincide con Sexton *et al.* (1978) que encontraron que la fertilidad caía a partir del 2º ó 4º días según si se utilizaba GLY o DMSO. Así pues, coincidiendo con Lake *et al.* (1978, 1981, 1984) para mantener el nivel de fertilidad obtenido en el segundo día posterior a la inseminación parece que convendría realizar tres inseminaciones semanales con un intervalo de un día.

Los resultados de fertilidad por razas se presentan en la **tabla II**. El análisis estadístico reveló diferencias de fertilidad entre razas. La raza que se diferenció significativamente de las otras fue la Empordanesa con una menor fertilidad independientemente de si se trataba de semen fresco o congelado, del crioprotector y del día posterior a la inseminación considerado, pues en el modelo considerado no se hallaron significativas las interacciones del factor raza con los demás factores.

En la **tabla III** se presentan los

Tabla III. LS-means de los porcentajes de Incubabilidad de huevos fértiles \pm Std Err usando semen de gallo de las razas Penedesenca Negra, Prat Leonada y Empordanesa Roja congelado utilizando dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol (GLY) como crioprotectores frente a semen fresco (CONTROL). (LS-means of fertile eggs hatchability \pm Std Err percentages using semen of Penedesenca Negra, Prat Leonada and Empordanesa Roja poultry breeds frozen using dimethylacetamide (DMA), dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol (GLY) as cryoprotectants opposite to fresh semen (CONTROL)).

| | Penedesenca | Prat | Empordanesa | Media |
|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| CONTROL | 77,16 \pm 9,97 | 75,27 \pm 9,65 | 62,93 \pm 9,97 | 71,79 \pm 5,69 |
| DMA | 62,49 \pm 19,33 | 50,00 \pm 17,29 | 0,00 \pm 38,66 | 37,49 \pm 15,52 |
| DMSO | 57,13 \pm 14,60 | 55,55 \pm 15,77 | 50,00 \pm 19,33 | 54,22 \pm 9,64 |
| GLY | 92,00 \pm 17,29 | 44,44 \pm 15,77 | 33,32 \pm 22,31 | 56,58 \pm 10,77 |
| Media | 72,20 \pm 7,85 | 56,32 \pm 7,45 | 36,57 \pm 12,41 | |

porcentajes de incubabilidad de los huevos fértiles. El modelo estadístico no resultó significativo, por lo que no podemos mostrar diferencias de incubabilidad utilizando semen congelado frente a fresco. No obstante es de destacar que de forma bastante general la incubabilidad ha resultado inferior cuando se ha utilizado semen congelado. Probablemente la magnitud del error estándar haya impedido encontrar significativas las diferencias. Si bien los resultados coinciden con Williamson *et al.* (1981), que no

encontró que la mortalidad embrionaria se viera afectada por el uso de semen congelado, podría no ser así, al menos en estas tres razas, si este parámetro se analizara con un mayor tamaño de muestra. Con todo, los resultados obtenidos están siendo mejorados por modificaciones del método, así como por el aumento de la experiencia y dentro de las líneas de conservación genética muestran que la congelación de semen utilizando DMSO, en nuestro caso, puede constituir un recurso interesante.

BIBLIOGRAFÍA

- Fontgibell, A. 1995. Trabajo Final de Carrera. E.T.S. d'Enginyeria Agrària. Universitat de Lleida.
- Francesch, A. 1995. Inseminación artificial de gallinas. *Selecciones Avícolas*, XXXVII: 30-33.
- Francesch, A. 1997a. Programa IRTA de conservación de razas de gallinas autóctonas catalanas. *Arte Avícola*, 18: 13-16.
- Francesch, A. 1997b. Conservació i millora genètica de gallines catalanes. *Catalunya Rural i Agrària*, 36: 16-20.
- Lake, P. E. and J.M. Stewart. 1978. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen-an improved method. *British Poultry Science*, 19: 187-194.
- Lake, P. E., R.B. Buckland and O. Ravie. 1980. Effect of glycerol on the viability of fowl spermatozoa-implications for its use when freezing semen. *Cryo-Letters*, 1: 299-304.
- Lake, P.E., O. Ravie and J. McAdam. 1981. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: application to breeding programmes. *British Poultry Science*, 22: 71-77.
- Lake, P. E. and O. Ravie. 1984. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 25: 145-150.
- Lake, P.E. and O. Ravie. 1986. Fertility after the cryopreservation of fowl spermatozoa in the presence of dimethylacetamide. VII Conferencia Europea de Avicultura, París 24-28 Agosto 1986.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT User's guide, Release 6.03. Ed. SAS Institute Inc.
- Sexton, T.J. 1975. Comparison of various cryoprotective agents on washed chicken spermatozoa 5. Effect of glucose, sucrose and polyvinylpyrrolidone. *Poultry Science*, 54: 1297-1299.
- Sexton, T. J., R.B. Buckland and R. López. 1978. Comparison of two procedures for freezing semen from cocks of high and low fertility

CONGELACIÓN DE SEMEN DE GALLO EN RAZAS CATALANAS

with frozen semen. *Poultry science*, 57: 550-552.

Williamson, R.G., R.J. Etches, B.S. Reinhart and J.W. MacPherson. 1981. The effects of

cooling rate before freezing and the temperature of semen upon addition of DMSO on the fertilizing capacity of chicken semen stored at -196°C. *Reprod. Dévelop.*, 21: 1033-1042.